Biología molecular de LA CÉLULA

BRUCE ALBERTS
ALEXANDER JOHNSON
JULIAN LEWIS
MARTIN RAFF
KEITH ROBERTS
PETER WALTER

Quinta edición

OMEGA

Biología molecular de
LA CÉLULA

Quinta edición



ALBERTS JOHNSON LEWIS RAFF ROBERTS WALTER



Biología molecular de
LA CÉLULA

BRUCE ALBERTS
ALEXANDER JOHNSON
JULIAN LEWIS
MARTIN RAFF
KEITH ROBERTS
PETER WALTER

Quinta edición

ISBN 978-84-282-1507-7

Biología molecular de LA CÉLULA

Quinta edición

Bruce Alberts
Alexander Johnson
Julian Lewis
Martin Raff
Keith Roberts
Peter Walter

Con problemas de

John Wilson
Tim Hunt

Traducido por
Mercè Durfort i Coll
Miquel Llobera i Sande
Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona

EDICIONES OMEGA

Bruce Alberts es doctor (Ph.D.) por la Universidad de Harvard y profesor de Bioquímica y Biofísica en la Universidad de California, San Francisco. Durante 12 años fue presidente de la U.S. National Academy of Sciences (1993-2005). **Alexander Johnson** es doctor (Ph.D.) por la Universidad de Harvard y es profesor de Microbiología e Inmunología y director del Programa para graduados en Bioquímica, Biología celular, Genética y Biología del desarrollo en la Universidad de California, San Francisco. **Julian Lewis** es doctor (D.Phil.) por la Universidad de Oxford y es Principal Scientist del London Research, Institute of Cancer Research, Reino Unido. **Martin Raff** es doctor (M.D.) por la Universidad McGill y en la actualidad trabaja en el Medical Research Council Laboratory for Molecular Cell Biology y en el Departamento de Biología del University College London. **Keith Roberts** es doctor (Ph.D.) por la Universidad de Cambridge y es Emeritus Fellow en el John Innes Centre, Norwich. **Peter Walter** es doctor (Ph.D.) por la Universidad Rockefeller de Nueva York y es profesor y director del Departamento de Bioquímica y Biofísica de la Universidad de California, San Francisco, e investigador del Howard Hughes Medical Institute.

En la traducción han colaborado: David Ricart (Cap. 4), Eva Pardina (Cap. 5), Olga Andrés (Cap. 7), Antonio Felipe (Cap. 8), Manuel Reina (Cap. 13), Roser Pagan (Caps. 16 y 20), Juan Montes (Caps. 17 y 18), Albert Martínez (Cap. 19), Maria Gràcia Bozzo (Cap. 21), Neus Villegas y Jaume Vaqué (Cap. 22), Montserrat Poquet (Cap. 23), Mireia Martín y Josep García Valero (Caps. 24 y 25).
Revisión de la traducción: Raquel Celis Martínez.

Este libro contiene información que se ha obtenido de fuentes fidedignas y dignas de todo crédito. Los materiales se han reproducido con permiso y siempre se indica su procedencia. También se incluyen amplias bibliografías. Se ha realizado el máximo esfuerzo para publicar información y datos veraces, pero los autores y editores no se responsabilizan de la validez de todos los materiales o de las consecuencias de su utilización.

Authorized translation from English language edition published by Garland Science, part of Taylor & Francis Group, LLC.

MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, FIFTH EDITION

Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra solo puede realizarse con la autorización escrita de los titulares del "Copyright".

© 2008, 2002 by Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter.
© 1983, 1989, 1994 by Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and James D. Watson.
All rights reserved.
y para la edición española
© 2010 Ediciones Omega, S.A.
Plató, 26 - 08006 Barcelona
www.ediciones-omega.es

ISBN 978-84-282-1507-7
Depósito legal: B. 6.678-2010
Printed in Spain
EGEDSA - Sabadell

Prefacio

En muchos aspectos entendemos mejor la estructura del universo que la de las células vivas. Los científicos pueden calcular la edad del sol y predecir cuándo dejará de brillar, pero no podemos explicar cómo es que un humano puede vivir 80 años pero un ratón sólo 2. Conocemos la secuencia completa del genoma de estas dos especies y de muchas otras, pero todavía no podemos predecir cómo se comportará una célula si mutamos un gen que no ha sido estudiado. Las estrellas pueden ser 10^{43} veces mayores, pero las células son más complejas, intrincadas estructuralmente y productos más asombrosos de las leyes de la física y la química. Gracias a la herencia de la selección natural, que actúa desde el inicio de la vida en la Tierra hasta nuestros días, es decir, durante un 20% de la edad del universo, las células vivas se han refinado de forma progresiva y extendido su maquinaria molecular y "recordado" los resultados de sus experimentos en las instrucciones genéticas que han ido pasando a su progenie.

En cada una de las ediciones de este libro, nos maravillamos de la nueva información que los biólogos celulares han conseguido únicamente en unos cuantos años. Pero estamos incluso más sorprendidos de la sofisticación de los mecanismos que han descubierto. Cuanto más buceamos en el interior de las células, más descubrimos lo que queda por entender. En los días de nuestra inocencia, trabajando sobre la primera edición, aclamamos la identificación de una única proteína –llamada receptor de señal– como un gran paso adelante. Ahora apreciamos que cada proteína generalmente es una parte de un complejo formado con muchas otras, las cuales trabajan juntas, forman un sistema que regula sus actividades unas en relación a las otras a través de sistemas sutiles y se colocan en posiciones específicas mediante la unión a proteínas de armazón que confieren a los factores químicos una estructura espacial definida. La secuenciación del genoma ha facilitado listas casi completas de las zonas moleculares de muchos organismos diferentes; los genetistas y los bioquímicos han proporcionado informaciones importantes sobre qué partes del genoma actúan individualmente y cuáles interactúan con otras; pero sólo disponemos de informaciones muy preliminares sobre la dinámica de estos sistemas bioquímicos, con todos sus circuitos de control interconectados. Así pues, a pesar de que disponemos de grandes cantidades de información, los biólogos celulares esperan aumentar sus conocimientos y conseguir grandes éxitos en el futuro.

En esta edición hemos añadido material nuevo en muchos temas, desde la epigenética hasta las modificaciones de las histonas, los RNA pequeños, la genómica comparada, el ruido genético, la dinámica del citoesqueleto, el control del ciclo celular, la apoptosis, las células madre y nuevas terapias contra el cáncer. Como en ediciones anteriores, ante todo hemos intentado proporcionar a los lectores una trama conceptual sobre toda la información que en la actualidad tenemos de las células. Este objetivo implica ir más allá de simples listas de hechos. La intención es aprender cómo utilizar estos hechos para razonar, predecir y controlar el comportamiento de las células vivas.

Para ayudar a los lectores a realizar un aprendizaje activo se han incorporado por primera vez, en los capítulos del 1 al 20, problemas al final de cada uno de ellos, escritos por John Wilson y Tim Hunt. Estos problemas destacan por ofrecer una aproximación cuantitativa e intentan hacer razonar a partir de experimentos. ***Biología molecular de la célula, quinta edición: Libro de problemas***, escrito por los mismos autores, proporciona las respuestas a estos problemas y además contiene más de 1700 problemas y soluciones adicionales.

Otro suplemento importante del libro principal es el DVD-ROM. Proporciona centenares de películas y animaciones, muchas de las cuales son nuevas en esta edición, que muestran células y procesos celulares en acción y dan vida al texto; el disco ahora incluye todas las figuras y tablas del libro principal cargadas en presentaciones de Power Point®.

El detalle completo de los signos convencionales utilizados en el libro están en la nota al lector que sigue a este prefacio. Como se explica allí, hemos adoptado una drástica aproximación al confrontar las diferentes reglas utilizadas para escribir los nombres de los genes de diferentes especies: a lo largo del texto utilizamos un solo estilo para todas las especies, a menudo desafiando los signos convencionales específicos de cada especie.

Como siempre estamos en deuda con mucha gente. Los agradecimientos completos a las colaboraciones científicas se expresan a parte pero queremos destacar algunas contribuciones excepcionalmente importantes: Julie Theriot es el responsable casi único del Capítulo 16 (El citoesqueleto) y del Capítulo 24 (Patógenos, infección e inmunidad innata) y David Morgan del Capítulo 17 (El ciclo celular). Wallace Marshall y Laura Attardi proporcionaron colaboraciones sustanciales en los Capítulos 8 y 20 respectivamente, como hizo Maynard Olson en la sección de genómica del Capítulo 4, Xiaodong Wang en el Capítulo 18 y Nicholas Harberd en la sección vegetal del Capítulo 15.

También estamos en deuda con el equipo de Garland Publishing y con otras personas que transformaron el esfuerzo de los escritores en un producto final cuidado. Denise Schanck dirigió toda la empresa y condujo a los autores descarriados por el camino correcto con sabiduría, tacto y amabilidad. Nigel Orme acabó las figuras y supervisó los aspectos visuales del libro incluyendo la cubierta posterior, con su elegancia habitual. Matthew Clements diseñó la cubierta del libro. Emma Jeffcock trató sus páginas con una velocidad extraordinaria y una eficiencia insuperable, siendo impecable en las numerosas correcciones que hizo. Michael Morales consiguió transformar la gran cantidad de animaciones, videoclips y otros materiales en un DVD-ROM fácil de utilizar. Eleanor Lawrence y Sherry Granum revisaron y actualizaron el glosario. Jackie Harbor y Sigrid Masson colaboraron en que el trabajo fuera organizado. Adam Sendroff nos hizo prestar atención a nuestros lectores y a sus necesidades y reacciones. Marjorie Anderson, Bruce Goatly y Sherry Granum liberaron el texto de confusiones, desaciertos y errores. Les agradecemos a todos ellos no sólo su nivel y dedicación profesionales y su eficiencia para sobrepasarnos a nosotros mismos sino también su camaradería y ayuda en todo momento: han conseguido que el trabajar en el libro haya sido un placer.

Finalmente y no con menos gratitud, expresamos nuestro agradecimiento a nuestras esposas, familias, amigos y colegas. Sin su paciencia y su apoyo incondicional no podríamos haber producido ninguna de las ediciones de este libro.

Índice general

Características especiales — *viii*
Índice de materias — *ix*
Agradecimientos — *xxvi*
Nota al lector — *xxxi*
Nota de los traductores — *xxxiv*

PARTE I — INTRODUCCIÓN A LA CÉLULA

1. Células y genomas — 1
2. Química celular y biosíntesis — 45
3. Proteínas — 125

PARTE II — MECANISMOS GENÉTICOS BÁSICOS

4. DNA, cromosomas y genomas — 195
5. Replicación, reparación y recombinación del DNA — 263
6. Cómo leen las células el genoma: del DNA a la proteína — 329
7. El control de la expresión génica — 411

PARTE III — MÉTODOS

8. Manipulación de proteínas, DNA y RNA — 501
9. Observar las células — 579

PARTE IV — ORGANIZACIÓN INTERNA DE LA CÉLULA

10. Estructura de la membrana — 617
11. Transporte de moléculas pequeñas a través de la membrana y las propiedades eléctricas de las membranas — 651
12. Compartimientos intracelulares y clasificación de proteínas — 695
13. Tráfico vesicular intracelular — 749
14. Conversión energética: mitocondrias y cloroplastos — 813
15. Mecanismos de comunicación celular — 879
16. El citoesqueleto — 965
17. El ciclo celular — 1053
18. Apoptosis — 1115

PARTE V — CÉLULAS EN SU CONTEXTO SOCIAL

19. Uniones celulares, adhesión celular y matriz extracelular — 1131
20. Cáncer — 1205
21. La reproducción sexual: meiosis, células germinales y fecundación — 1269
22. Desarrollo de los organismos pluricelulares — 1305
23. Los tejidos especializados, las células madre y la renovación tisular — 1417
24. Patógenos, infección e inmunidad innata — 1485
25. Sistemas de inmunidad adquirida — 1539

Glosario — *G-1*
Índice alfabético — *I-1*
Tablas: el código genético, aminoácidos — *T-1*

Características especiales

Tabla 1–1	Algunos genomas secuenciados por completo	18
Tabla 1–2	Número de familias génicas, clasificadas por función, que son comunes para los tres dominios del mundo vivo	24
Tabla 2–1	Enlaces químicos covalentes y no-covalentes	53
Tabla 2–2	Tipos de moléculas en las células bacterianas	55
Tabla 2–3	Composición química aproximada de una célula típica bacteriana y de una célula típica de mamífero	63
Tabla 2-4	Relación entre la variación de energía libre, $\Delta G°$, y la constante de equilibrio	77
Panel 2–1	Enlaces químicos y grupos que habitualmente se encuentran en las moléculas biológicas	106-107
Panel 2–2	El agua y su influencia en el comportamiento de las moléculas biológicas	108-109
Panel 2–3	Los principales tipos de enlaces químicos débiles que unen las macromoléculas	110-111
Panel 2–4	Algunos de los tipos de azúcares frecuentes en las células	112-113
Panel 2–5	Ácidos grasos y otros lípidos	114-115
Panel 2-6	Panorámica general de los nucleótidos	116-117
Panel 2–7	Energía libre y reacciones biológicas	118-119
Panel 2-8	Detalles de las 10 etapas de la glucólisis	120-121
Panel 2–9	El ciclo del ácido cítrico completo	122-123
Panel 3–1	Los 20 aminoácidos que se encuentran en las proteínas	128-129
Panel 3–2	Cuatro maneras diferentes de representar una proteína pequeña: el dominio SH2	132-133
Tabla 3–1	Algunos tipos comunes de enzimas	159
Panel 3–3	Algunos de los métodos utilizados para estudiar las enzimas	162-163
Tabla 4–1	Algunos datos estadísticos del genoma humano	206
Tabla 5–3	Las tres clases principales de elementos transponibles	318
Tabla 6–1	Tipos principales de RNA que fabrican las células	336
Panel 8–1	Resumen de genética clásica	554-555
Tabla 10–1	Composición lipídica aproximada de diferentes membranas celulares	624
Tabla 11–1	Comparación de las concentraciones de iones dentro y fuera de una célula de mamífero típica	652
Panel 11–2	Deducción de la ecuación de Nernst	670
Panel 11–3	Algunos experimentos clásicos con el axón gigante del calamar	679
Tabla 12–1	Volúmenes relativos ocupados por los principales compartimientos intracelulares en una célula hepática típica (hepatocito)	697
Tabla 12–2	Cantidades relativas de tipos de membrana en dos tipos de células eucariotas	697
Tabla 14–1	Productos resultantes de la oxidación de azúcares y de grasas	824
Panel 14–1	Potenciales redox	830
Tabla 15–5	La familia Ras de GTPasas monoméricas	927
Panel 16–2	La polimerización de la actina y de la tubulina	978-979
Panel 16–3	Proteínas accesorias que controlan el ensamblaje y la localización de los filamentos del citoesqueleto	994-995
Tabla 17–2	Resumen de las principales proteínas reguladoras del ciclo celular	1066
Panel 17–1	Las principales etapas de la fase M (mitosis y citocinesis) en una célula animal	1072-1073

Índice de materias

Capítulo 1 Células y genomas 1

LAS CARACTERÍSTICAS UNIVERSALES DE LAS CÉLULAS EN LA TIERRA 1

Todas las células guardan su información hereditaria en el mismo código químico lineal (el DNA) 2

Todas las células replican su información hereditaria mediante una polimerización sobre un molde 3

Todas las células transcriben porciones de la información hereditaria contenida en el DNA, en el mismo tipo de molécula (el RNA) 4

Todas las células utilizan las proteínas como catalizadores 5

Todas las células traducen de la misma manera el RNA a proteína 6

El gen es el fragmento de la información genética que corresponde a una proteína 7

La vida necesita energía libre 8

Todas las células funcionan como factorías bioquímicas que procesan los mismos bloques moleculares básicos de construcción 8

Todas las células están envueltas por una membrana plasmática por la que deben pasar los nutrientes y los materiales de desecho 9

Una célula viva puede existir con menos de 500 genes 10

Resumen 10

LA DIVERSIDAD DEL GENOMA Y EL ÁRBOL DE LA VIDA 11

Las células pueden alimentarse de una gran variedad de fuentes de energía libre 12

Algunas células fijan nitrógeno y dióxido de carbono para otros organismos 12

Las células procariotas presentan la mayor diversidad bioquímica 14

El árbol de la vida tiene tres ramas principales: las bacterias, las arqueobacterias y los eucariotas 15

Algunos genes evolucionan rápidamente mientras que otros se conservan 16

La mayoría de las bacterias y de las arqueas tienen entre 1100 y 6000 genes 17

Los genes se generan a partir de genes ya existentes 18

Las duplicaciones génicas dan lugar a familias de genes próximos en una misma célula 19

Los genes pueden ser transferidos entre organismos, tanto en la naturaleza como en el laboratorio 21

El intercambio horizontal de la información genética entre especies se ha hecho realidad a través del sexo 22

A partir de la secuencia de un gen a menudo se puede deducir su función 22

Más de 200 familias de genes son comunes para las tres ramas principales del árbol de la vida 22

Las mutaciones revelan las funciones de los genes 23

Los biólogos moleculares han centrado sus estudios en *E. coli* 24

Resumen 25

LA INFORMACIÓN GENÉTICA EN EUCARIOTAS 26

Las células eucariotas se originaron como depredadores 26

Las células eucariotas actuales han evolucionado gracias a un proceso simbiótico 27

Los eucariotas tienen genomas híbridos 30

El genoma eucariota es grande 30

Los genomas de eucariotas son ricos en DNA de regulación 31

El genoma define el programa del desarrollo pluricelular 31

Muchos eucariotas viven como células solitarias: los protistas 32

Una levadura es el modelo eucariota más pequeño 33

Los niveles de expresión de todos genes de un organismo se pueden seguir simultáneamente 34

Para que las células tengan sentido, necesitamos de las matemáticas, ordenadores e información cuantitativa 35

Arabidopsis ha sido escogida entre 300.000 especies candidatas como modelo vegetal 36

El mundo de las células animales tiene como modelo un gusano, una mosca, un ratón y un ser humano 36

Los estudios en *Drosophila* proporcionan una clave del desarrollo de los vertebrados 37

El genoma de los vertebrados es el producto de duplicaciones repetidas 38

La redundancia genética constituye un problema para los genetistas, pero supone oportunidades para la evolución 39

El ratón se utiliza como modelo para los mamíferos 39

Los seres humanos analizamos nuestras propias particularidades 40

Todos tenemos detalles diferentes 41

Resumen 42

Problemas 42

Bibliografía 44

Capítulo 2 Química celular y biosíntesis 45

LOS COMPONENTES QUÍMICOS DE LA CÉLULA 45

Las células están formadas a partir de un número relativamente pequeño de tipos de átomos 45

Los electrones más externos determinan la manera en que interactúan los átomos 46

Los enlaces covalentes se forman al compartir electrones 48

Existen diferentes tipos de enlaces covalentes 50

Un átomo se comporta a menudo como si tuviera un radio fijo 51

El agua es la sustancia más abundante de las células 51

Algunas moléculas polares son ácidos o bases 52

En las células, cuatro tipos de atracciones no covalentes facilitan la unión de las moléculas entre sí 53

Las células están formadas por compuestos de carbono 54

Las células contienen cuatro grandes familias de pequeñas moléculas orgánicas 55

Los azúcares son fuente de energía para las células y son las subunidades de los polisacáridos 55

Los ácidos grasos son componentes de las membranas celulares y también fuentes de energía 58

Los aminoácidos son las subunidades de las proteínas 59

Los nucleótidos son las subunidades del DNA y del RNA 61

La química celular está determinada por macromoléculas con propiedades sorprendentes 62

Los enlaces no-covalentes determinan la forma precisa de una macromolécula y su unión con otras moléculas 64

Resumen 65

CATÁLISIS Y UTILIZACIÓN DE ENERGÍA POR LAS CÉLULAS 65

Las enzimas organizan el metabolismo celular 66

El orden biológico es posible gracias a que las células liberan energía en forma de calor 66

Los organismos fotosintéticos utilizan la luz del sol para sintetizar moléculas orgánicas 68

Las células obtienen energía a partir de la oxidación de las moléculas orgánicas 70

La oxidación y la reducción suponen la transferencia de electrones 71

Las enzimas disminuyen las barreras que bloquean las reacciones químicas 72

De qué forma las enzimas encuentran a sus sustratos: la enorme velocidad de los movimientos moleculares 73

La variación de energía libre de una reacción determina si esta reacción puede tener lugar 75
La concentración de los reactivos influye sobre la variación de energía libre y el sentido de la reacción 76
En el caso de reacciones secuenciales, los valores de $\Delta G°$ son aditivos 77
Las moléculas transportadoras activadas son esenciales para la biosíntesis 78
La formación de un transportador activado se acopla a una reacción energéticamente favorable 79
El ATP es la molécula más utilizada como transportador activado 80
A menudo, la energía almacenada en el ATP se aprovecha para unir dos moléculas 81
NADH y NADPH son importantes transportadores de electrones 82
En las células existen otras moléculas transportadoras activadas 84
La hidrólisis de ATP dirige la síntesis de polímeros biológicos 85
Resumen 87

CÓMO LAS CÉLULAS OBTIENEN ENERGÍA DE LOS ALIMENTOS 88
La glucólisis es una vía central de producción de ATP 88
Las fermentaciones producen ATP en ausencia de oxígeno 90
La glucólisis ilustra de qué forma las enzimas acoplan la oxidación al almacenamiento de energía 91
Los organismos almacenan moléculas de alimento en reservorios especiales 91
La mayoría de las células animales, entre periodos de alimentación, obtienen su energía de las grasas 95
Los azúcares y las grasas son degradados a acetil CoA en la mitocondria 96
El ciclo del ácido cítrico genera NADH mediante la oxidación de grupos acetilo hasta CO_2 97
El transporte de electrones impulsa la síntesis de gran parte del ATP en la mayoría de las células 100
Los aminoácidos y los nucleótidos forman parte del ciclo del nitrógeno 100
El metabolismo está organizado y regulado 101
Resumen 103
Problemas 103
Bibliografía 124

Capítulo 3 Proteínas **125**

FORMA Y ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS 125
La forma de una proteína está especificada en su secuencia de aminoácidos 125
Las proteínas se pliegan adoptando la conformación de menor energía 130
La hélice α y la lámina β son patrones comunes de plegamiento 131
Los dominios proteicos son unidades modulares a partir de los que se construyen las proteínas grandes 136
De entre la gran cantidad de cadenas polipeptídicas posibles, sólo unas cuantas son útiles para las células 137
Las proteínas pueden clasificarse en muchas familias 137
La búsqueda de secuencias puede identificar parentescos 139
Algunos dominios proteicos forman parte de muchas proteínas diferentes 140
Algunas parejas de dominios se encuentran juntos en muchas proteínas 141
El genoma humano codifica un complejo conjunto de proteínas, muchas de las cuales siguen siendo desconocidas 142
Es frecuente que cada una de las moléculas proteicas de mayor tamaño contenga más de una cadena polipeptídica 142
Algunas proteínas forman largos filamentos helicoidales 143
Muchas moléculas de proteína tienen una forma fibrosa y alargada 145
Muchas proteínas contienen una cantidad sorprendentemente elevada de su cadena polipeptídica desestructurada 147
Las uniones covalentes cruzadas suelen estabilizar las proteínas extracelulares 148
A menudo las moléculas proteicas actúan como subunidades que dan lugar a grandes estructuras 148
Muchas estructuras celulares son capaces de autoensamblarse 149
A menudo la presencia de factores de ensamblaje colabora en la formación de estructuras biológicas complejas 151
Resumen 152

FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS 152
Todas las proteínas se unen a otras moléculas 153
La conformación de la superficie de una proteína determina sus propiedades químicas 154
La comparación de secuencias entre miembros de una familia proteica revela lugares cruciales de unión al ligando 155
Las proteínas se unen unas a otras a través de diferentes tipos de interfases 156
Los lugares de unión de los anticuerpos son especialmente versátiles 156
La constante de equilibrio mide la fuerza de unión 157
Las enzimas son potentes catalizadores y altamente específicos 158
El primer paso de la catálisis enzimática es la unión del sustrato 159
Las enzimas aceleran las reacciones estabilizando determinados estados de transición 160
Las enzimas pueden utilizar simultáneamente catálisis ácida y básica 160
La lisozima ilustra cómo funciona una enzima 161
Moléculas pequeñas se unen íntimamente a las proteínas y aportan funciones extra 166
Los túneles moleculares canalizan los sustratos a las enzimas que tienen muchos lugares catalíticos 167
Los complejos multienzimáticos ayudan a incrementar la velocidad del metabolismo celular 168
La célula regula las actividades catalíticas de sus enzimas 169
Las enzimas alostéricas tienen dos o más lugares de unión que interactúan entre sí 171
Dos ligandos cuyos lugares de unión están acoplados pueden afectar recíprocamente la unión el uno del otro 171
Los agregados proteicos simétricos producen transiciones alostéricas cooperativas 172
La transición alostérica de la aspartato transcarbamilasa se conoce a nivel atómico 173
La fosforilación proteica dirige muchos de los cambios que presentan las proteínas 174
Las células eucariotas contienen una gran gama de proteínas quinasa y proteínas fosfatasa 176
La regulación de las proteínas quinasa Cdk y Src muestran de qué forma una proteína puede actuar como un microchip 177
Las proteínas que unen e hidrolizan GTP son reguladores celulares ubicuos 178
Otras proteínas reguladoras controlan la actividad de las proteínas que unen GTP y determinan cuándo unen GDP y cuándo GTP 179
Pequeñas moléculas pueden generar grandes movimientos 179
Las proteínas motoras producen grandes movimientos en las células 181
Los transportadores unidos a membrana utilizan energía para bombear moléculas a través de las membranas 182
A menudo las proteínas pueden formar grandes complejos que funcionan como máquinas proteicas 184
Las máquinas proteicas con partes intercambiables utilizan de forma eficiente la información genética 184
A menudo la activación de máquinas proteicas supone su posicionamiento en lugares determinados 185
Muchas proteínas están controladas por modificaciones covalentes en muchos lugares 187
Una compleja red de interacciones proteicas subyace tras la función celular 188
Resumen 190
Problemas 191
Bibliografía 193

Capítulo 4 DNA, cromosomas y genomas **195**

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL DNA 197
Una molécula de DNA está formada por dos cadenas complementarias de nucleótidos 197
La estructura del DNA explica el mecanismo de la herencia 199
En las células eucariotas, el DNA está confinado en el núcleo 200
Resumen 201

EL DNA CROMOSÓMICO Y SU EMPAQUETAMIENTO EN LA FIBRA DE CROMATINA 202
El DNA de la célula eucariota se empaqueta en un conjunto de cromosomas 202
Los cromosomas contienen largas tiras de genes 204
La secuencia de nucleótidos del genoma humano muestra cómo están organizados nuestros genes 205

La comparación del genoma revela secuencias de DNA conservadas evolutivamente 207
A lo largo de la vida de una célula los cromosomas adoptan diferentes estados 209
Cada molécula de DNA que forma un cromosoma lineal debe contener un centrómero, dos telómeros y orígenes de replicación 209
Las moléculas de DNA están altamente condensadas en los cromosomas 210
Los nucleosomas son una unidad básica de la estructura de la cromatina 211
La estructura de la partícula del núcleo del nucleosoma muestra cómo se empaqueta el DNA 212
Los nucleosomas tienen una estructura dinámica y con frecuencia están sujetos a cambios catalizados por complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP 215
Los nucleosomas suelen estar empaquetados juntos formando una fibra compacta de cromatina 216
Resumen 218

REGULACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA 219
Algunas incógnitas iniciales referentes a la estructura de la cromatina 220
La heterocromatina está muy organizada y habitualmente es resistente a la expresión génica 220
Las histonas del nucleosoma están modificadas covalentemente en muchos lugares 222
La cromatina adquiere variaciones adicionales a través de la inserción de un pequeño grupo de variantes de histonas en lugares específicos 224
Las modificaciones covalentes y las variantes de histonas actúan conjuntamente produciendo un "código de histonas" que ayuda a determinar la función biológica 224
Un complejo de proteínas lectoras y escritoras de código pueden distribuir modificaciones específicas en largas distancias de cromatina a lo largo de un cromosoma 226
Secuencias de DNA barrera bloquean la expansión de los complejos lector-escritor y separan dominios de cromatina vecinos 227
La cromatina de los centrómeros revela de qué forma las variantes de las histonas pueden generar estructuras especiales 228
Las estructuras de la cromatina se pueden heredar directamente 230
Las estructuras de la cromatina añaden características únicas a la función de los cromosomas de los eucariotas 231
Resumen 233

ESTRUCTURA GLOBAL DE LOS CROMOSOMAS 233
Los cromosomas están plegados formando largos bucles de cromatina 234
Los cromosomas politénicos sólo son útiles para visualizar las estructuras de la cromatina 236
Existen muchas formas de heterocromatina 238
Los bucles de cromatina se descondensan cuando se expresan los genes que contienen 239
La cromatina se puede desplazar a lugares específicos dentro del núcleo y modificar la expresión de los genes 239
Unas redes de macromoléculas forman un conjunto de diferentes ambientes bioquímicos en el interior del núcleo 241
Los cromosomas mitóticos están constituidos por cromatina en su forma más condensada 243
Resumen 245

CÓMO EVOLUCIONAN LOS GENOMAS 245
Errores en los mecanismos normales de copia y mantenimiento del DNA provocan alteraciones del genoma 246
Las secuencias de los genomas de dos especies difieren de forma proporcional al tiempo durante el cual han evolucionado por separado 247
Los árboles filogenéticos construidos a partir de la comparación de secuencias de DNA trazan las relaciones entre todos los organismos 248
Comparando los cromosomas de humanos y de ratones se observa de qué manera divergen las estructuras de los genomas 249
El tamaño del genoma de un vertebrado refleja las velocidades relativas de adición y pérdida de DNA de un linaje 251
Podemos reconstruir la secuencia de algunos genomas antiguos 251
La comparación de secuencias de muchas especies identifica secuencias importantes de DNA de función desconocida 252
Los cambios acelerados producidos en secuencias que previamente eran conservadas pueden ayudar a descifrar los pasos críticos de la evolución humana 253
La duplicación génica constituye una importante fuente de novedad genética durante la evolución 254
Los genes duplicados divergen 255
La evolución de la familia génica de la globina muestra cómo las duplicaciones del DNA contribuyen a la evolución de los organismos 256
La recombinación de exones puede dar lugar a genes que codifiquen nuevas proteínas 257
Para que las mutaciones neutras lleguen a ser fijadas, frecuentemente se diseminan por la población; la probabilidad depende del tamaño de la población 257
Se pueden aprender muchas cosas a partir del análisis de la variación entre los humanos 258
Resumen 260
Problemas 260
Bibliografía 262

Capítulo 5 Replicación, reparación y recombinación del DNA **263**

EL MANTENIMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE DNA 263
Las frecuencias de mutación son extremadamente bajas 263
Para que exista la vida tal como la conocemos son necesarias bajas frecuencias de mutación 265
Resumen 265

MECANISMOS DE REPLICACIÓN DEL DNA 266
El apareamiento de bases es la esencia de la replicación y de la reparación del DNA 266
La horquilla de replicación del DNA es asimétrica 266
El elevado grado de fidelidad del mecanismo de replicación del DNA requiere la existencia de un mecanismo de "corrección de pruebas" 268
Sólo la replicación del DNA en sentido 5' a 3' permite la existencia de un proceso eficiente de corrección de errores 271
Una enzima especial que polimeriza nucleótidos sintetiza moléculas cebadoras de RNA cortas sobre la cadena retrasada 272
Unas proteínas especiales ayudan a abrir la doble hélice del DNA por delante de la horquilla de replicación 273
Una abrazadera deslizante mantiene unida al DNA una molécula de DNA polimerasa móvil 273
En la horquilla de replicación, una serie de proteínas cooperan entre sí formando una "maquinaria de replicación" 276
Un sistema de corrección de errores de apareamiento elimina los errores de replicación producidos por la maquinaria de replicación 277
Las DNA topoisomerasas evitan que el DNA se enrede durante la replicación 278
La replicación del DNA en los eucariotas es básicamente similar a la de los procariotas 280
Resumen 281

INICIACIÓN Y TERMINACIÓN DE LA REPLICACIÓN DE DNA EN LOS CROMOSOMAS 281
La síntesis de DNA empieza en los orígenes de replicación 281
Los cromosomas bacterianos normalmente tienen un solo origen de replicación del DNA 282
Los cromosomas de células eucariotas tienen varios orígenes de replicación 282
En eucariotas la replicación de DNA sólo tiene lugar durante una parte del ciclo celular 284
En la fase S se replican distintas regiones de un mismo cromosoma a distintos tiempos 285
La cromatina altamente condensada se replica de forma tardía, mientras que los genes presentes en la cromatina menos condensada tienden a replicarse antes 285
Unas secuencias bien definidas de DNA actúan como origen de replicación en eucariotas sencillos como la levadura 286
En los orígenes de replicación de eucariotas se unen grandes complejos formados por muchas subunidades 287
Dificultad para identificar las secuencias de DNA que especifican el inicio de la replicación en mamíferos 288
Detrás de la horquilla de replicación se ensamblan nuevos nucleosomas 289
Los mecanismos de duplicación cromosómica en eucariotas aseguran que los patrones de modificación de histonas se puedan heredar 290
La telomerasa replica los extremos de los cromosomas 292

Las células y los organismos regulan la longitud del telómero 293
Resumen 294

REPARACIÓN DEL DNA 295
Si no fueran corregidas, las alteraciones espontáneas del DNA podrían cambiar rápidamente las secuencias del DNA 296
La doble hélice de DNA es reparada con rapidez 296
Las alteraciones del DNA pueden ser eliminadas por más de una vía 297
El acoplamiento de la reparación del DNA a la transcripción asegura que el DNA más importante de la célula se repara de forma eficiente 299
Las propiedades químicas de las bases del DNA facilitan la detección de las alteraciones 300
Se utilizan DNA polimerasas especiales para reparar el DNA en casos de emergencia 302
Las roturas en la doble cadena son reparadas de forma eficiente 302
Las alteraciones del DNA retrasan la progresión del ciclo celular 303
Resumen 304

RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA 304
La recombinación homóloga tiene muchas utilidades en la célula 304
La recombinación homóloga tiene características comunes en todas las células 305
El apareamiento de bases de DNA guía la recombinación homóloga 305
La proteína RecA y sus homólogas permiten que una molécula de una sola cadena de DNA se aparee con una región homóloga de una doble hélice 306
La migración de cadenas puede alargar las regiones de heterodúplex o dejar el DNA de nueva síntesis como DNA de cadena sencilla 308
La recombinación homóloga puede reparar de forma perfecta roturas en la doble cadena del DNA 308
Las células regulan estrechamente la utilización de la recombinación homóloga en la reparación del DNA 310
Las uniones tipo Holliday a menudo se forman durante las recombinaciones homólogas 311
La recombinación meiótica empieza con una rotura programada de la doble cadena 312
La recombinación homóloga genera a menudo una conversión génica 314
La corrección de errores de apareamiento evita la recombinación promiscua entre dos secuencias de DNA mal apareadas 315
Resumen 316

TRANSPOSICIÓN Y RECOMBINACIÓN CONSERVATIVA ESPECÍFICA DE LUGAR 316
Los elementos genéticos móviles se pueden insertar en cualquier secuencia de DNA mediante transposición 317
Los transposones sólo de DNA se desplazan mediante mecanismos de corte y unión y mecanismos replicativos 317
Algunos virus utilizan mecanismos de transposición para desplazarse a cromosomas de la célula huésped 319
Los retrotransposones retrovirales se parecen a los retrovirus, pero no tienen proteína de cubierta 320
Una gran proporción del genoma humano está compuesto de retrotransposones no retrovirales 321
En distintos organismos predominan distintos elementos transponibles 322
La secuenciación del genoma permite conocer aproximadamente cuándo se han desplazado los elementos transponibles 323
La recombinación conservativa específica de lugar puede reordenar el DNA de forma reversible 323
La recombinación conservativa específica de lugar fue descubierta en el bacteriófago λ 324
La recombinación conservativa específica de lugar se utiliza para activar o desactivar genes 324
Resumen 326
Problemas 327
Bibliografía 328

Capítulo 6 Cómo leen las células el genoma: del DNA a la proteína **329**

DEL DNA AL RNA 331
Fragmentos de la secuencia de DNA se transcriben a RNA 332
La transcripción genera un RNA complementario a una hebra del DNA 333
Las células fabrican varios tipos de RNA 335
En el DNA hay señales codificadas que le indican a la RNA polimerasa dónde empezar y dónde acabar 336
Las señales de inicio y final de la transcripción tienen secuencias de nucleótidos heterogéneas 338
En las células eucariotas, el inicio de la transcripción requiere muchas proteínas 339
La RNA polimerasa II necesita los factores generales de transcripción 340
La polimerasa II también requiere proteínas activadoras, mediadoras y modificadoras de la cromatina 342
La elongación de la transcripción produce una tensión superhelicoidal en el DNA 343
La elongación de la transcripción en eucariotas está estrechamente acoplada al procesamiento del RNA 345
La adición de la caperuza es la primera modificación de los pre-mRNA eucariotas 346
La maduración del RNA elimina los intrones de los pre-mRNA recién transcritos 347
La secuencia de nucleótidos indica dónde se tiene que producir el corte 348
El espliceosoma lleva a cabo la maduración (splicing) del RNA 349
El espliceosoma utiliza la hidrólisis del ATP para provocar una compleja serie de reordenamientos RNA-RNA 351
Otras propiedades del pre-mRNA y de su síntesis ayudan a explicar cómo se escogen de forma correcta los sitios de maduración 352
Un segundo conjunto de snRNP procesa una pequeña fracción de secuencias intrónicas en animales y plantas 353
La maduración (ayuste) del RNA muestra una notable plasticidad 354
Probablemente la maduración de RNA catalizada por el espliceosoma evolucionó a partir de mecanismos de automaduración 355
Unas enzimas procesadoras del RNA generan el extremo 3' de los mRNA eucariotas 356
Los mRNA maduros de los organismos eucariotas son exportados selectivamente desde el núcleo 358
En el núcleo también se sintetizan y procesan muchos RNA no codificadores 360
El nucleolo es una factoría de producción de ribosomas 361
El núcleo contiene varias estructuras subnucleares 363
Resumen 366

DEL RNA A LA PROTEÍNA 366
La secuencia del mRNA es descodificada en grupos de tres nucleótidos 367
Las moléculas de tRNA aparean los aminoácidos con los codones del mRNA 368
Los tRNA son modificados covalentemente antes de salir del núcleo 369
Unas enzimas específicas acoplan cada aminoácido con la molécula de tRNA apropiada 370
La edición mediante RNA sintetasas asegura la precisión 371
Los aminoácidos se añaden al extremo C-terminal de la cadena polipeptídica en crecimiento 373
El mensaje del RNA es descodificado en los ribosomas 373
Los factores de elongación impulsan la traducción y mejoran su precisión 377
El ribosoma es una ribozima 378
Unas secuencias de nucleótidos del mRNA indican dónde debe empezar la síntesis de las proteínas 379
Los codones de paro marcan el fin de la traducción 381
Las proteínas se fabrican en los polirribosomas 381
Existen pequeñas variaciones del código genético estándar 382
Muchos inhibidores de la síntesis de proteínas en procariotas resultan útiles como antibióticos 383
La precisión del proceso de traducción requiere el gasto de energía libre 385
Los mecanismos de control de calidad previenen la traducción de mRNA dañados 385
Algunas proteínas comienzan a plegarse cuando aún están siendo sintetizadas 387
Las chaperonas moleculares ayudan a guiar el plegamiento de la mayoría de las proteínas 388
Las regiones hidrofóbicas de la proteína que quedan expuestas proporcionan señales críticas para el control de calidad de la proteína 391
El proteosoma es una proteasa compartimentada con lugares activos secuestrados 392
Un elaborado sistema de conjugación con ubiquitina señala las proteínas que deben ser destruidas 393
Muchas proteínas se controlan mediante la regulación de su destrucción 395
Las proteínas plegadas de forma anormal pueden formar agregados que causan graves enfermedades humanas 396

Entre el DNA y las proteínas existen muchas etapas 399
Resumen 400

EL MUNDO DE RNA Y EL ORIGEN DE LA VIDA 400

La vida requiere información almacenada 401
Los polinucleótidos pueden almacenar información y catalizar reacciones químicas 401
Un mundo de pre-RNA pudo depredar el mundo de RNA 402
Las moléculas de RNA de cadena sencilla se pueden plegar formando estructuras altamente elaboradas 403
Las moléculas autorreplicantes pueden estar sometidas a selección natural 404
¿Cómo evolucionó la síntesis de proteínas? 406
Todas las células actuales utilizan DNA como material hereditario 408
Resumen 408
Problemas 409
Bibliografía 410

Capítulo 7 El control de la expresión génica 411

INTRODUCCIÓN AL CONTROL GÉNICO 411

Los distintos tipos celulares de un organismo pluricelular contienen el mismo DNA 411
Distintos tipos celulares sintetizan distintos conjuntos de proteínas 412
Determinadas señales externas pueden provocar que una célula cambie la expresión de sus genes 413
La expresión génica se puede regular en muchas de las etapas de la vía que conduce desde el DNA al RNA y a las proteínas 415
Resumen 415

MOTIVOS ESTRUCTURALES DE UNIÓN A DNA EN LAS PROTEÍNAS DE REGULACIÓN GÉNICA 416

Las proteínas de regulación génica se descubrieron mediante técnicas de genética bacteriana 416
El exterior de la hélice de DNA puede ser leído por proteínas 416
Secuencias cortas de DNA son componentes fundamentales de los interruptores genéticos 418
Las proteínas de regulación génica contienen motivos estructurales que pueden leer secuencias de DNA 418
El motivo hélice-giro-hélice es uno de los motivos de unión a DNA más sencillos y habituales 419
Las proteínas de homeodominios son una clase especial de proteínas hélice-giro-hélice 420
Existen algunos tipos de motivos de unión a DNA en forma de dedos de zinc 421
Las láminas β también pueden reconocer el DNA 422
Algunas proteínas, para reconocer el DNA, utilizan bucles que penetran en los surcos mayor y menor 423
El motivo "cremallera de leucina" está implicado tanto en el reconocimiento del DNA como en la dimerización 423
La heterodimerización amplía el repertorio de secuencias de DNA que las proteínas de regulación génica pueden reconocer 424
El motivo hélice-bucle-hélice también está implicado en la dimerización y en la unión al DNA 425
Aún no es posible predecir la secuencia de DNA que es reconocida por una proteína reguladora 426
Un ensayo de movilidad en gel detecta con gran facilidad proteínas que se unen a una secuencia específica de DNA 427
La cromatografía de afinidad de DNA facilita la purificación de proteínas de unión a secuencias específicas de DNA 428
La secuencia de DNA reconocida por una proteína de regulación génica puede ser determinada de forma experimental 429
La huella filogenética identifica secuencias reguladoras del DNA mediante la genómica comparativa 431
La inmunoprecipitación de la cromatina identifica muchos de los sitios que ocupan en las células vivas las proteínas reguladoras de genes 431
Resumen 432

CÓMO FUNCIONAN LOS INTERRUPTORES GENÉTICOS 432

El represor de triptófano es un interruptor sencillo que activa y desactiva genes en bacterias 433
Los activadores transcripcionales activan los genes 435
Un activador transcripcional y un represor transcripcional controlan el operón *Lac* 435
Durante la regulación génica en bacterias tiene lugar la formación de bucles de DNA 436
Las bacterias utilizan subunidades intercambiables de la RNA polimerasa que colaboran en el control de la transcripción génica 438
Algunos interruptores complejos han evolucionado controlando la transcripción génica en eucariotas 439
Una región de control eucariota está formada por un promotor y por las secuencias de DNA reguladoras 440
Las proteínas activadoras de genes eucariotas facilitan el ensamblaje de la RNA polimerasa y de los factores generales de transcripción en el lugar de inicio de la transcripción 441
Las proteínas activadoras de genes eucariotas también modifican la estructura local de la cromatina 442
Las proteínas activadoras de genes actúan de forma sinérgica 444
Las proteínas represoras de genes eucariotas pueden inhibir la transcripción de diferentes formas 445
Las proteínas reguladoras de genes de células eucariotas frecuentemente se unen de forma cooperativa al DNA 445
Los interruptores genéticos complejos que regulan el desarrollo de *Drosophila* están formados por módulos menores 447
El gen *Eve* de *Drosophila* está regulado por controles combinatorios 448
En mamíferos, las regiones de control también están formadas a partir de módulos reguladores sencillos 449
Los aislantes son secuencias de DNA que impiden que las proteínas reguladoras de genes eucariotas afecten a genes distantes 452
Los interruptores genéticos han evolucionado de forma rápida 453
Resumen 453

MECANISMOS GENÉTICOS MOLECULARES QUE ORIGINAN TIPOS CELULARES ESPECIALIZADOS 453

Los cambios de fase de las bacterias son provocadas por reorganizaciones del DNA 454
En las levaduras de gemación, un conjunto de proteínas reguladoras génicas determina el tipo celular 455
Dos proteínas que reprimen mutuamente su síntesis, determinan el estado heredable del bacteriófago lambda 456
Mediante circuitos de regulación génica sencilla se pueden construir mecanismos de memoria 458
Los circuitos de transcripción permiten que la célula lleve a cabo operaciones lógicas 458
La biología sintética da lugar a nuevos dispositivos a partir de partes biológicas ya existentes 460
Los relojes circadianos se basan en circuitos de retroalimentación de la regulación génica 460
Una sola proteína de regulación génica puede coordinar la expresión de un conjunto de genes 462
La expresión de una proteína reguladora crítica puede disparar la expresión de una batería de genes situados corriente abajo 463
El control génico combinatorio da lugar a muchos tipos celulares distintos en los organismos eucariotas 464
Una sola proteína reguladora puede dar lugar a la formación de un órgano completo 465
Cuando las células de vertebrados se dividen, pueden heredar el patrón de metilación del DNA 467
La impronta genómica se basa en la metilación del DNA 468
En los mamíferos, las islas ricas en CG se asocian con muchos genes 470
Los mecanismos epigenéticos aseguran que se puedan transmitir patrones estables de expresión génica a células hijas 471
Pueden heredarse grandes alteraciones cromosómicas en la estructura de la cromatina 473
El control de la expresión génica es intrínsecamente ruidoso 475
Resumen 477

CONTROLES POSTRANSCRIPCIONALES 477

La atenuación de la transcripción provoca la finalización prematura de algunas moléculas de RNA 477
Los interruptores ribosómicos pueden representar antiguas formas de control génico 478
La maduración alternativa del RNA puede producir diferentes formas de proteína a partir de un mismo gen 479
La definición de gen ha tenido que ser modificada debido al descubrimiento de la maduración alternativa del RNA 480
La determinación del sexo en *Drosophila* depende de una serie de procesos de maduración alternativa regulada del RNA 481
Un cambio en el punto de rotura del transcrito de RNA y la adición de poli-A puede cambiar el extremo carboxilo terminal de una proteína 481
La edición del RNA puede cambiar el sentido del mensaje del RNA 482

El transporte de RNA desde el núcleo puede estar regulado 485
Algunos mRNA se localizan en regiones concretas del citoplasma 486
Las regiones 5' y 3' no traducidas de los mRNA controlan su traducción 487
La fosforilación de un factor de iniciación regula globalmente la síntesis de proteínas 488
En organismos eucariotas, la iniciación en codones AUG situados corriente arriba respecto al punto de comienzo de la traducción puede regular el inicio de la traducción 488
Los sitios internos de entrada de los ribosomas generan posibilidades de control traduccional 490
Cambios en la estabilidad del mRNA regulan la expresión génica 491
La adición citoplasmática de poli-A puede regular la traducción 492
Transcritos pequeños de RNA no codificante regulan muchos genes de animales y plantas 493
El RNA de interferencia es un mecanismo de defensa de la célula 495
El RNA de interferencia dirige la formación de heterocromatina 495
El RNA de interferencia es una herramienta experimental potente 496
Resumen 497
Problemas 497
Bibliografía 499

Capítulo 8 Manipulación de proteínas, DNA y RNA 501

AISLAMIENTO Y CRECIMIENTO DE CÉLULAS EN CULTIVO 501
Las células pueden ser aisladas a partir de tejidos intactos 502
Las células pueden hacerse crecer en una placa de cultivo 502
Las líneas celulares eucariotas son una fuente muy utilizada para la obtención de células homogéneas 505
Las células madre embrionarias podrían revolucionar la medicina 505
El trasplante del núcleo de células somáticas puede ser un mecanismo para generar células madre personalizadas 507
Las líneas celulares de hibridomas son fábricas que producen anticuerpos monoclonales 508
Resumen 510

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS 510
Las células pueden separarse en sus distintos componentes 510
Los extractos celulares proporcionan sistemas útiles para el estudio de las funciones celulares 511
Las proteínas pueden separarse mediante cromatografía 512
La cromatografía de afinidad aprovecha lugares de unión específicos de las proteínas 513
Marcas diseñadas genéticamente proporcionan una manera fácil para purificar proteínas 514
Se requieren sistemas libres de células para estudiar de forma precisa las funciones moleculares 516
Resumen 516

ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS 517
Las proteínas pueden separarse mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS 517
La hibridación con anticuerpos permite detectar proteínas de forma específica 517
La espectrometría de masas es un método muy sensible para la identificación de proteínas no identificadas 518
Los métodos de separación bidimensionales son especialmente potentes 521
Las medidas hidrodinámicas revelan el tamaño y la forma de un complejo proteico 522
Se pueden identificar grupos de proteínas que interaccionan entre sí mediante métodos bioquímicos 523
Las interacciones proteína-proteína también pueden ser identificadas en levaduras mediante la técnica de los híbridos dobles 523
La combinación de datos obtenidos mediante diferentes técnicas produce mapas fiables de interacción proteica 524
Los métodos ópticos pueden seguir interacciones proteicas en tiempo real 524
Algunas técnicas permiten analizar moléculas individuales 526
La función de una proteína puede ser eliminada selectivamente con pequeñas moléculas 527
La estructura proteica se determina utilizando difracción de rayos X 527
La estructura proteica se puede determinar en solución utilizando espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) 529
La secuencia proteica y la estructura proporcionan pistas sobre la función de las proteínas 530
Resumen 531

ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DEL DNA 532
Las nucleasas de restricción cortan en fragmentos las largas moléculas de DNA 532
Las moléculas de DNA de diferentes tamaños pueden separarse mediante la electroforesis en gel 534
Las moléculas purificadas de DNA se pueden marcar *in vitro* con radioisótopos o con marcadores químicos 535
La hibridación de ácidos nucleicos proporciona un método sensible para la detección de secuencias determinadas de nucleótidos 535
Las transferencias de tipo Northern y de tipo Southern facilitan la hibridación con moléculas de ácidos nucleicos separadas por electroforesis 538
Los genes se pueden clonar utilizando bibliotecas de DNA 540
Dos tipos de bibliotecas de DNA cubren diferentes propósitos 542
Los clones cDNA contienen secuencias codificantes continuas 544
Los genes pueden ser amplificados selectivamente mediante una reacción de polimerización en cadena (PCR) 544
Las células se utilizan como fábricas para producir proteínas específicamente 546
Algunas proteínas y ácidos nucleicos se sintetizan directamente por reacciones químicas 548
El DNA puede ser secuenciado rápidamente 549
Las secuencias de nucleótidos se utilizan para predecir las secuencias de aminoácidos de las proteínas 549
Se han secuenciado por completo los genomas de muchos organismos 551
Resumen 552

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y LA FUNCIÓN DE LOS GENES 553
La aproximación clásica empieza con la mutagénesis aleatoria 553
Las exploraciones genéticas identifican mutantes con anormalidades específicas 556
Las mutaciones pueden causar la pérdida o la ganancia de una función proteica 558
Una prueba de complementación indica si dos mutaciones se encuentran en un mismo gen o en genes diferentes 558
Los genes pueden ser ordenados en vías mediante un análisis epistásico 559
Los genes que contienen mutaciones se pueden clonar 559
La genética humana presenta problemas y oportunidades especiales 560
Los genes humanos se heredan en bloques haplotípicos que pueden facilitar la búsqueda de mutaciones que causen enfermedades 560
Múltiples genes influencian los rasgos complejos 563
La genética inversa empieza con un gen conocido y determina qué proceso celular necesita su función 563
Los genes se modifican de diferentes maneras 564
Los genes modificados se pueden insertar en la línea germinal de muchos organismos 565
Los animales pueden ser alterados genéticamente 566
Las plantas transgénicas son importantes tanto para la biología celular como para la agricultura 568
Las grandes colecciones de animales nulos *(knockouts)* marcados proporcionan una herramienta para el análisis de la función de cada uno de los genes de un organismo 569
El RNA de interferencia es una manera sencilla y rápida de estudiar la función génica 571
Los genes marcadores y la hibridación *in situ* revelan dónde y cuándo se expresa un gen 572
La expresión de genes individuales se puede medir utilizando RT-PCR cuantitativa 573
Los microchips de DNA permiten estudiar simultáneamente la expresión de miles de genes 574
El análisis de la expresión génica de una célula revela el "ruido biológico" 575
Resumen 576
Problemas 576
Bibliografía 578

Capítulo 9 Observar las células 579

ESTUDIAR LA ESTRUCTURA DE LAS CÉLULAS CON EL MICROSCOPIO ÓPTICO 579
El microscopio óptico puede resolver detalles situados a 0,2 μm de distancia 580

Las células vivas se pueden observar con nitidez con un microscopio de contraste de fases o de contraste de fases interferencial 583
Mediante técnicas digitales las imágenes pueden ser amplificadas y analizadas 583
Para ser observados al microscopio, los tejidos intactos son fijados y seccionados 584
Mediante la microscopia de fluorescencia se pueden localizar moléculas determinadas en las células 585
Se pueden utilizar anticuerpos para detectar determinadas moléculas 587
Es posible obtener imágenes de objetos tridimensionales complejos mediante la microscopia óptica 589
El microscopio confocal produce secciones ópticas, eliminando la luz que queda fuera de foco 590
Las proteínas fluorescentes se pueden utilizar para marcar proteínas individuales en células y organismos vivos 592
La dinámica de las proteínas se puede seguir en células vivas 593
Indicadores que emiten luz pueden medir concentraciones intracelulares de iones que cambian con rapidez 595
Existen diferentes sistemas que permiten introducir en una célula moléculas para las que la membrana celular sea impermeable 597
La luz se puede utilizar tanto para ver objetos microscópicos como para manipularlos 598
Se pueden visualizar moléculas individuales utilizando microscopia fluorescente de reflexión interna total 599
Las moléculas individuales se pueden tocar y desplazar utilizando la microscopia de fuerza atómica 599
Las moléculas se pueden marcar con radioisótopos 600
Los radioisótopos se utilizan para seguir la pista de moléculas tanto en las células como en los organismos 601
Resumen 603

OBSERVACIÓN DE CÉLULAS Y MOLÉCULAS CON EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO 604

El microscopio electrónico resuelve la estructura fina de la célula 604
Para poder ser estudiadas con el microscopio electrónico, las muestras biológicas requieren una preparación especial 605
Las macromoléculas pueden ser inmunolocalizadas de forma específica con partículas de oro coloidal, gracias a la microscopia electrónica 606
Mediante la microscopia electrónica de barrido se pueden obtener imágenes de superficies 607
El sombreado metálico permite el examen de detalles superficiales a alta resolución mediante el microscopio electrónico de transmisión 608
Tanto la tinción negativa como la microscopía crioelectrónica permiten observar macromoléculas a alta resolución 610
Para incrementar la resolución se pueden combinar múltiples imágenes 610
Imágenes de un mismo objeto tomadas desde distintas direcciones se pueden combinar para dar lugar a una reconstrucción tridimensional 612
Resumen 612
Problemas 614
Bibliografía 615

Capítulo 10 Estructura de la membrana 617

LA BICAPA LIPÍDICA 617

Los fosfoglicéridos, los esfingolípidos y los esteroles son los principales lípidos de las membranas celulares 618
Los fosfolípidos forman bicapas de forma espontánea 620
La bicapa lipídica es un fluido bidimensional 621
La fluidez de una bicapa lipídica depende de su composición 622
A pesar de su fluidez, las bicapas lipídicas pueden formar dominios de composición diferente 624
Las gotas lipídicas están envueltas por una monocapa de fosfolípidos 625
La asimetría de la bicapa lipídica es importante para su función 626
En la superficie de todas las membranas plasmáticas hay glucolípidos 628
Resumen 629

PROTEÍNAS DE MEMBRANA 629

Las proteínas de membrana se asocian a la bicapa lipídica de varias maneras 629
Los anclajes lipídicos controlan la localización en la membrana de algunas proteínas señalizadoras 630
En la mayoría de las proteínas transmembrana, las regiones de la cadena polipeptídica que atraviesan la bicapa lipídica presentan una conformación en hélice α 631
A menudo las hélices α transmembrana interactúan entre sí 632
Algunos barriles β forman grandes canales transmembrana 634
Muchas proteínas de membrana están glucosiladas 635
Las proteínas de membrana pueden ser solubilizadas y purificadas mediante detergentes 636
La bacteriorrodopsina es una bomba de protones conducida por la luz, que atraviesa la bicapa en forma de siete hélices α 640
Con frecuencia las proteínas de membrana actúan en forma de grandes complejos 642
Muchas proteínas de membrana difunden en el plano de la membrana 642
Las células pueden confinar a lípidos y a proteínas en dominios específicos de la membrana 645
El citoesqueleto cortical proporciona a la membrana fuerza mecánica y restringe la difusión de las proteínas de membrana 646
Resumen 648
Problemas 648
Bibliografía 650

Capítulo 11 Transporte de moléculas pequeñas a través de la membrana y las propiedades eléctricas de las membranas 651

PRINCIPIOS DEL TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA MEMBRANA 651

Las bicapas lipídicas libres de proteína tienen un alto grado de impermeabilidad a los iones 652
Existen dos clases principales de proteínas de transporte a través de la membrana: transportadores y canales 652
El transporte activo está mediado por transportadores acoplados a una fuente energética 653
Resumen 654

TRANSPORTADORES Y TRANSPORTE ACTIVO A TRAVÉS DE LA MEMBRANA 655

El transporte activo puede ser dirigido por gradientes iónicos 656
Los transportadores de la membrana plasmática regulan el pH citosólico 657
En las células epiteliales, la distribución asimétrica de transportadores permite el transporte transcelular de solutos 658
Existen tres clases de bombas impulsadas por ATP 659
La bomba de Ca^{2+} es la ATPasa mejor conocida 660
La bomba de Na^+/K^+ de tipo P de la membrana plasmática establece el gradiente de Na^+ a través de la membrana plasmática 661
Los transportadores ABC constituyen la mayor familia de proteínas de transporte de membrana 665
Resumen 667

CANALES IÓNICOS Y PROPIEDADES ELÉCTRICAS DE LAS MEMBRANAS 667

Los canales iónicos son selectivos para el ion transportado y fluctúan entre estados abiertos y cerrados 668
El potencial de membrana en las células animales depende principalmente de los canales de fuga de K^+ y del gradiente de K^+ a través de la membrana plasmática 669
Cuando se detiene la bomba Na^+/K^+, el potencial de reposo sólo decae levemente 671
La estructura tridimensional de un canal bacteriano de K^+ muestra cómo funciona un canal iónico 672
Las acuaporinas son permeables al agua pero impermeables a los iones 674
La función de una neurona depende de su estructura alargada 675
Los canales catiónicos regulados por voltaje generan potenciales de acción en las células excitables eléctricamente 676
La mielinización incrementa la velocidad y la eficiencia de propagación del potencial de acción en las células nerviosas 680
El registro de zona indica que cada uno de los canales de Na^+ se abre siguiendo la ley del todo o nada 680
Los canales catiónicos regulados por voltaje están relacionados evolutiva y estructuralmente 682
En las sinapsis químicas, los canales iónicos regulados por transmisores convierten las señales químicas en señales eléctricas 682
Las sinapsis químicas pueden ser excitadoras o inhibidoras 684
Los receptores de acetilcolina de las uniones neuromusculares son canales catiónicos regulados por transmisores 684

Los canales iónicos regulados por transmisores son las dianas principales de los fármacos psicoactivos 686
La transmisión neuromuscular implica la activación secuencial de cinco grupos diferentes de canales iónicos 687
Cada neurona es un complejo sistema de integración 688
La integración neuronal requiere la combinación de por lo menos tres clases de canales de K^+ 689
La potenciación a largo plazo en el hipocampo de los mamíferos depende de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de los receptores de NMDA 690
Resumen 692
Problemas 693
Bibliografía 694

Capítulo 12 Compartimientos intracelulares y clasificación de proteínas 695

LA COMPARTIMENTACIÓN DE LAS CÉLULAS 695
Todas las células eucariotas tienen la misma dotación básica de orgánulos rodeados de membrana 695
Los orígenes evolutivos explican las relaciones topológicas de los orgánulos 697
Las proteínas pueden desplazarse entre compartimientos de diferentes maneras 699
Las secuencias señal dirigen a las proteínas a su destino celular correcto 701
La mayoría de los orgánulos no se pueden construir *de novo*: necesitan información del propio orgánulo 702
Resumen 704

TRANSPORTE DE MOLÉCULAS ENTRE EL NÚCLEO Y EL CITOSOL 704
Los complejos de poro nuclear atraviesan la envoltura nuclear 705
Las proteínas nucleares son dirigidas hacia el núcleo mediante señales de localización nuclear 705
Los receptores de importación nuclear se unen tanto a señales de localización nuclear como a proteínas NPC 707
La exportación del núcleo funciona como la importación, pero en el sentido opuesto 708
La GTPasa Ran impone una direccionalidad en el transporte a través de los NPC 708
El transporte a través de los NPC se regula controlando el acceso a la maquinaria transportadora 709
La envoltura nuclear se desorganiza durante la mitosis 711
Resumen 712

TRANSPORTE DE PROTEÍNAS AL INTERIOR DE MITOCONDRIAS Y DE CLOROPLASTOS 713
La translocación a la matriz mitocondrial depende de una secuencia señal y de translocadores de proteínas 713
Los precursores de las proteínas mitocondriales son importados como cadenas polipeptídicas desplegadas 715
La hidrólisis de ATP y el potencial de membrana dirigen la importación de proteínas al espacio de la matriz 716
Las bacterias y las mitocondrias utilizan mecanismos similares para insertar porinas en su membrana externa 717
El transporte a la membrana mitocondrial interna y al espacio intermembrana mitocondrial se produce a través de varias vías 718
Dos secuencias señal dirigen las proteínas a la membrana tilacoidal de los cloroplastos 719
Resumen 720

PEROXISOMAS 720
Los peroxisomas utilizan el oxígeno molecular y el peróxido de hidrógeno para realizar reacciones de oxidación 721
Una corta secuencia señal dirige la importación de proteínas hacia los peroxisomas 722
Resumen 723

RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO 723
El ER es estructural y funcionalmente diverso 724
Las secuencias señal fueron descubiertas en proteínas importadas al ER rugoso 727
Una partícula de reconocimiento de señal (SRP) dirige los péptidos señal de ER a un receptor específico de la membrana del ER 727
La cadena polipeptídica pasa a través de un poro acuoso del aparato de translocación 730
La translocación a través de la membrana del ER no siempre requiere que se esté produciendo el crecimiento de la cadena polipeptídica 731
En las proteínas transmembrana de paso único, queda una sola secuencia señal interna de ER en la bicapa lipídica, que adopta la forma de hélice α y atraviesa la membrana 732
Combinaciones de señales de inicio y de paro de translocación determinan la topología de las proteínas transmembrana de paso múltiple 734
Las cadenas polipeptídicas translocadas se pliegan y se ensamblan en el lumen del ER rugoso 736
La mayoría de proteínas sintetizadas en el ER rugoso son glucosiladas por la adición de un oligosacárido común unido a *N* 736
Los oligosacáridos actúan como etiquetas que marcan el estado del plegamiento de las proteínas 738
Las proteínas mal plegadas son exportadas desde el ER y degradadas en el citosol 739
Las proteínas mal plegadas en el ER activan una respuesta a proteínas desplegadas 740
Algunas proteínas de membrana adquieren un anclaje covalentemente a glucosilfosfatidilinositol (GPI) 742
La mayoría de las bicapas lipídicas de membrana son ensambladas en el ER 742
Resumen 745
Problemas 745
Bibliografía 748

Capítulo 13 Tráfico vesicular intracelular 749

MECANISMOS MOLECULARES DE TRANSPORTE DE MEMBRANA Y DE MANTENIMIENTO DE LA DIVERSIDAD DE LOS COMPARTIMIENTOS 750
Hay varios tipos de vesículas recubiertas 751
El ensamblaje de la cubierta de clatrina controla la formación de vesículas 751
No todas las cubiertas forman estructuras de tipo cesta 755
Los fosfoinositoles como marcadores de orgánulos y de dominios de membrana 756
La separación de la vesícula y el desprendimiento de la cubierta son regulados por proteínas citosólicas 757
Unas GTPasas monoméricas controlan el ensamblaje de la cubierta 758
No todas las vesículas de transporte son esféricas 760
Las proteínas Rab guían el direccionamiento de las vesículas 760
Las proteínas SNARE participan en el proceso de fusión 762
Las SNARE unidas tienen que ser separadas antes de volver a ser usadas 764
Las proteínas de fusión virales y las SNARE pueden utilizar mecanismos de fusión similares 764
Resumen 766

TRANSPORTE DESDE EL ER A TRAVÉS DEL COMPLEJO DE GOLGI 766
Las proteínas abandonan el ER en vesículas de transporte recubiertas de COPII 767
Sólo pueden abandonar el ER las proteínas que están correctamente plegadas y ensambladas 768
Agregados túbulo-vesiculares realizan el transporte desde el ER hasta el complejo de Golgi 768
La vía de recuperación del ER utiliza señales de clasificación 770
Muchas proteínas son retenidas selectivamente en el compartimiento en el que actúan 771
El complejo de Golgi está formado por una serie de compartimientos ordenados 772
Las cadenas de oligosacáridos son procesadas en el complejo de Golgi 774
Los proteoglucanos se ensamblan en el complejo de Golgi 775
¿Cuál es el propósito de la glucosilación? 776
El transporte a través del complejo de Golgi se lleva a cabo mediante transporte vesicular o maduración de cisternas 777
Las proteínas de la matriz del complejo de Golgi organizan el dictiosoma 779
Resumen 779

TRANSPORTE DESDE LA RED DEL *TRANS* GOLGI A LOS LISOSOMAS 779
Los lisosomas son el lugar principal de digestión intracelular 780
Los lisosomas son heterogéneos 780
Las vacuolas de las plantas y de los hongos son lisosomas muy versátiles 781
Varias vías aportan materiales a los lisosomas 782
Un receptor de manosa 6-fosfato reconoce las proteínas lisosómicas en la red del *trans* Golgi 783

El receptor M6P viaja como una lanzadera entre determinadas membranas 784
Una región señal en la cadena polipeptídica proporciona la clave para la unión de M6P 785
En humanos, los defectos en la GlcNAc fosfotransferasa causan una enfermedad de acumulación lisosómica 785
Algunos lisosomas son exocitados 786
Resumen 786

TRANSPORTE HACIA EL INTERIOR DE LA CÉLULA DESDE LA MEMBRANA PLASMÁTICA: ENDOCITOSIS 787
Algunas células fagocíticas especializadas pueden ingerir grandes partículas 787
Las vesículas de pinocitosis se forman en la membrana plasmática a partir de depresiones revestidas 789
No todas las vesículas pinocíticas están recubiertas de clatrina 790
Las células utilizan la endocitosis mediada por receptor para importar macromoléculas extracelulares seleccionadas 791
El material endocitado que no es recuperado por los endosomas termina en los lisosomas 792
Determinadas proteínas son recuperadas de los endosomas tempranos y devueltas a la membrana plasmática 793
En la ruta hacia los endosomas tardíos se forman cuerpos multivesiculares 795
La transcitosis transporta macromoléculas a través de monocapas de células epiteliales 797
Las células epiteliales tienen dos compartimientos endosómicos tempranos distintos pero un solo compartimiento endosómico tardío común 798
Resumen 799

TRANSPORTE DESDE LA RED DEL *TRANS* GOLGI HASTA EL EXTERIOR CELULAR: EXOCITOSIS 800
Parece que muchas proteínas y lípidos son transportados automáticamente desde el ER y desde el complejo de Golgi hasta la superficie celular 800
Las vesículas secretoras emergen por gemación desde la red del *trans* Golgi 801
A menudo las proteínas son procesadas proteolíticamente durante la formación de las vesículas secretoras 803
Las vesículas de secreción esperan cerca de la membrana plasmática hasta que una señal les haga liberar su contenido 803
La exocitosis regulada es una respuesta localizada de la membrana plasmática y del citoplasma subyacente 804
Los componentes de membrana de las vesículas de secreción son rápidamente recuperados desde la membrana plasmática 805
Algunos procesos de secreción regulada permiten aumentar la membrana plasmática 805
Las células polarizadas dirigen las proteínas desde la red del *trans* Golgi hasta el dominio apropiado de la membrana plasmática 806
Diferentes estrategias direccionan selectivamente a las proteínas de membrana y a los lípidos hacia el dominio de membrana plasmática correcto 806
Las vesículas sinápticas pueden formarse directamente a partir de vesículas endocíticas 808
Resumen 809
Problemas 809
Bibliografía 812

Capítulo 14 Conversión energética: mitocondrias y cloroplastos 813

LA MITOCONDRIA 815
La mitocondria presenta una membrana externa, una interna y dos compartimientos internos 816
El ciclo del ácido cítrico genera electrones de alta energía 817
Un proceso quimiosmótico transforma la energía de oxidación en ATP 817
El NADH transfiere sus electrones al oxígeno a través de tres grandes complejos enzimáticos respiratorios 819
A medida que los electrones se desplazan a lo largo de la cadena respiratoria, se almacena energía en forma de gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna 820
El gradiente de protones impulsa la síntesis de ATP 821
El gradiente de protones está acoplado con el transporte a través de la membrana mitocondrial interna 822
El gradiente de protones produce la mayor parte del ATP de las células 823
La mitocondria mantiene una elevada relación ATP:ADP en las células 824
Como el valor de ΔG de la hidrólisis del ATP es muy negativo, el ATP es útil para la célula 824
La ATP sintasa puede actuar en sentido contrario, hidrolizando ATP y bombeando H^+ 826
Resumen 827

LAS CADENAS DE TRANSPORTE DE ELECTRONES Y SUS BOMBAS DE PROTONES 827
Los protones tienen una gran facilidad para desplazarse 828
El potencial redox es una medida de la afinidad por los electrones 828
La transferencia de electrones libera grandes cantidades de energía 829
Mediante métodos espectroscópicos se han identificado muchos de los transportadores de electrones de la cadena respiratoria 829
La cadena respiratoria contiene tres grandes complejos enzimáticos embebidos en la membrana interna 832
En la citocromo oxidasa, un centro hierro-cobre cataliza de forma eficiente la reducción del O_2 833
Las transferencias de electrones en la membrana mitocondrial interna están mediadas por el efecto túnel de electrones durante colisiones al azar 834
Una gran caída de potencial redox a través de cada uno de los complejos enzimáticos respiratorios aporta energía para el bombeo de H^+ 835
El mecanismo del bombeo de H^+ ocurre por diferentes mecanismos en los tres complejos enzimáticos principales 835
Los ionóforos de H^+ desacoplan el transporte de electrones de la síntesis de ATP 836
Normalmente el control respiratorio modera el flujo de electrones a través de la cadena 837
Unos desacoplantes naturales convierten las mitocondrias del tejido adiposo marrón en máquinas productoras de calor 838
Las mitocondrias desempeñan muchos papeles críticos en el metabolismo celular 838
Las bacterias también utilizan los mecanismos quimiosmóticos para aprovechar la energía 839
Resumen 840

CLOROPLASTOS Y FOTOSÍNTESIS 840
El cloroplasto es un miembro de la familia de los plastidios 841
Los cloroplastos se parecen a las mitocondrias, pero tienen un compartimiento adicional 842
Los cloroplastos captan la energía de la luz solar y la utilizan para fijar carbono 843
La fijación del carbono está catalizada por la ribulosa bisfosfato carboxilasa 844
Por cada molécula de CO_2 fijada se consumen tres moléculas de ATP y dos de NADPH 845
En algunas plantas, la fijación del carbono está compartimentada, lo cual facilita el crecimiento a concentraciones bajas de CO_2 846
La fotosíntesis depende de la fotoquímica de las moléculas de clorofila 847
Un fotosistema está formado por un centro de reacción fotoquímico y un complejo antena 848
En un centro de reacción, la energía capturada por la clorofila genera un donador fuerte de electrones a partir de uno débil 850
La fotofosforilación no cíclica produce NADPH y ATP 851
Los cloroplastos pueden producir ATP por fotofosforilación cíclica sin generar NADPH 853
Los fotosistemas I y II tienen estructuras relacionadas entre sí que además se parecen a la de las bacterias 853
La fuerza protón-motriz es la misma en la mitocondria y en el cloroplasto 853
La membrana interna del cloroplasto contiene proteínas transportadoras que facilitan el intercambio de metabolitos con el citosol 854
Los cloroplastos también llevan a cabo otros importantes procesos biosintéticos 855
Resumen 855

SISTEMAS GENÉTICOS DE MITOCONDRIAS Y PLASTIDIOS 855
Las mitocondrias y los cloroplastos contienen sistemas genéticos completos 856
El crecimiento y la división de los orgánulos determinan el número de mitocondrias y de plastidios de cada célula 857
Las mitocondrias y los cloroplastos tienen genomas diferentes 858
Tanto las mitocondrias como los cloroplastos probablemente han evolucionado a partir de bacterias endosimbiónticas 859

Las mitocondrias presentan una utilización relajada de codones y pueden tener una variante del código genético 860
Las mitocondrias de las células animales contienen el sistema genético más sencillo de todos los conocidos 862
Algunos genes de orgánulos contienen intrones 862
El genoma del cloroplasto de las plantas superiores tiene unos 120 genes 863
Los genes mitocondriales se heredan por un mecanismo no mendeliano 864
En muchos organismos los genes de los orgánulos se heredan de la madre 865
Los mutantes diminutos de la levadura demuestran la extraordinaria importancia del núcleo celular en la biogénesis mitocondrial 866
Las mitocondrias y los piastos tienen proteínas específicas de tejido que están codificadas en el núcleo de la célula 867
Las mitocondrias importan la mayor parte de sus lípidos; los cloroplastos producen la mayor parte de ellos 867
Las mitocondrias pueden contribuir al envejecimiento de las células y de los organismos 868
¿Por qué los cloroplastos y las mitocondrias tienen sus propios sistemas genéticos? 868
Resumen 870

LA EVOLUCIÓN DE LAS CADENAS DE TRANSPORTE DE ELECTRONES 870
Probablemente las células más primitivas producían ATP por fermentación 870
La cadena de transporte de electrones capacitó a las bacterias anaeróbicas para utilizar compuestos orgánicos no fermentables como fuente principal de energía 871
Las bacterias fotosintéticas, suministrando una fuente inagotable de poder reductor, superaron el mayor obstáculo de la evolución de las células 872
Las cadenas de transporte electrónico de las cianobacterias producen oxígeno atmosférico y permitieron nuevas formas de vida 873
Resumen 875
Problemas 877
Bibliografía 878

Capítulo 15 Mecanismos de comunicación celular 879

PRINCIPIOS GENERALES DE LA COMUNICACIÓN CELULAR 879
Las moléculas señal extracelulares se unen a receptores específicos 881
Las moléculas señal extracelulares pueden actuar a corta o a larga distancia 881
Las uniones de tipo gap permiten que las células vecinas compartan la información de señalización 884
Cada célula está programada para responder a combinaciones específicas de moléculas señal extracelulares 884
Por lo general diferentes tipos de células responden de forma diferente a una misma molécula señal extracelular 885
El destino de algunas células en desarrollo depende de su posición en un gradiente de morfógeno 886
Una célula sólo modifica rápidamente la concentración de una molécula intracelular si la vida media de esta molécula es corta 886
El óxido nítrico, un gas, actúa como una señal regulando directamente la actividad de determinadas proteínas en el interior de la célula diana 887
Los receptores nucleares son proteínas reguladoras de la expresión génica moduladas por ligando 889
Las tres clases principales de proteínas receptoras de superficie celular son los receptores acoplados a canales iónicos, los acoplados a proteínas G y los acoplados a enzimas 892
La mayoría de los receptores de superficie celular transmiten las señales a través de pequeñas moléculas y de una red de proteínas de señalización intracelulares 893
Muchas proteínas de señalización intracelulares actúan como interruptores moleculares que se activan por fosforilación o por unión a GTP 894
Los complejos de señalización intracelular incrementan la velocidad, eficiencia y especificidad de la respuesta 897
Las interacciones entre las proteínas de señalización intracelulares están mediadas por dominios de interacción modulares 898
Las células pueden utilizar varios mecanismos para responder de forma súbita a incrementos graduales de la concentración de una señal extracelular 899
Las redes de señalización intracelular habitualmente utilizan sistemas de retroalimentación 901
Las células pueden ajustar su sensibilidad frente a una señal 902
Resumen 903

SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DE RECEPTORES DE SUPERFICIE CELULAR ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCR) Y MEDIADORES INTRACELULARES PEQUEÑOS 904
Las proteínas G triméricas transmiten señales intracelulares desde GPCR 905
Algunas proteínas G regulan la producción de AMP cíclico 906
La proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) media la mayoría de los efectos del AMP cíclico 907
Algunas proteínas G activan una vía de señalización de fosfolípidos de inositol y activan la fosfolipasa C-β 909
El Ca^{2+} actúa como un mediador intracelular ubicuo 912
La frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} afecta la respuesta celular 912
En las células animales, las acciones del Ca^{2+} se producen a través de proteínas quinasa dependientes de Ca^{2+}/calmodulina (CaM-quinasas) 914
Algunas proteínas G regulan directamente canales iónicos 916
El olfato y la vista dependen de GPCR que regulan canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos 917
Los mediadores intracelulares y las cascadas enzimáticas amplifican las señales extracelulares 920
La desensibilización de los GPCR depende de la fosforilación del receptor 920
Resumen 921

SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DE RECEPTORES DE SUPERFICIE CELULAR ACOPLADOS A ENZIMAS 922
Los receptores tirosina quinasa (RTK) activados se autofosforilan 922
Determinadas tirosinas fosforiladas de RTK actúan como lugares de unión de proteínas señal intracelulares 924
Los residuos tirosina fosforilados actúan como lugares de unión de proteínas con dominios SH2 925
Ras forma parte de una gran superfamilia de GTPasas monoméricas 926
Los RTK activan Ras a través de adaptadores y GEF: evidencias a partir del desarrollo del ojo de *Drosophila* 927
Ras activa una molécula señalizadora MAP-quinasa 929
Algunas proteínas de armazón ayudan a impedir el entrecruzamiento de señales entre módulos paralelos de MAP-quinasa 930
Las GTPasas de la familia Rho se acoplan funcionalmente a receptores de superficie celular con el citoesqueleto 931
La PI 3-quinasa produce fosfolípidos de inositol que actúan como sitios de unión en la membrana plasmática 933
La vía de señalización PI 3-quinasa–AKT estimula el crecimiento y la supervivencia de las células animales 934
Las vías de señalización corriente abajo activadas por RTK y por GPCR se solapan 935
La actividad de los receptores asociados a tirosinas quinasa depende de proteínas tirosina quinasa citoplasmáticas 936
Los receptores de citoquinas activan la vía de señalización JAK-STAT, proporcionando un camino rápido hacia el núcleo 937
Las proteínas tirosina fosfatasa revierten las fosforilaciones en tirosinas 938
Las proteínas señalizadoras de la superfamilia TGFβ actúan mediante receptores serina/treonina quinasa y Smads 939
Las proteínas serina/treonina quinasa y las proteínas tirosina quinasa están relacionadas estructuralmente 941
La quimiotaxis bacteriana depende de una vía de señalización de dos componentes activada por receptores asociados a histidina quinasa 942
La metilación del receptor es la responsable de la adaptación en la quimiotaxis bacteriana 944
Resumen 944

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTES DE PROTEOLISIS REGULADA DE PROTEÍNAS LATENTES REGULADORAS DE GENES 946
La proteína receptora Notch es una proteína latente reguladora de genes 946
Las proteínas Wnt se unen a los receptores Frizzled e inhiben la degradación de la β-catenina 948
Las proteínas Hedgehog se unen a Patched y eliminan su efecto inhibidor sobre Smoothened 950
Muchos estímulos de estrés e inflamatorios actúan mediante una vía de señalización dependiente de NFκB 951
Resumen 954

SEÑALIZACIÓN EN PLANTAS 955
La pluricelularidad y la comunicación celular evolucionaron independientemente en plantas y animales 955
Los receptores serina/treonina quinasa actúan como receptores de superficie celular en plantas 956

El etileno bloquea la degradación de proteínas reguladoras de genes específicas en el núcleo 957
La localización regulada de los transportadores de auxina determina el crecimiento de la planta 958
Los fitocromos detectan luz roja y los criptocromos detectan luz azul 960
Resumen 961
Problemas 962
Bibliografía 964

Capítulo 16 El citoesqueleto 965

EL AUTOENSAMBLAJE Y LA ESTRUCTURA DINÁMICA DE LOS FILAMENTOS DEL CITOESQUELETO 965
Los filamentos del citoesqueleto son dinámicos y adaptables 966
El citoesqueleto también puede formar estructuras estables 969
Pequeñas subunidades proteicas forman cada uno de los tipos de filamentos del citoesqueleto 970
Los filamentos formados por protofilamentos múltiples tienen propiedades ventajosas 971
La nucleación es la etapa limitante en la velocidad de formación de los polímeros del citoesqueleto 972
Las subunidades de actina y de tubulina se ensamblan cabeza con cola dando lugar a filamentos polares 973
Microtúbulos y filamentos de actina tienen dos extremos distintos que crecen a velocidades diferentes 975
El recambio rotatorio (*treadmilling*) y la inestabilidad dinámica son consecuencias de la hidrólisis de nucleótidos producida por la tubulina y la actina 976
El recambio rotatorio y la inestabilidad dinámica facilitan la reorganización rápida del citoesqueleto 980
La tubulina y la actina han sido altamente conservadas durante la evolución eucariota 982
La estructura de los filamentos intermedios depende de los enlaces laterales y del sobreenrollamiento 983
Los filamentos intermedios proporcionan estabilidad mecánica a las células animales 985
Diferentes compuestos pueden alterar la polimerización de los filamentos 987
La organización celular de las bacterias y la división celular dependen de homólogos del citoesqueleto eucariota 988
Resumen 991

CÓMO REGULAN LAS CÉLULAS LOS FILAMENTOS DE SU CITOESQUELETO 992
Un complejo proteico que contiene tubulina γ nuclea a los microtúbulos 992
En las células animales los microtúbulos se forman a partir del centrosoma 992
A menudo los filamentos de actina se nuclean en la membrana plasmática 996
El mecanismo de la nucleación influye en la organización de los filamentos 998
El alargamiento de los filamentos está modificado por proteínas que se unen a las subunidades libres 999
Existen proteínas fragmentadoras que regulan la longitud y el comportamiento cinético de los filamentos de actina y de los microtúbulos 1000
Las proteínas que se unen lateralmente a los filamentos pueden estabilizarlos o desestabilizarlos 1001
La dinámica de los filamentos puede verse drásticamente alterada por la unión de proteínas que interaccionan con sus extremos 1002
Diferentes tipos de proteínas alteran las propiedades de los extremos de los microtúbulos que crecen rápidamente 1003
En las células, los filamentos se organizan en estructuras de orden más elevado 1005
Los filamentos intermedios están empaquetados y entrecruzados formando hileras compactas 1005
Proteínas de entrecruzamiento de propiedades distintas organizan diferentes ensamblajes de filamentos de actina 1006
La filamina y la espectrina forman redes de filamentos de actina 1008
Los elementos del citoesqueleto pueden unirse a la membrana plasmática 1009
Resumen 1010

MOTORES MOLECULARES 1010
Las proteínas motoras basadas en actina son miembros de la superfamilia de las miosinas 1011
Existen dos tipos de proteínas motoras de microtúbulos: las quinesinas y las dineínas 1014
El parecido estructural entre la miosina y la quinesina refleja un origen evolutivo común 1015
Las proteínas motoras generan fuerza acoplando la hidrólisis del ATP a cambios conformacionales 1016
La cinética de las proteínas motoras está adaptada a las funciones celulares 1020
Las proteínas motoras median el transporte intracelular de los orgánulos rodeados de membrana 1021
El citoesqueleto posiciona moléculas específicas de RNA 1022
Las células regulan la función de las proteínas motoras 1023
Resumen 1025

EL CITOESQUELETO Y EL COMPORTAMIENTO CELULAR 1025
La contracción muscular depende del deslizamiento de la miosina II sobre los filamentos de actina 1026
Un incremento repentino de la concentración citosólica de Ca^{2+} inicia la contracción muscular 1028
El músculo cardíaco es una máquina de ingeniería muy precisa 1030
Los cilios y los flagelos son estructuras móviles formadas por microtúbulos y por dineína 1031
La dinámica de los microtúbulos y las interacciones de muchas proteínas motoras son necesarias para la formación del huso mitótico 1034
Muchas células pueden desplazarse sobre un sustrato sólido 1036
La protuberancia de la membrana plasmática está dirigida por la polimerización de actina 1037
La adhesión celular y la tracción permiten avanzar a las células 1040
Los miembros de la familia de proteínas Rho inducen reorganizaciones importantes del citoesqueleto de actina 1041
Algunas señales extracelulares pueden activar a los tres miembros de la familia de proteínas Rho 1044
Señales externas pueden dictar la dirección de la migración celular 1045
La comunicación entre el citoesqueleto de microtúbulos y el de actina coordina la polarización y el movimiento de las células 1046
La compleja especialización morfológica de las neuronas depende del citoesqueleto 1047
Resumen 1050
Problemas 1050
Bibliografía 1052

Capítulo 17 El ciclo celular 1053

VISIÓN GENERAL DEL CICLO CELULAR 1054
El ciclo celular eucariota se divide en cuatro fases 1054
El control del ciclo celular es semejante en todos los eucariotas 1056
El control del ciclo celular se puede diseccionar genéticamente analizando levaduras mutantes 1056
El control del ciclo celular se puede analizar bioquímicamente en embriones de animales 1057
El control del ciclo celular se puede estudiar en células de mamífero en cultivo 1058
La progresión del ciclo celular se puede estudiar de varias formas 1059
Resumen 1060

EL SISTEMA DE CONTROL DEL CICLO CELULAR 1060
El sistema de control del ciclo celular desencadena los principales acontecimientos del ciclo celular 1060
El sistema de control del ciclo celular depende de proteínas quinasa dependientes de ciclina (Cdk) que se activan cíclicamente 1061
Las fosforilaciones inhibidoras y las proteínas inhibidoras de Cdk (CKI) pueden inhibir la actividad Cdk 1063
El sistema de control del ciclo celular depende de la proteolisis cíclica 1064
El control del ciclo celular depende de la regulación transcripcional 1065
El sistema de control del ciclo celular funciona como una red de interruptores bioquímicos 1065
Resumen 1067

FASE S 1067
Cdk-S inicia la replicación del DNA una vez en cada ciclo 1067
La duplicación de los cromosomas requiere la duplicación de la estructura de la cromatina 1069
Las cohesinas ayudan a mantener a las cromátidas hermanas juntas 1070
Resumen 1071

MITOSIS 1071
Cdk-M desencadena la entrada en la mitosis 1071
La defosforilación activa Cdk-M al principio de la mitosis 1074
La condensina ayuda a configurar los cromosomas duplicados para la separación 1075
El huso mitótico es una máquina basada en microtúbulos 1075

Las proteínas motoras dependientes de microtúbulos regulan el ensamblaje y la función del huso 1077
Dos mecanismos colaboran en el ensamblaje de un huso mitótico bipolar 1077
La duplicación del centrosoma se produce al principio del ciclo celular 1078
Cdk-M inicia el ensamblaje del huso en la profase 1078
En las células animales, la finalización del ensamblaje del huso requiere que la envoltura nuclear se desorganice 1079
La inestabilidad de los microtúbulos aumenta mucho en la mitosis 1080
Los cromosomas mitóticos promueven el ensamblaje bipolar del huso 1081
Los cinetocoros unen las cromátidas hermanas al huso 1082
La biorientación se consigue mediante ensayo y error 1083
Numerosas fuerzas desplazan los cromosomas en el huso 1085
El APC/C desencadena la separación de las cromátidas hermanas y la finalización de la mitosis 1087
Los cromosomas sueltos bloquean la separación de las cromátidas hermanas: el punto de control del ensamblaje del huso 1087
Los cromosomas se segregan en la anafase A y B 1088
Los cromosomas segregados se empaquetan en núcleos hijos en la telofase 1090
La meiosis es una forma especial de división nuclear implicada en la reproducción sexual 1090
Resumen 1092

CITOCINESIS 1092
La actina y la miosina II del anillo contráctil generan la fuerza necesaria para la citocinesis 1093
La activación local de RhoA desencadena el ensamblaje y la contracción del anillo contráctil 1094
Los microtúbulos del huso mitótico determinan el plano de división de las células animales 1095
El fragmoplasto guía la citocinesis en las plantas superiores 1097
Los orgánulos rodeados de membrana tienen que distribuirse entre las células hijas durante la citocinesis 1098
Algunas células reubican su huso para dividirse asimétricamente 1098
La mitosis se puede producir sin citocinesis 1099
La fase G_1 es un estado estable de inactividad Cdk 1100
Resumen 1101

CONTROL DE LA DIVISIÓN CELULAR Y DEL CRECIMIENTO CELULAR 1101
Los mitógenos estimulan la división celular 1102
Las células pueden retrasar la división entrando en un estado especializado no proliferativo 1103
Los mitógenos estimulan las actividades de Cdk-G_1 y de Cdk-G_1/S 1103
El daño en el DNA bloquea la división celular: la respuesta al daño en el DNA 1105
Muchas células humanas limitan de forma programada el número de veces que se pueden dividir 1107
Las señales de proliferación anómalas originan la detención del ciclo celular o la apoptosis, excepto en células cancerosas 1107
El crecimiento del organismo y de los órganos depende del crecimiento celular 1108
Las células que proliferan por lo general coordinan su crecimiento y división 1108
Las células vecinas compiten por las proteínas de señalización extracelulares 1110
Los animales controlan la masa celular total mediante mecanismos desconocidos 1111
Resumen 1112
Problemas 1112
Bibliografía 1114

Capítulo 18 Apoptosis **1115**
La muerte celular programada elimina las células superfluas 1115
Las células apoptóticas se reconocen bioquímicamente 1117
La apoptosis depende de una cascada proteolítica intracelular mediada por caspasas 1118
Los receptores de muerte de la superficie celular activan la vía extrínseca de la apoptosis 1120
La vía intrínseca de la apoptosis depende de las mitocondrias 1121
Las proteínas Bcl2 regulan la vía intrínseca de la apoptosis 1121
Los IAP inhiben las caspasas 1124
Los factores de supervivencia extracelulares inhiben la apoptosis de varias formas 1126
La apoptosis excesiva o insuficiente puede contribuir a la enfermedad 1127
Resumen 1128
Problemas 1128
Bibliografía 1129

Capítulo 19 Uniones celulares, adhesión celular y matriz extracelular **1131**
CADHERINAS Y ADHESIÓN INTERCELULAR 1133
Las cadherinas median la adhesión intercelular dependiente de Ca^{2+} en los tejidos animales 1135
En vertebrados, la superfamilia de las cadherinas está constituida por cientos de proteínas diferentes e incluye algunas que presentan funciones de señalización 1136
Las cadherinas median adhesiones homofílicas 1137
La adhesión selectiva célula-célula posibilita a las células disociadas de vertebrados reagruparse en tejidos organizados 1139
Las cadherinas controlan la mezcla selectiva de las células 1140
Twist regula las transiciones epitelio-mesenquimáticas 1141
Las cateninas conectan las cadherinas clásicas con el citoesqueleto de actina 1142
Las uniones adherentes coordinan la motilidad basada en la actina en células adyacentes 1142
Los desmosomas confieren resistencia mecánica a los epitelios 1143
Las uniones intercelulares envían señales al interior de la célula 1145
Las selectinas median las uniones intercelulares transitorias en el sistema vascular 1145
Las proteínas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas median la adhesión célula-célula independiente de Ca^{2+} 1146
En la formación de una sinapsis actúan numerosos tipos de moléculas de adhesión en paralelo 1147
Las proteínas de armazón organizan los complejos de unión 1148
Resumen 1149

UNIONES ESTRECHAS Y ORGANIZACIÓN DE LOS EPITELIOS 1150
Las uniones estrechas sellan las células entre sí y forman una barrera entre los dominios de membrana 1150
Las proteínas de armazón de los complejos de unión desempeñan un papel importante en el control de la proliferación celular 1154
Las uniones intercelulares y la lámina basal gobiernan la polaridad apicobasal en los epitelios 1155
Un sistema de señalización distinto controla la polaridad celular planar 1157
Resumen 1158

CANALES INTERCELULARES: UNIONES DE TIPO GAP Y PLASMODESMOS 1158
Las uniones de tipo gap acoplan las células, eléctrica y metabólicamente 1158
Un conexón de uniones de tipo gap está compuesto por seis subunidades transmembrana de tipo conexina 1159
Las uniones de tipo gap tienen diversas funciones 1161
Las células pueden regular la permeabilidad de sus uniones de tipo gap 1161
En los vegetales, los plasmodesmos realizan muchas de las funciones de las uniones de tipo gap 1162
Resumen 1163

LA LÁMINA BASAL 1164
Las láminas basales subyacen a todos los epitelios y envuelven algunos tipos celulares no epiteliales 1164
La laminina es el principal componente de la lámina basal 1165
Las colágenas de tipo IV confieren a la lámina basal resistencia a la tracción 1166
Las láminas basales realizan diversas funciones 1167
Resumen 1169

INTEGRINAS Y ADHESIÓN CÉLULA-MATRIZ 1169
Las integrinas son heterodímeros transmembrana que se unen al citoesqueleto 1170
Las integrinas pueden cambiar de una conformación activa a otra inactiva 1170
Defectos en la integrina son los responsables de numerosas enfermedades genéticas 1172
Las integrinas se agrupan formando fuertes adhesiones celulares 1174
Las uniones a la matriz extracelular actúan a través de las integrinas controlando la proliferación y la supervivencia celulares 1175
Las integrinas reclutan proteínas de señalización intracelular en regiones de adhesión célula-sustrato 1176
Las integrinas pueden producir efectos intracelulares localizados 1177
Resumen 1178

MATRIZ EXTRACELULAR DE LOS TEJIDOS CONJUNTIVOS ANIMALES 1178
La matriz extracelular está producida y orientada por las células incluidas en ella 1179
Las cadenas de glucosaminoglucanos (GAG) forman geles hidratados y ocupan grandes volúmenes 1179
El ácido hialurónico actúa como relleno y facilita la migración celular durante la morfogénesis y la reparación de los tejidos 1180
Los proteoglucanos están compuestos por cadenas de GAG unidas covalentemente a una proteína central 1181
Los proteoglucanos pueden regular las actividades de las proteínas secretadas 1183
Los proteoglucanos localizados en la superficie celular actúan como correceptores 1183
Las colágenas son las principales proteínas de la matriz extracelular 1184
Las cadenas de colágena sufren una serie de modificaciones postraduccionales 1186
Tras su secreción, los propéptidos son escindidos de la procolágena permitiendo la organización de las fibrillas 1187
Las colágenas asociadas a fibrillas de secreción intervienen en la organización de las fibrillas 1188
Las células participan en la organización de las fibrillas de colágena que secretan al ejercer fuerzas de tracción sobre la matriz 1189
La elastina confiere elasticidad a los tejidos 1190
La fibronectina es una proteína extracelular que interviene en el anclaje de la célula a la matriz 1191
La tensión ejercida por las células regula el ensamblaje de las fibrillas de fibronectina 1192
La fibronectina se une a integrinas a través de motivos RGD 1193
Las células tienen que ser capaces tanto de degradar la matriz como de formarla 1193
La degradación de la matriz se localiza en las proximidades de las células 1194
Resumen 1195

PARED CELULAR VEGETAL 1195
La composición de la pared celular depende del tipo celular 1197
La resistencia a la tracción que presentan las paredes celulares permite a las células vegetales desarrollar una presión de turgencia 1195
La pared celular primaria está constituida por microfibrillas de celulosa entretejidas con una red de polisacáridos y proteínas 1197
La deposición orientada de la pared celular controla el crecimiento celular en los vegetales 1199
Los microtúbulos orientan la deposición de la pared celular 1200
Resumen 1202
Problemas 1202
Bibliografía 1204

Capitulo 20 Cáncer **1205**

EL CÁNCER COMO PROCESO MICROEVOLUTIVO 1205
Las células cancerosas se reproducen sin restricciones y colonizan otros tejidos 1206
La mayoría de cánceres derivan de una sola célula 1207
Las células cancerosas tienen mutaciones somáticas 1208
Una sola mutación no es suficiente para causar cáncer 1209
Los cánceres se desarrollan gradualmente a partir de un número creciente de células aberrantes 1210
La detección precoz evita los cánceres cervicales 1211
La progresión de los tumores implica rondas sucesivas de mutación y selección natural 1212
Los cambios epigenéticos que se acumulan en las células cancerosas incluyen estructuras heredadas de cromatina y metilaciones en el DNA 1213
Las células cancerosas humanas son genéticamente inestables 1214
A menudo el crecimiento del cáncer depende de un control defectuoso de la muerte celular, de la diferenciación celular o de ambas cosas 1215
Las células cancerosas presentan alteraciones en sus respuestas al daño en el DNA y a otras formas de estrés 1216
Las células cancerosas humanas escapan a la autolimitación de la proliferación celular 1217
Una pequeña población de células progenitoras tumorales mantiene la mayoría de tumores 1217
¿Cómo aparecen las células progenitoras del cáncer? 1218
Para producir metástasis, las células cancerosas malignas tienen que sobrevivir y proliferar en un ambiente adverso 1219
Los tumores inducen angiogénesis 1220
El microambiente del tumor influye en el desarrollo del cáncer 1221
Diversas propiedades contribuyen al crecimiento canceroso 1222
Resumen 1223

CAUSAS DEL CÁNCER QUE PODEMOS PREVENIR 1224
Casi todos, pero no todos, los agentes que dañan el DNA producen cáncer 1225
Los iniciadores de tumores dañan el DNA, los promotores tumorales no 1226
Los virus y otras infecciones contribuyen a la formación de cánceres humanos en una proporción significativa 1227
La identificación de los carcinógenos revela formas de evitar el cáncer 1229
Resumen 1230

DESCUBRIMIENTO DE LOS GENES CRÍTICOS DEL CÁNCER 1230
La identificación de mutaciones que suponen ganancia de función y de mutaciones que suponen pérdida de función, requiere métodos distintos 1231
Los retrovirus pueden actuar como vectores para los oncogenes que alteran el comportamiento celular 1232
Las distintas búsquedas de oncogenes han convergido en el mismo gen: *Ras* 1233
Los genes supresores de tumores pueden ser identificados a través de estudios de raros síndromes cancerosos hereditarios 1234
Los genes supresores de tumores también pueden identificarse estudiando los tumores 1235
Tanto mecanismos genéticos como epigenéticos pueden inactivar a los genes supresores de tumores 1235
Los genes mutados en el cáncer se pueden convertir en hiperactivos de muchas formas distintas 1237
La búsqueda de los genes críticos del cáncer continúa 1239
Resumen 1240

BASES MOLECULARES DEL COMPORTAMIENTO DE LAS CÉLULAS TUMORALES 1241
Los estudios en embriones en desarrollo y en animales transgénicos permiten descubrir las funciones de los genes críticos del cáncer 1241
Muchos genes críticos del cáncer regulan la proliferación celular 1242
Diferentes vías pueden mediar la desregulación de la progresión a través del ciclo celular y del crecimiento celular en las células cancerosas 1244
Algunas mutaciones en los genes que regulan la apoptosis permiten a las células tumorales sobrevivir cuando no deberían hacerlo 1245
Algunas mutaciones en el gen *p53* permiten a las células tumorales sobrevivir y proliferar aunque presenten alteraciones en su DNA 1246
Los virus tumorales de DNA bloquean la actividad de los genes clave supresores de tumores 1247
Las mutaciones que permiten las metástasis todavía constituyen un misterio 1249
Los tumores colono-rectales evolucionan lentamente a través de una sucesión de cambios visibles 1251
Algunas lesiones genéticas clave son comunes a una gran cantidad de cánceres colono-rectales 1251
Algunos cánceres colono-rectales presentan errores en el apareamiento del DNA durante su reparación 1253
Las etapas de la progresión tumoral se correlacionan con determinadas mutaciones 1254
Cada cáncer se caracteriza por su propia colección de lesiones genéticas 1256
Resumen 1256

TRATAMIENTO DEL CÁNCER: PRESENTE Y FUTURO 1256
La búsqueda de tratamientos para el cáncer es difícil pero no desesperada 1257
Las terapias tradicionales aprovechan la inestabilidad genética y la pérdida del control del ciclo celular de las células cancerosas 1257
Los nuevos fármacos aprovechan las causas específicas de la inestabilidad genética de los tumores 1257
La inestabilidad genética permite a los cánceres ser progresivamente más resistentes a las terapias 1259
A partir del conocimiento de la biología del cáncer pueden desarrollarse nuevas terapias 1260
Se pueden diseñar pequeñas moléculas dirigidas específicamente a proteínas oncogénicas 1260
Los vasos sanguíneos tumorales son dianas lógicas para la terapia antitumoral 1262
Muchos cánceres pueden ser tratados incrementando la respuesta inmune contra un tumor específico 1262

El tratamiento de los pacientes con diversos fármacos simultáneamente presenta ventajas potenciales para la terapia antitumoral 1263
El patrón de expresión génica ayuda a clasificar los cánceres en subgrupos con significado clínico 1264
Todavía queda mucho por hacer 1264
Resumen 1265
Problemas 1265
Bibliografía 1267

Capítulo 21 La reproducción sexual: meiosis, células germinales y fecundación 1269

LA REPRODUCCIÓN SEXUAL 1269
En los eucariotas superiores, la fase haploide es breve 1269
La meiosis genera diversidad genética 1271
La reproducción sexual proporciona a los organismos una ventaja competitiva 1271
Resumen 1272

MEIOSIS 1272
Los gametos son el resultado de dos divisiones meióticas 1272
Los cromosomas homólogos duplicados (y los cromosomas sexuales) se aparean durante la profase I temprana 1274
El apareamiento de los cromosomas homólogos culmina con la formación del complejo sinaptinémico 1275
La segregación de los cromosomas homólogos en la meiosis depende de proteínas asociadas al cinetocoro 1277
A menudo la meiosis no funciona correctamente 1278
Los entrecruzamientos aumentan la redistribución genética 1279
El entrecruzamiento está muy regulado 1280
La regulación de la meiosis es distinta en los machos y en las hembras de los mamíferos 1280
Resumen 1281

CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES Y DETERMINACIÓN DEL SEXO EN LOS MAMÍFEROS 1282
Señales específicas de las células vecinas a las PGC en los embriones de los mamíferos 1282
Las PGC migran a las gónadas en desarrollo 1283
En los mamíferos, el gen *Sry* conduce el desarrollo de la gónada hacia la formación de un testículo 1284
Muchos aspectos de la reproducción sexual varían en gran medida entre las especies animales 1286
Resumen 1286

OOCITOS 1287
Un oocito es una célula altamente especializada para seguir un desarrollo independiente 1287
Los oocitos se desarrollan por etapas 1288
Los oocitos alcanzan su gran tamaño mediante mecanismos especiales de crecimiento 1290
La mayor parte de los oocitos humanos mueren sin llegar a madurar 1291
Resumen 1292

ESPERMATOZOIDES 1292
Los espermatozoides están extraordinariamente especializados para transmitir su DNA a un oocito 1293
Los espermatozoides se producen en los testículos de los mamíferos de manera continuada 1293
Los espermatozoides se desarrollan como un sincitio 1294
Resumen 1296

FECUNDACIÓN 1297
Los espermatozoides eyaculados alcanzan la capacitación en el tracto genital femenino 1297
Los espermatozoides capacitados se adhieren a la zona pelúcida y experimentan la reacción acrosómica 1298
Todavía no se conoce el mecanismo de la fusión espermatozoide-oocito 1298
La fusión con un espermatozoide activa el oocito mediante un aumento del Ca^{2+} citosólico 1299
La reacción cortical asegura que el oocito sea fecundado por un solo espermatozoide 1300
El espermatozoide proporciona al zigoto los centríolos y su genoma 1301
IVF e ICSI han revolucionado el tratamiento de la infertilidad humana 1301
Resumen 1303
Bibliografía 1304

Capítulo 22 Desarrollo de los organismos pluricelulares 1305

MECANISMOS GENERALES DEL DESARROLLO ANIMAL 1305
Los animales comparten algunas características anatómicas básicas 1307
Los animales pluricelulares son ricos en proteínas que intervienen en las interacciones celulares y la regulación génica 1308
El DNA regulador define el programa de desarrollo 1309
La manipulación del embrión revela las interacciones entre sus células 1310
Los estudios de animales mutantes identifican los genes que controlan los procesos del desarrollo 1311
La célula toma decisiones sobre su desarrollo mucho antes de mostrar algún cambio visible 1311
Las células recuerdan valores posicionales que reflejan su localización en el cuerpo 1312
Mediante señales inductoras se generan, de una manera ordenada, diferencias entre células inicialmente idénticas 1313
Una división celular asimétrica puede dar lugar a células hermanas diferentes 1314
La retroalimentación positiva genera asimetría donde antes no la había 1314
La retroalimentación positiva genera patrones, respuestas de todo o nada y proporciona memoria 1315
Un pequeño grupo de vías de señalización, utilizado de forma repetida, controla el patrón de desarrollo 1316
Los morfógenos son inductores de largo alcance que ejercen efectos graduales 1317
Inhibidores extracelulares de las moléculas señal modelan la respuesta del inductor 1318
Las señales del desarrollo pueden difundir por el tejido de diferentes maneras 1318
Los programas intrínsecos de una célula definen la temporización de su desarrollo 1319
Los patrones iniciales se establecen en pequeños campos de células, se perfeccionan por inducción secuencial y el embrión crece 1319
Resumen 1320

CAENORHABDITIS ELEGANS: SU DESARROLLO DESDE LA PERSPECTIVA DE LA CÉLULA INDIVIDUAL 1321
Caenorhabditis elegans es anatómicamente sencillo 1321
En el desarrollo de un nematodo, el destino celular se puede predecir casi perfectamente 1322
La división asimétrica del huevo se organiza mediante los productos de los genes de efecto materno 1323
Las interacciones célula-célula generan patrones progresivamente más complejos 1324
La microdisección y la genética revelan la lógica del control del desarrollo; la clonación génica y la secuenciación revelan sus mecanismos moleculares 1325
Con el tiempo, las células cambian su capacidad de respuesta frente a las señales de desarrollo 1325
Los genes heterocrónicos controlan la temporización del desarrollo 1326
El contaje de las divisiones celulares no forma parte del programa interno de temporización 1327
Algunas células mueren por apoptosis como parte del programa de desarrollo 1327
Resumen 1328

DROSOPHILA Y LA GENÉTICA MOLECULAR DE LA FORMACIÓN DEL PATRÓN: GÉNESIS DEL ESQUEMA CORPORAL 1328
El cuerpo del insecto está constituido por una serie de unidades o segmentos 1329
Drosophila empieza su desarrollo como un sincitio 1330
Mediante cribajes genéticos se han definido los grupos de genes necesarios para determinados aspectos del patrón inicial 1332
Las interacciones entre el oocito y su entorno definen los ejes del embrión: el papel de los genes de polaridad del huevo 1333
Los genes de señalización dorsoventral crean un gradiente de proteína reguladora de genes nucleares 1334
Dpp y Sog establecen un gradiente morfogénico secundario para perfeccionar el patrón de la parte dorsal del embrión 1336
El eje dorsoventral de los insectos corresponde al eje ventrodorsal de los vertebrados 1336
Tres clases de genes de segmentación perfeccionan el modelo materno anteroposterior y subdividen el embrión 1336
La expresión localizada de los genes de segmentación se regula por la jerarquía de las señales posicionales 1337

La naturaleza modular del DNA regulador permite que los genes tengan funciones múltiples controladas independientemente 1338
Los genes de polaridad del huevo, los *gap* y los de regla par crean un patrón temporal que es recordado por otros genes 1339
Resumen 1341

LOS GENES SELECTORES HOMEÓTICOS Y SU PAPEL EN LA FORMACIÓN DEL PATRÓN DEL EJE ANTEROPOSTERIOR 1341
El código Hox determina las diferencias entre el sector anterior y el posterior 1342
Los genes selectores homeóticos codifican proteínas que se enlazan al DNA que interactúan con otras proteínas reguladoras 1342
Los genes selectores homeóticos se expresan secuencialmente según el orden que siguen en el complejo Hox 1343
El complejo Hox contiene un registro permanente de información posicional 1343
También en vertebrados los genes selectores Hox controlan el eje anteroposterior 1344
Resumen 1346

ORGANOGÉNESIS Y DISEÑO DE LOS APÉNDICES 1347
Las mutaciones somáticas condicionales e inducidas hacen posible el análisis de las funciones génicas en el desarrollo tardío 1347
Las partes del cuerpo de la mosca adulta se desarrollan a partir de los discos imaginales 1350
Los genes selectores homeóticos son esenciales en la memoria de la información posicional en las células de los discos imaginales 1350
Los genes reguladores específicos definen las células que formarán un apéndice 1351
El disco del ala de insecto se divide en compartimientos 1351
Cuatro vías de señalización ya conocidas se combinan entre sí formando el patrón del disco del ala: Wingless, Hedgehog, Dpp y Notch 1352
El tamaño de cada compartimiento se regula por interacciones entre sus células 1352
Mecanismos similares modelan las extremidades de los vertebrados 1354
La expresión localizada de clases específicas de genes de proteínas reguladoras prefigura la diferenciación celular 1355
La inhibición lateral escoge las células madre sensoriales de los agregados proneurales 1356
La inhibición lateral conduce a la descendencia de la célula madre sensorial hacia destinos finales diferentes 1358
La polaridad planar de las divisiones asimétricas está controlada por la señalización mediada por el receptor Frizzled 1358
Las divisiones asimétricas de las células madre generan neuronas adicionales en el sistema nervioso central 1359
Las divisiones asimétricas de los neuroblastos segregan un inhibidor de la división celular en una sola de las células hijas 1361
En muchos tejidos, la señalización Notch regula el patrón detallado de los tipos de células diferenciadas 1361
Algunos genes reguladores son clave para definir un tipo celular; otros pueden activar el programa de generación de un órgano completo 1362
Resumen 1362

LOS DESPLAZAMIENTOS CELULARES Y LA FORMACIÓN DEL CUERPO DE LOS VERTEBRADOS 1363
La polaridad de un embrión de anfibio depende de la polaridad del huevo 1364
La segmentación genera muchas células a partir de una sola 1365
La gastrulación transforma una esfera hueca en una estructura con tres capas y un tubo digestivo primitivo 1365
Los desplazamientos de la gastrulación se pueden predecir con precisión 1366
Las señales químicas desencadenan los procesos mecánicos 1367
Cambios activos en el empaquetamiento celular proporcionan la fuerza motriz de la gastrulación 1368
Un cambio en los patrones de adhesión celular obliga a las células a reordenarse 1369
La notocorda se alarga y la placa neural se abarquilla formando el tubo neural 1370
Un oscilador de expresión génica controla la segmentación del mesodermo en somitas 1371
Las oscilaciones del reloj de segmentación pueden deberse a una retroalimentación negativa retardada 1373
Las células migradoras invaden los tejidos embrionarios de forma estrictamente controlada 1373
La distribución de las células migradoras depende de factores de supervivencia así como de los indicios guía 1375
La simetría lateral de los vertebrados deriva de una asimetría molecular en el embrión temprano 1376
Resumen 1377

EL RATÓN 1378
El desarrollo de los mamíferos empieza con un preámbulo especial 1378
El embrión temprano de los mamíferos es altamente regulador 1380
A partir de un embrión de mamífero se pueden obtener células madre embrionarias totipotentes 1380
Las interacciones entre el epitelio y el mesénquima generan estructuras tubulares ramificadas 1381
Resumen 1382

EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO 1383
Las neuronas toman distintos caracteres según el momento y el lugar donde nacen 1383
El carácter asignado a una neurona en el momento de su nacimiento determina las conexiones que formará 1385
Cada axón y cada dendrita se alarga mediante el cono de crecimiento del ápice 1386
El cono de crecimiento *in vivo* marca el rumbo de la neurita en desarrollo a lo largo de una vía perfectamente definida 1387
Los conos de crecimiento pueden cambiar su sensibilidad mientras viajan 1389
Los tejidos diana liberan factores neurotrópicos que controlan el crecimiento y la supervivencia de las células nerviosas 1389
La especificidad neuronal guía la formación de mapas neuronales ordenados 1390
Los axones de diferentes regiones de la retina responden de forma diferente a un gradiente de moléculas repelentes del tectum 1392
Los patrones difusos de conexiones sinápticas se definen por remodelación activa 1393
La experiencia moldea el patrón de las conexiones sinápticas en el cerebro 1394
Posiblemente la memoria del adulto y la remodelación sináptica en el desarrollo dependen de mecanismos similares 1396
Resumen 1396

EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS 1397
Arabidopsis se utiliza como organismo modelo para la genética molecular de las plantas 1398
El genoma de *Arabidopsis* es rico en genes de control del desarrollo 1399
El desarrollo embrionario empieza estableciendo el eje raíz-tallo y luego se detiene dentro de la semilla 1400
Las partes de la planta se generan secuencialmente por meristemos 1403
El desarrollo de la plántula depende de señales ambientales 1403
Señales hormonales de largo alcance coordinan las fases del desarrollo en distintas partes de la planta 1403
La formación de cada nueva estructura depende de la división orientada y de la expansión celular 1406
Cada módulo de la planta crece a partir de un grupo de primordios microscópicos del meristemo 1407
El transporte polarizado de auxina controla el patrón de los primordios en el meristemo 1409
La señalización celular mantiene el meristemo 1409
Las mutaciones reguladoras pueden transformar la topología de la planta alterando el comportamiento celular en el meristemo 1410
La activación de la floración depende de las condiciones ambientales pasadas y presentes 1412
Los genes selectores homeóticos especifican las partes de una flor 1413
Resumen 1414
Bibliografía 1415

Capítulo 23 Los tejidos especializados, las células madre y la renovación tisular 1417

LA EPIDERMIS Y SU RENOVACIÓN MEDIANTE CÉLULAS MADRE 1417
Las células epidérmicas forman una barrera impermeable de varias capas 1419
A medida que van madurando, las células epidérmicas en diferenciación expresan una secuencia de genes diferentes 1419
Las células madre de la capa basal permiten la renovación de la epidermis 1420

Las dos células hijas de una célula madre no siempre tienen que llegar a ser distintas 1420
La capa basal contiene tanto las células madre como las células amplificadoras transitorias 1421
Las divisiones amplificadoras transitorias forman parte de la estrategia de control del crecimiento 1423
Las células madre de algunos tejidos conservan hebras del DNA inicial 1424
Cuando se necesitan nuevas células con urgencia, la velocidad de división de las células madre puede aumentar considerablemente 1425
Muchas señales que interaccionan entre sí dirigen la renovación de la epidermis 1426
La glándula mamaria experimenta ciclos de desarrollo y regresión 1426
Resumen 1428

LOS EPITELIOS SENSORIALES 1429
Las neuronas olfatorias se reemplazan continuamente 1429
Las células ciliadas del oído tienen que durar toda la vida 1430
La mayoría de las células permanentes renuevan sus componentes: las células fotorreceptoras de la retina 1432
Resumen 1433

LAS VÍAS RESPIRATORIAS Y EL INTESTINO 1434
En los alvéolos de los pulmones, los tipos celulares adyacentes actúan de forma conjunta 1434
Las células caliciformes, las células ciliadas y los macrófagos colaboran manteniendo limpias las vías respiratorias 1434
El revestimiento del intestino delgado se renueva más deprisa que cualquier otro tejido 1436
La señalización Wnt mantiene el compartimiento de células madre del intestino 1438
La señalización Notch controla la diversificación de las células intestinales 1439
La señalización Efrina-Eph controla las migraciones de las células del epitelio intestinal 1440
Las vías de señalización Wnt, Hedgehog, PDGF y BMP se combinan delimitando el nicho de las células madre 1441
El hígado funciona como una interfase entre el tracto digestivo y la sangre 1442
La pérdida de células hepáticas estimula su proliferación 1443
La renovación del tejido no tiene que depender de las células madre: las células secretoras de insulina en el páncreas 1444
Resumen 1445

LOS VASOS SANGUÍNEOS, LOS VASOS LINFÁTICOS Y LAS CÉLULAS ENDOTELIALES 1445
Las células endoteliales revisten todos los vasos sanguíneos y linfáticos 1445
Las células endoteliales estrelladas promueven la angiogénesis 1446
Diferentes células endoteliales forman tipos de vasos diferentes 1447
Los tejidos que necesitan irrigación sanguínea producen VEGF; la señalización Notch entre las células endoteliales regula la respuesta 1448
Las señales de las células endoteliales controlan la incorporación de los pericitos y de células musculares lisas formando la pared del vaso 1450
Resumen 1450

RENOVACIÓN MEDIANTE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENCIALES: FORMACIÓN DE CÉLULAS SANGUÍNEAS 1451
Los tres tipos principales de glóbulos blancos son granulocitos, monocitos y linfocitos 1451
La producción de los distintos tipos de células sanguíneas en la médula ósea roja está controlada individualmente 1454
La médula ósea roja contiene las células madre hematopoyéticas 1454
Una célula madre pluripotencial da lugar a todos los tipos de células sanguíneas 1456
La determinación es un proceso gradual 1456
Las divisiones de las células progenitoras comprometidas amplifican el número de células sanguíneas especializadas 1458
Las células madre hematopoyéticas dependen de señales de contacto con las células del estroma 1458
Los factores que regulan la hematopoyesis pueden analizarse en cultivo 1459
La eritropoyesis depende de la hormona eritropoyetina 1459
En la producción de los neutrófilos y de los macrófagos influyen muchos CSF 1460
El comportamiento de una célula hematopoyética depende parcialmente del azar 1461
La regulación de la supervivencia celular es tan importante como la regulación de la proliferación celular 1462
Resumen 1463

GÉNESIS, MODULACIÓN Y REGENERACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO 1463
Los mioblastos se fusionan para formar nuevas fibras musculares esqueléticas 1464
Las células musculares pueden modular sus propiedades cambiando isoformas de las proteínas que presentan 1465
Las fibras musculares esqueléticas segregan miostatina, que limita su propio crecimiento 1466
En el adulto, algunos mioblastos persisten como células madre quiescentes 1467
Resumen 1467

LOS FIBROBLASTOS Y SUS TRANSFORMACIONES: LA FAMILIA DE LAS CÉLULAS DEL TEJIDO CONJUNTIVO 1468
Los fibroblastos cambian sus características en respuesta a señales de la matriz extracelular 1468
La matriz extracelular puede influir en la diferenciación de las células del tejido conjuntivo, afectando a su forma y su adhesión 1469
Los osteoblastos fabrican la matriz ósea 1470
La mayor parte de los huesos se forman a partir de modelos de cartílago 1471
El hueso se remodela continuamente por medio de las células que lo forman 1472
Las señales de los osteoblastos controlan a los osteoclastos 1473
Las células adiposas pueden desarrollarse a partir de los fibroblastos 1475
La leptina segregada por las células adiposas proporciona una retroalimentación negativa que inhibe la ingesta 1475
Resumen 1476

INGENIERÍA DE LAS CÉLULAS MADRE 1477
Las células madre hemopoyéticas se pueden utilizar para sustituir células sanguíneas alteradas por otras sanas 1477
Las poblaciones de células madre epidérmicas pueden expandirse en cultivo para la reparación de un tejido 1478
Las células madre neuronales se pueden manipular en cultivo 1478
Las células madre neuronales pueden repoblar el sistema nervioso central 1479
En el adulto las células madre son específicas de cada tejido 1479
Las células ES pueden formar cualquier parte del cuerpo 1480
Las células ES específicas de un paciente podrían resolver el problema del rechazo inmunitario 1482
Las células ES son útiles para el descubrimiento de fármacos y el estudio de enfermedades 1482
Resumen 1483
Bibliografía 1483

Capítulo 24 Patógenos, infección e inmunidad innata 1485

INTRODUCCIÓN A LOS AGENTES PATÓGENOS 1486
Los agentes patógenos han desarrollado mecanismos específicos de interacción con sus huéspedes 1486
Los signos y síntomas de una infección pueden deberse tanto al agente infeccioso como a las respuestas del huésped 1487
Los agentes patógenos son filogenéticamente diversos 1488
Las bacterias patógenas son portadoras de genes de virulencia 1489
Protozoos y hongos parásitos siguen complejos ciclos vitales a través de múltiples formas 1494
Todos los procesos de la propagación vírica dependen de la maquinaria de la célula huésped 1496
Los priones son proteínas infecciosas 1498
Los agentes infecciosos están relacionados con el cáncer, las enfermedades cardíacas y otras enfermedades crónicas 1499
Resumen 1501

BIOLOGÍA CELULAR DE LA INFECCIÓN 1501
Los agentes patógenos atraviesan barreras protectoras para colonizar al huésped 1501
Los patógenos que colonizan los epitelios han de evitar su eliminación por parte del huésped 1502
Los patógenos intracelulares disponen de mecanismos tanto para entrar como para abandonar las células huésped 1505

Las partículas víricas se adhieren a moléculas expresadas en la superficie de las células huésped 1505
Los viriones entran en las células huésped mediante la fusión de membranas, la formación de poros o la disrupción de la membrana 1506
Las bacterias entran en la célula huésped por fagocitosis 1508
Los parásitos intracelulares eucariotas invaden las células huésped de manera activa 1509
Muchos patógenos alteran el tráfico de membranas de la célula huésped 1512
Virus y bacterias utilizan el citoesqueleto de la célula huésped para desplazarse dentro de las células 1514
Las infecciones víricas se hacen con el control del metabolismo de las células huésped 1517
Los agentes patógenos pueden alterar el comportamiento del organismo huésped con el fin de facilitar su diseminación 1518
Los agentes patógenos evolucionan rápidamente 1519
La variación antigénica en los patógenos está producida por diversos mecanismos 1520
La evolución vírica está dominada por la replicación que favorece errores 1521
Los patógenos resistentes a los fármacos constituyen un problema creciente 1522
Resumen 1525

EL SISTEMA INMUNITARIO INNATO Y LAS BARRERAS FRENTE A LA INFECCIÓN 1525
Los epitelios y las defensinas colaboran en la prevención de las infecciones 1526
Las células humanas reconocen características que se encuentran conservadas en los patógenos 1527
La activación del complemento dirige a los patógenos hacia su fagocitosis o su lisis 1528
Las proteínas homólogas a Toll y las proteínas NOD constituyen una antigua familia de receptores de reconocimiento de patrón 1530
Las células fagocitarias detectan, endocitan y destruyen a los agentes patógenos 1531
Los macrófagos activados participan en la respuesta inflamatoria en los lugares de infección 1534
Las células infectadas por virus toman medidas drásticas para prevenir la replicación vírica 1535
Las células citotóxicas naturales (NK) inducen la autodestrucción de las células infectadas por virus 1536
Las células dendríticas constituyen la conexión entre los sistemas inmunitarios innato y adquirido 1537
Resumen 1537
Bibliografía 1537

Capítulo 25 El sistema de inmunidad adquirida 1539

LINFOCITOS Y BASES CELULARES DE LA INMUNIDAD ADQUIRIDA 1540
Los linfocitos son necesarios para la inmunidad adquirida 1540
Los sistemas inmunitarios innato y adquirido actúan conjuntamente 1541
Los linfocitos B se desarrollan en la médula ósea; los linfocitos T se desarrollan en el timo 1543
El sistema inmunitario adquirido actúa por selección clonal 1544
La mayoría de antígenos estimulan muchos clones diferentes de linfocitos 1545
La memoria inmunológica se debe tanto a la expansión clonal como a la diferenciación de los linfocitos 1545
La tolerancia inmunológica evita normalmente que los antígenos propios sean atacados 1547
Los linfocitos circulan continuamente a través de los órganos linfoides periféricos 1549
Resumen 1551

LINFOCITOS B Y ANTICUERPOS 1551
Los linfocitos B producen anticuerpos tanto en forma de receptores de antígeno de superficie celular como de proteínas secretadas 1552
Un anticuerpo típico tiene dos lugares idénticos de unión al antígeno 1552
Una molécula de anticuerpo está compuesta por cadenas pesadas y cadenas ligeras 1552
Existen cinco clases diferentes de cadenas pesadas de anticuerpo, cada una de las cuales tiene propiedades biológicas distintas 1553
La intensidad de las interacciones antígeno-anticuerpo depende tanto del número como de la afinidad de los lugares de unión al antígeno 1557
Tanto las cadenas ligeras como las pesadas de los anticuerpos presentan regiones constantes y regiones variables 1558
Las cadenas ligeras y las cadenas pesadas están formadas por dominios Ig repetitivos 1559
El lugar de unión al antígeno se halla formado por bucles hipervariables 1560
Resumen 1561

GENERACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE LOS ANTICUERPOS 1562
Durante el desarrollo de los linfocitos B, los genes de los anticuerpos se ensamblan a partir de segmentos génicos diferentes 1563
La unión imprecisa de los segmentos génicos aumenta la diversidad de las regiones V 1564
El control de la recombinación V(D)J asegura la monoespecificidad de los linfocitos B 1565
La hipermutación somática dirigida por el antígeno acaba de afinar las respuestas de los anticuerpos 1567
Los linfocitos B pueden cambiar la clase del anticuerpo que producen 1568
Resumen 1569

LINFOCITOS T Y PROTEÍNAS MHC 1570
Los receptores de los linfocitos T (TCR) son heterodímeros similares a los anticuerpos 1570
Los linfocitos T son activados o inducidos a la tolerancia por las células dendríticas a través de la presentación de antígeno 1571
Los linfocitos T citotóxicos efectores inducen la autoeliminación de las células diana infectadas 1573
Los linfocitos T colaboradores efectores colaboran en la activación de otras células de los sistemas inmunitarios innato y adquirido 1574
Los linfocitos T reguladores suprimen la actividad de otros linfocitos T 1575
Los linfocitos T reconocen péptidos extraños unidos a las proteínas MHC 1575
Las proteínas MHC fueron identificadas en las reacciones de trasplante antes de conocer sus funciones 1576
Las proteínas MHC de clase 1 y de clase II son heterodímeros similares estructuralmente 1577
Las proteínas MHC unen péptidos e interaccionan con receptores de linfocitos T 1578
Las proteínas MHC ayudan a dirigir a los linfocitos T hacia las dianas adecuadas 1581
Los correceptores CD4 y CD8 se unen a regiones invariables de las proteínas MHC 1581
Los linfocitos T citotóxicos responden a fragmentos de proteínas citosólicas extrañas asociadas a proteínas MHC de clase 1 1582
Los linfocitos T colaboradores responden a fragmentos de proteínas antigénicas extrañas endocitadas y asociadas con proteínas MHC de clase II 1584
Los linfocitos T útiles en potencia son seleccionados positivamente en el timo 1586
La mayoría de los linfocitos T citotóxicos y colaboradores en desarrollo que podrían ser activados por los complejos MHC-péptido propio son eliminados en el timo 1587
Algunas de las proteínas específicas de órgano se expresan de modo ectópico en la médula del timo 1588
La función de las proteínas MHC ayuda a explicar su polimorfismo 1588
Resumen 1589

LINFOCITOS T COLABORADORES Y ACTIVACIÓN LINFOCITARIA 1590
Las células dendríticas activadas utilizan varios mecanismos para activar a los linfocitos T 1590
La activación de los linfocitos B está controlada por retroalimentación negativa 1593
La subclase de linfocito T colaborador activado determina la naturaleza de la respuesta inmunitaria adquirida 1593
Los linfocitos T_H1 activan a los macrófagos infectados e inducen una respuesta inflamatoria 1595
La unión del antígeno al receptor de los linfocitos B (BCR) es sólo un paso en la activación de los linfocitos B 1596
Los linfocitos T colaboradores específicos de antígeno son esenciales para la activación de la mayoría de los linfocitos B 1597
Un tipo especial de linfocitos B reconoce los antígenos independientes del linfocito T 1599
Las moléculas de reconocimiento inmunitario pertenecen a la antigua superfamilia Ig 1599
Resumen 1601
Bibliografía 1601

Agradecimientos

Al escribir este libro hemos disfrutado del consejo de muchos biólogos y bioquímicos. Queremos agradecerles sus sugerencias al preparar esta edición. (Los que nos han ayudado en esta edición se citan primero y, a continuación, los que nos ayudaron en la primera, en la segunda, la tercera y en la cuarta ediciones.)

Capítulo 1: W. Ford Doolittle (Dalhousie University, Canadá), Jennifer Frazier (Exploratorium®, San Francisco), Douglas Kellogg (University of California, Santa Cruz), Eugene Koonin (National Institutes of Health), Mitchell Sogin (Woods Hole Institute)

Capítulo 2: Michael Cox (University of Wisconsin, Madison), Christopher Mathews (Oregon State University), Donald Voet (University of Pennsylvania), John Wilson (Baylor College of Medicine)

Capítulo 3: David Eisenberg (University of California, Los Angeles), Louise Johnson (University of Oxford), Steve Harrison (Harvard University), Greg Petsko (Brandeis University), Robert Stroud (University of California, San Francisco), Janet Thornton (European Bioinformatics Institute, Reino Unido)

Capítulo 4: David Allis (The Rockefeller University), Adrian Bird (Wellcome Trust Centre, Reino Unido), Gary Felsenfeld (National Institutes of Health), Susan Gasser (Universidad de Ginebra, Suiza), Eric Green (National Institutes of Health), Douglas Koshland (Carnegie Institution of Washington, Baltimore), Ulrich Laemmli (Universidad de Ginebra, Suiza), Michael Lynch (Indiana University), Hiten Madhani (University of California, San Francisco), Elliott Margulies (National Institutes of Health), Geeta Narlikar (University of California, San Francisco), Maynard Olson (University of Washington)

Capítulo 5: Elizabeth Blackburn (University of California, San Francisco), James Haber (Brandeis University), Nancy Kleckner (Harvard University), Joachim Li (University of California, San Francisco), Thomas Lindahl (Cancer Research, Reino Unido), Rodney Rothstein (Columbia University), Aziz Sancar (University of North Carolina, Chapel Hill), Bruce Stillman (Cold Spring Harbor Laboratory), Steven West (Cancer Research, Reino Unido), Rick Wood (University of Pittsburgh)

Capítulo 6: Raul Andino (University of California, San Francisco), David Bartel (Massachusetts Institute of Technology), Richard Ebright (Rutgers University), Daniel Finley (Harvard University), Joseph Gall (Carnegie Institution of Washington), Michael Green (University of Massachusetts Medical School), Carol Gross (University of California, San Francisco), Christine Guthrie (University of California, San Francisco), Art Horwich (Yale University School of Medicine), Roger Kornberg (Stanford University), Reinhard Lührman (Max Planck Institute of Biophysical Chemistry, Göttingen), Quinn Mitrovich (University of California, San Francisco), Harry Noller (University of California, Santa Cruz), Roy Parker (University of Arizona), Robert Sauer (Massachusetts Institute of Technology), Joan Steitz (Yale University), Jack Szostak (Harvard Medical School, Howard Hughes Medical Institute), David Tollervey (University of Edinburgh, Reino Unido), Alexander Varshavsky (California Institute of Technology), Jonathan Weissman (University of California, San Francisco)

Capítulo 7: Raul Andino (University of California, San Francisco), David Bartel (Massachusetts Institute of Technology), Michael Bulger (University of Rochester Medical Center), Michael Green (University of Massachusetts Medical School), Carol Gross (University of California, San Francisco), Frank Holstege (University Medical Center, The Netherlands), Roger Kornberg (Stanford University), Hiten Madhani (University of California, San Francisco), Barbara Panning (University of California, San Francisco), Mark Ptashne (Memorial Sloan-Kettering Center), Ueli Schibler (Universidad de Ginebra, Suiza), Azim Surani (University of Cambridge)

Capítulo 8: Wallace Marshall [colaborador principal] (University of California, San Francisco)

Capítulo 9: Wolfgang Baumeister (Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried), Ken Sawin (The Wellcome Trust Centre for Cell Biology, Reino Unido), Peter Shaw (John Innes Centre, Reino Unido), Werner Kühlbrandt (Max Planck Institute of Biophysics, Frankfurt am Main), Ronald Vale (University of California, San Francisco), Jennifer Lippincott-Schwartz (National Institutes of Health)

Capítulo 10: Ari Helenius (Instituto Federal Suizo de Tecnología, Zúrich, Suiza), Werner Kühlbrandt (Max Planck Institute of Biophysics, Frankfurt am Main), Dieter Osterhelt (Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried), Kai Simons (Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden)

Capítulo 11: Wolfhard Almers (Oregon Health and Science University), Robert Edwards (University of California, San Francisco), Bertil Hille (University of Washington), Lily Jan (University of California, San Francisco), Roger Nicoll (University of California, San Francisco), Robert Stroud (University of California, San Francisco), Patrick Williamson (University of Massachusetts, Amherst)

Capítulo 12: Larry Gerace (The Scripps Research Institute), Ramanujan Hegde (National Institutes of Health), Nikolaus Pfanner (Universidad de Friburgo, Alemania), Daniel Schnell (University of Massachusetts, Amherst), Karsten Weis (University of California, Berkeley), Susan Wente (Vanderbilt University Medical Center), Pat Williamson (University of Massachusetts, Amherst)

Capítulo 13: Scott Emr (University of California, San Diego), Ben Glick (University of Chicago), Ari Helenius (Instituto Federal Suizo de Tecnología, Zúrich, Suiza), Ira Mellman (Yale University), Hugh Pelham (The Medical Research Council, Cambridge), Giampietro Schiavo

(London Research Institute), Graham Warren (Yale University), Marino Zerial (Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Frankfurt am Main)

Capítulo 14: Michael Gray (Dalhousie University), Andrew Halestrap (University of Bristol, Reino Unido), Werner Kühlbrandt (Max Planck Institute of Biophysics, Frankfurt am Main), Craig Thompson (Abramson Family Cancer Research Institute, University of Pennsylvania), Michael Yaffe (University of California, San Diego)

Capítulo 15: Nicholas Harberd [colaborador importante] (John Innes Centre, Reino Unido), Henry Bourne (University of California, San Francisco), Dennis Bray (University of Cambridge), James Briscoe (National Institute for Medical Research, Reino Unido), James Ferrell (Stanford University), Matthew Freeman (Laboratory of Molecular Biology, Reino Unido), Alfred Gilman (The University of Texas Southwestern Medical Center), Sankar Ghosh (Yale University School of Medicine), Alan Hall (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center), Carl-Henrik Heldin (Ludwig Institute for Cancer Research, Suecia), Robin Irvine (University of Cambridge), Michael Karin (University of California, San Diego), Elliott Meyerowitz (California Institute of Technology), Roel Nusse (Stanford University), Tony Pawson (Mount Sinai Hospital, Toronto), Julie Pitcher (University College London), Len Stephens (The Babraham Institute, Reino Unido)

Capítulo 16: Julie Theriot [colaborador principal] (Stanford University), Henry Bourne (University of California, San Francisco), Larry Goldstein (University of California, San Diego), Alan Hall (MRC Laboratory for Molecular Biology and Cell Biology, Reino Unido), Joe Howard (Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden), Laura Machesky (The University of Birmingham, Reino Unido), Timothy Mitchison (Harvard Medical School), Ronald Vale (University of California, San Francisco)

Capítulo 17: David Morgan [colaborador principal] (University of California, San Francisco), Arshad Desai (University of California, San Diego), Bruce Edgar (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle), Michael Glotzer (University of Chicago), Rebecca Heald (University of California, Berkeley), Eric Karsenti (Laboratorio europeo de Biología Molecular, Alemania), Kim Nasmyth (University of Oxford), Jonathan Pines (Gurdon Institute, Cambridge), Charles Sherr (St. Jude Children's Hospital)

Capítulo 18: Xiaodong Wang [colaborador importante] (The University of Texas Southwestern Medical School), Jerry Adams (The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Australia), Douglas Green (St. Jude Children's Hospital), Shigekazu Nagata (Universidad de Kyoto, Japón)

Capítulo 19: Jeffrey Axelrod (Stanford University Medical Center), Walter Birchmeier (Centro Max Delbrück de Medicina Molecular, Alemania), Keith Burridge (University of North Carolina, Chapel Hill), John Couchman (Imperial College, Reino Unido), Caroline Damsky (University of California, San Francisco), Matthias Falk (Lehigh University), David Garrod (University of Manchester, Reino Unido), Daniel Goodenough (Harvard Medical School), Martin Humphries (University of Manchester, Reino Unido), Richard Hynes (Massachusetts Institute of Technology), Ken Keegstra (Michigan State University), Morgan Sheng (Massachusetts Institute of Technology), Charles Streuli (University of Manchester, Reino Unido), Masatoshi Takeichi (Instituto RIKEN Kobe, Japón), Kenneth Yamada (National Institutes of Health)

Capítulo 20: Laura Attardi [colaborador importante] (Stanford University), Anton Berns (Instituto del Cáncer Holandés, Holanda), Michael Bishop (University of California, San Francisco), Fred Bunz (Johns Hopkins), Johann De-Bono (The Institute of Cancer Research, Reino Unido), John Dick (University of Toronto, Canadá), Paul Edwards (University of Cambridge), Douglas Hanahan (University of California, San Francisco), Joseph Lipsick (Stanford University School of Medicine), Scott Lowe (Cold Spring Harbor Laboratory), Bruce Ponder (University of Cambridge), Craig Thompson (University of Pennsylvania), Ian Tomlinson (Cancer Research, Reino Unido), Robert Weinberg (Massachusetts Institute of Technology)

Capítulo 21: Patricia Calarco (University of California, San Francisco), John Carroll (University College London), Abby Dernburg (University of Califonia, Berkeley), Scott Hawley (Stowers Institute for Medical Research, Kansas City), Neil Hunter (University of California, Davis), Nancy Kleckner (Harvard University), Anne McLaren (Wellcome/ Cancer Research Campaign Institute, Cambridge), Diana Myles (University of California, Davis), Terry Orr-Weaver (Massachusetts Institute of Technology), Renee Reijo (University of California, San Francisco), Gerald Schatten (Pittsburgh Development Center), Azim Surani (The Gurdon Institute, Reino Unido), Paul Wassarman (Mount Sinai School of Medicine)

Capítulo 22: Julie Ahringer (The Gurdon Institute, Reino Unido), Konrad Basler (Universidad de Zúrich, Suiza), Richard Harland (University of California, Berkeley), Brigid Hogan (Duke University), Kenneth Irvine (Rutgers University), Daniel St. Johnson (The Gurdon Institute, Reino Unido), Elliott Meyerowitz (California Institute of Technology), William McGinnis (University of California, San Diego), Elizabeth Robertson (The Wellcome Trust Centre for Human Genetics, Reino Unido), Francois Schweisguth (Centro Nacional Francés para la Investigación Científica, Francia), Jim Smith (The Gurdon Institute, Reino Unido), Nicolas Tapon (London Research Institute)

Capítulo 23: Ralf Adams (London Research Institute), Hans Clevers (Instituto Hubrecht, Holanda), Jeffrey Gordon (Washington University, St. Louis), Holger Gerhardt (London Research Institute), Simon Hughes (Kings College, Reino Unido), Daniel Louvard (Institut Curie, Francia), Bjorn Olsen (Harvard Medical School), Stuart Orkin (Harvard Medical School), Thomas Reh (University of Washington, Seattle), Austin Smith (University of Edinburgh), Charles Streuli (The University of Manchester, Reino Unido), Fiona Watt (Cancer Research Institute, Reino Unido)

Capítulo 24: Julie Theriot [colaborador principal] (Stanford University), Michael Bishop (University of California, San Francisco), Harald von Boehmer (Harvard Medical School), Lynn Enquist (Princeton University), Stan Falkow (Stanford University), Douglas Fearon (University of Cambridge), Lewis Lanier (University of California, San Francisco), Richard Locksley (University of California, San Francisco), Daniel Portnoy (University of California, Berkeley), Caetano Reis e Sousa (Cancer Research, Reino Unido), Ralph Steinman (The Rockefeller University), Gary Ward (University of Vermont)

Capítulo 25: Harald von Boehmer (Harvard Medical School), Douglas Fearon (University of Cambridge), Lewis Lanier (University of California, San Francisco), Philippa Marrack (National Jewish Medical and Research Center, Denver), Michael Neuberger (University of Cambridge), Michael Nussenzweig (Rockefeller University), William Paul (National Institutes of Health), Klaus Rajewsky (Harvard Medical School), Caetano Reis e Sousa (Cancer Research, Reino Unido), Ralph Steinman (The Rockefeller University).

Glosario: Eleanor Lawrence, Sherry Granum

Estudiantes: David Kashatus (Duke University), Emmanuel Kreidl (Universidad de Viena, Austria), Nick Rudzik (University of Toronto, Canadá), Dea Shahinas (University of Toronto, Canadá)

Simon (California Institute of Technology), Jonathan Slack (Cancer Research, Reino Unido), Alison Smith (John Innes Institute, Norfolk, Reino Unido), John Maynard Smith (University of Sussex, Reino Unido), Frank Solomon (Massachusetts Institute of Technology), Michael Solursh (University of Iowa), Bruce Spiegelman (Harvard Medical School), Timothy Springer (Harvard Medical School), Mathias Sprinzl (Universidad de Bayreuth, Alemania), Scott Stachel (University of California, Berkeley), Andrew Staehelin (University of Colorado, Boulder), David Standring (University of California, San Francisco), Margaret Stanley (University of Cambridge), Martha Stark (University of California, San Francisco), Wilfred Stein (Universidad Hebrea, Israel), Malcolm Steinberg (Princeton University), Paul Sternberg (California Institute of Technology), Chuck Stevens (The Salk Institute), Murray Stewart (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge), Monroe Strickberger (University of Missouri, St. Louis), Robert Stroud (University of California, San Francisco), Michael Stryker (University of California, San Francisco), William Sullivan (University of California, Santa Cruz), Daniel Szollosi (Institut National de la Recherche Agronomique, Francia), Jack Szostak (Massachusetts General Hospital), Masatoshi Takeichi (Kyoto University), Clifford Tabin (Harvard Medical School), Diethard Tautz (Universidad de Colonia, Alemania), Julie Theriot (Stanford University), Roger Thomas (University of Bristol, Reino Unido), Vernon Thornton (King's College London), Cheryll Tickle (University of Dundee, Escocia), Jim Till (Ontario Cancer Institute, Toronto), Lewis Tilney (University of Pennsylvania), Nick Tonks (Cold Spring Harbor Laboratory), Alain Townsend (Institute of Molecular Medicine, John Radcliffe Hospital, Oxford), Paul Travers (Anthony Nolan Research Institute, Londres), Robert Trelstad (UMDNJ, Robert Wood Johnson Medical School), Anthony Trewavas (Edinburgh University, Escocia), Nigel Unwin (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge), Victor Vacquier (University of California, San Diego), Harry van der Westen (Wageningen, Holanda), Tom Vanaman (University of Kentucky), Harold Varmus (Sloan-Kettering Institute), Alexander Varshavsky (California Institute of Technology), Madhu Wahi (University of California, San Francisco), Virginia Walbot (Stanford University), Frank Walsh (Glaxo-Smithkline-Beecham, Reino Unido), Trevor Wang (John Innes Institute, Norwich, Reino Unido), Yu-Lie Wang (Worcester Foundation for Biomedical Research), Anne Warner (University College London), Graham Warren (Yale University School of Medicine), Paul Wassarman (Mount Sinai School of Medicine), Fiona Watt (Cancer Research, Reino Unido), Ciare Waterman-Storer (The Scripps Research Institute), Fiona Watt (Cancer Research, Reino Unido), John Watts (John Innes Institute, Norwich, Reino Unido), Klaus Weber (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen), Martin Weigert (Institute of Cancer Research, Philadelphia), Harold Weintraub (fallecido), Karsten Weis (University of California, Berkeley), Irving Weissman (Stanford University), Jonathan Weissman (University of California, San Francisco), Norman Wessells (Stanford University), Judy White (University of Virginia), Steven West (Cancer Research, Reino Unido), William Wickner (Dartmouth College), Michael Wilcox (fallecido), Lewis T. Williams (Chiron Corporation), Keith Willison (Chester Beatty Laboratories, Londres), John Wilson (Baylor University), Alan Wolffe (fallecido), Richard Wolfenden (University of North Carolina, Chapel Hill), Sandra Wolin (Yale University School of Medicine), Lewis Wolpert (University College London), Rick Wood (Cancer Research, Reino Unido), Abraham Worcel (University of Rochester), Nick Wright (Cancer Research, Reino Unido), John Wyke (Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow), Keith Yamamoto (University of California, San Francisco), Charles Yocum (University of Michigan, Ann Arbor), Peter Yurchenco (UMDNJ, Robert Wood Johnson Medical School), Rosalind Zalin (University College London), Patricia Zambryski (University of California, Berkeley).

Nota al lector

Estructura
A pesar de que los capítulos se pueden leer de forma independiente unos de otros, están ordenados siguiendo una secuencia lógica y estructurados en cinco partes. Los tres primeros capítulos de la **Parte I** cubren los principios elementales y la bioquímica básica. Pueden ser utilizados como una introducción para los que no hayan estudiado bioquímica o para refrescar las ideas de los que sí lo hayan hecho.

En la **Parte II** se trata del almacenamiento, la expresión y la transmisión de la información genética.

En la **Parte III** se exponen los principios de los métodos experimentales más importantes para estudiar las células. No es necesario leer esos capítulos para poder entender los capítulos siguientes, pero proporcionan unas referencias útiles.

En la **Parte IV** se describe la organización interna de la célula.

En la **Parte V** se sigue el comportamiento de las células en sistemas celulares, empezando con las uniones célula-célula y con la matriz extracelular y acabando con dos capítulos sobre el sistema inmunitario.

Problemas del final de cada capítulo
Al final de los Capítulos del 1 al 20 aparece una selección de problemas, escritos por John Wilson y Tim Hunter. Las soluciones completas de estos problemas se hallan en *Biología molecular de la célula, quinta edición: Libro de problemas*.

Bibliografía
Al final de cada capítulo se incluye una concisa lista de bibliografía. Aparece por orden alfabético bajo los títulos principales de cada sección del capítulo. Frecuentemente, esta bibliografía incluye los trabajos originales en los que se describieron por primera vez descubrimientos importantes. El Capítulo 8 incluye algunas tablas que proporcionan las fechas de eventos cruciales junto con los nombres de los científicos implicados en cada uno de ellos. A lo largo de todo el texto se ha omitido el nombre de los científicos.

Códigos
A lo largo de todo el libro hemos integrado códigos que indican la disponibilidad de vídeos y animaciones en el DVD-ROM. Los códigos de cuatro letras entre paréntesis angulares están destacados en color, como <ATCG>. La interfaz para *Biología celular interactiva* del DVD-ROM contiene una ventana en la que se puede entrar el código de 4 letras y aparecerá el vídeo o animación en el programa correspondiente.

Términos del glosario
En todo el libro se utiliza la **negrita** para resaltar los términos clave en los lugares de cada capítulo en los que se presenta la principal discusión de cada uno de ellos. La *cursiva* se utiliza para destacar términos importantes aunque con un énfasis menor. Al final del libro se presenta el **glosario**, que contiene los términos técnicos que son habituales en biología celular; se intenta que el lector lo utilice como un primer recurso cuando se encuentre ante un término que no le es familiar, que se utiliza sin ninguna explicación.

Nomenclatura de genes y de proteínas
Para nombrar los genes existe un convenio diferente en cada especie de organismo; las únicas características comunes es que siempre se presentan en cursiva. En algunas especies, como en humanos, los nombres de los genes se escriben en mayúsculas; en otras especies, por ejemplo en el pez cebra, se escriben en minúsculas; en otros casos (la mayoría de genes de ratón), la primera letra se escribe en mayúsculas y el resto en minúsculas; en otros casos, como en *Drosophila*, se utilizan diferentes combinaciones de mayúsculas y minúsculas, en función de si el primer alelo mutante que fue descubierto generaba un fenotipo dominante o recesivo. Es evidente la variedad de los convenios para nombrar los productos génicos.

Este caos tipográfico crea una gran confusión. No sólo es agotador y absurdo, sino que también es insostenible. Nosotros no podemos definir de forma independiente un nuevo convenio para cada una de los varios millones de especies cuyos genes son objeto de estudio. Además, en muchas ocasiones, hemos de referirnos a un gen de forma genérica, sin especificar si se trata de la versión del ratón, la humana, la de gallina o la de hipopótamo, ya que son equivalentes para el caso que se está analizando. ¿Qué convenio hemos de utilizar?

Hemos decidido dejar de lado los convenios para cada una de las especies y seguir una regla uniforme: escribiremos todos los nombres de los genes, como los nombres de las personas o de los lugares, con la primera letra en mayúsculas y el resto en minúsculas, todas en cursiva: *Apc, Bazooka, Cdc2, Dishevelled, Egl1*. La proteína correspondiente, si se ha denominado después del gen, se escribirá de la misma forma pero en redonda, no en cursiva: Apc, Bazooka, Cdc2, Dishevelled, Egl1. Cuando es necesario especificar el organismo del que procede, se puede utilizar un prefijo añadido al nombre del gen.

Para aclarar todas las dudas se añade una lista de algunos detalles sobre las reglas de nomenclatura seguidas. En algunos casos, tradicionalmente se utiliza una letra añadida al nombre del gen para distinguir entre genes relacionados por su función o por su evolución; en el caso de los genes, esta letra la escribimos en mayúscula si es habitual el hacerlo (*LacZ, RecA, HoxA4*). No se utilizan guiones para separar estas letras o números añadidos del resto del nombre. La nomenclatura de las proteínas constituye otro problema. Muchas de ellas tienen un nombre propio, que se les asignó antes de que se nombrara su gen. Estos nombres de proteínas adquieren muchas formas, a pesar de que la mayoría de ellos tradicionalmente se escriben en minúsculas (actina, hemoglobina, catalasa) como los nombres de las sustancias habituales (queso, nilón) a no ser que tengan acrónimos (como GFP: green fluorescent protein, la proteína verde fluorescente, o BMP4, la proteína n.º 4 de morfogénesis del hueso: bone morphogenetic protein #4; en español siempre utilizaremos los acrónimos derivados del nombre en inglés, ya que en caso de traducirlos, por ejemplo PVF en lugar de GFP o PMH4 en lugar de BMP4, el texto resultaría incomprensible). Para facilitar su comprensión, siempre indicamos el origen del acrónimo: GFP: *green fuorescent protein*. En español los acrónimos nunca tienen forma plural. El uniformizar todos estos nombres de proteínas supondría demasiada presión, de forma que se ha optado por utilizar los nombres tradicionales (actina, GFP, etc.) Sin embargo, los nombres de los genes correspondientes siempre se escriben siguiendo nuestra regla estándar: *Actina, Hemoglobina, Catalasa, Bmp4, Gfp*. En ocasiones hemos tenido que destacar el nombre de una proteína escribiéndolo en cursiva; por lo general esta intención quedará clara a partir del contexto.

Para quien desee conocerlo, en la tabla se muestran algunos de los convenios de algunas especies determinadas --convenios que no hemos seguido en este libro.

	CONVENIO ESPECÍFICO		CONVENIO UNIFICADO UTILIZADO EN ESTE LIBRO	
ORGANISMO	**GEN**	**PROTEÍNA**	**GEN**	**PROTEÍNA**
Ratón	*Hoxa4*	Hoxa4	*HoxA4*	HoxA4
	Bmp4	BMP4	*Bmp4*	BMP4
	integrina α-1, Itgα1	integrina α1	*Integrina α1, Itgα1*	integrina α1
Humano	*HOXA4*	HOXA4	*HoxA4*	HoxA4
Pez cebra	*cyclops, cyc*	Cyclops, Cyc	*Cyclops, Cyc*	Cyclops, Cyc
Caenorhabditis	*unc-6*	UNC-6	*Unc6*	Unc6
Drosophila	*sevenless, sev* (denominado así por su fenotipo mutante recesivo)	Sevenless, SEV	*Sevenless, Sev*	Sevenless, Sev
	Deformed, Dfd (denominado así por su fenotipo mutante dominante)	Deformed, DFD	*Deformed, Dfd*	Deformed, Dfd
Levadura				
Saccharomyces cerevisiae (levadura de germinación)	*CDC28*	Cdc28, Cdc28p	*Cdc28*	Cdc28
Schizosaccharomyces pombe (levadura de fisión)	*Cdc2*	Cdc2, Cdc2p	*Cdc2*	Cdc2
Arabidopsis	*GAI*	GAI	*Gai*	GAI
E. coli	*uvrA*	UvrA	*UvrA*	UvrA

Suplementos

Biología molecular de la célula, quinta edición: Libro de problemas

Por John Wilson y Tim Hunt

El *Libro de problemas* está diseñado para ayudar al alumnado a apreciar las vías a través de las cuales los experimentos y los cálculos sencillos pueden ayudar a entender cómo funcionan las células. Proporciona problemas que acompañan a los Capítulos del 1 al 20 de *Biología molecular de la célula*. Cada capítulo de problemas está dividido en secciones que corresponden a las del texto principal y que revisan los términos clave, proponen preguntas test sobre el conocimiento de conceptos básicos y enuncian problemas básicos de investigación. El libro *Biología molecular de la célula, quinta edición: Libro de problemas* puede resultar útil para trabajar en casa y como base para debates en clase. Incluso puede proporcionar ideas para preguntas de examen. Las soluciones de todos los problemas se hallan en el CD-ROM que acompaña el libro. En el *Libro de problemas* también se encuentran las respuestas de los problemas del final de los capítulos 1 a 20 del libro principal.

DVD-ROM de *Biología molecular de la célula, quinta edición*

El DVD contiene, en castellano, las figuras, las tablas y las micrografías del libro, cargadas sobre presentaciones de PowerPoint®, una para cada capítulo. Otra carpeta incluye las versiones individuales de cada una de las figuras, tablas y micrografías, en formato JPEG. Los autores han incluido material que no sólo refuerza los conceptos básicos, sino que también amplía los contenidos y las perspectivas del libro. Los archivos multimedia pueden ser accesibles como archivos individuales o a través de la interfaz *Biología celular interactiva*. Como se ha indicado antes, esta interfaz se ha programado para que trabaje con los códigos que se integran a lo largo de todo el texto. En la *Guía del DVD*, un archivo PDF localizado en la ventana inicial del DVD-ROM, se incluye un índice y un resumen de todos los recursos electrónicos. El DVD-ROM también contiene el texto de los Capítulos 21-25, que tratan de los sistemas pluricelulares. Estos capítulos están en formato PDF y se pueden imprimir fácilmente o abrir mediante programas que gestionen archivos PDF, como Adobe® Acrobat® Reader.

Suplementos docentes

Si los solicita a la editorial Garland Science (www.garlandscience.com), el profesorado cualificado puede obtener suplementos docentes, en inglés, de *Biología molecular de la célula*.

MBoC5 Transparency Set

Proporciona 200 transparencias en color, sobre láminas de acetato, de las figuras más importantes del libro.

MBoC5 Test Questions

También está disponible una selección de preguntas de tipo test, escritas por Kirsten Benjamin (Amyris Biotechnologies, Emeryville, California) y Linda Huang (University of Massachussets, Boston). Estas preguntas de concepto valorarán el conocimiento de los alumnos sobre el contenido de cada capítulo.

MBoC5 Lecture Outlines

Resúmenes generados a partir de los conceptos principales del texto.

Garland Science Classwire™

Todos los suplementos docentes del DVD-ROM (las figuras de los PowerPoint y en formato JPEG, los Capítulos 21-25 en formato PDF, los 125 vídeos, animaciones y películas), las preguntas de tipo test y los resúmenes están (en inglés) a disposición del profesorado cualificado en la página Web de Garland Science Classwire™, donde también se ofrece el acceso a otros recursos de todos los libros de texto de Garland Science y se proporcionan herramientas de gestión libres de gastos. Para más información, visitar http://www.classwire.com/garlandscience o envíe un correo electrónico a science@garland.com (*Classwire* es una marca de Chalkfree, Inc.).

Adobe y Acrobat son marcas registradas de Adobe Systems Incorporated.
PowerPoint es una marca registrada de Microsoft Corporation.

Nota de los traductores

La traducción de cualquier texto es una labor extraordinariamente compleja. La traducción de un texto científico no debería entrañar en principio la misma dificultad que la de una obra literaria respecto a la falta de correspondencia entre las expresiones y los matices propios de cada idioma. Sin embargo, también tiene sus escollos.

En primer lugar, la inexistencia de traducción de numerosos términos científicos hace que la presencia de anglicismos sea la nota predominante en la mayoría de traducciones, no sólo al castellano sino también al francés y a otras lenguas. Por otra parte, la falta de uniformidad terminológica que existe en muchos campos de la ciencia, a pesar de repetidos esfuerzos por parte de muchos autores, asociaciones y divulgadores de la ciencia, es otro agravante añadido.

A estos problemas terminológicos hay que añadir el de la velocidad de envejecimiento de los conceptos que se recogen en el texto que se traduce: resulta impensable dedicar dos o tres años a la traducción de una obra como *Biología molecular de la célula*, ya que continuamente se producen nuevos hallazgos y cada tres o cuatro años aparece una nueva edición ampliada y modificada. Por ello, hay que recurrir a la colaboración de diferentes especialistas que traduzcan los capítulos de su competencia. El inevitable cambio de estilo se puede minimizar, como hemos intentado, mediante un corrector único que realice una revisión general de todo el texto traducido. Sería interesante crear una comisión, no muy amplia, de expertos en las diversas áreas de conocimiento y en la cual se incorporara un lingüista y se estudiaran uno por uno los términos conflictivos.

A todo ello hay que añadir la enorme responsabilidad que supone el traducir, ya que uno se convierte en el vehículo de las ideas del autor. En algunas ocasiones puede darse el hecho que exista una cierta disconformidad entre lo expuesto por los autores de la obra y las ideas de los traductores. En estos casos hay que hacer un esfuerzo considerable para no introducir modificaciones en el texto original. Por otro lado, la fidelidad al texto original tiene que ir acompañada de la adecuación a las estructuras gramaticales de la lengua a la que se traduce. No es nada sencillo. Sin duda, lo ideal es que cada uno pueda entender el texto original. Aún más, si nos referimos a un texto científico escrito en inglés y a alumnos de carreras universitarias, parece casi obligado y debería favorecerse.

A pesar de ello, no resistimos la tentación de aceptar la traducción de la quinta edición (como ocurrió en las 4 ediciones anteriores) de *Molecular Biology of the Cell* porque consideramos que se trata de una obra magnífica, actualizada, de gran rigor científico y a la vez muy didáctica y con un enfoque integrado y moderno de la biología celular y molecular.

Esta quinta edición está ampliada respecto a la cuarta, incorporando muchos conceptos y una reestructuración de algunos temas, así como la edición de nuevos capítulos. Al igual que en la revisión que realizamos de la primera edición, en la traducción de las posteriores nos encontramos nuevamente con graves dificultades terminológicas del castellano, tanto por el hecho de que todavía no se ha aceptado la denominación de una serie de nuevos conceptos (**capping**, **splicing**, **enhancer**, etc.), como porque tradicionalmente se han utilizado como castellanas las palabras inglesas originales (**blot**, **cluster**, **symport**, **splicing**, etc.). Cuando ha sido posible, hemos mantenido las recomendaciones de la *Real Academia de la Lengua* y de la *Real Academia de las Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, aunque ello supusiera en ocasiones ir en contra de términos utilizados muy frecuentemente (**las enzimas** y no **los enzimas**, **biblioteca genómica** y no **librería genómica**, **DNA** y no **ADN**, **cAMP** y no **AMPc**, **acervo** y no **pool**, **ayuste** y no **splicing**, **microchip** y no **microarray**, **fecundación** y no **fertilización**, etc.). Después de consultar a especialistas sobre cada uno de los temas, hemos tenido que "adaptar" algunos términos, los más importantes de los cuales se recogen en el glosario (que puede actuar a modo de diccionario especializado) en un intento de uniformizar nuestro léxico en el campo de la bioquímica y de la biología celular y molecular.

Esperamos que este esfuerzo tenga una cierta utilidad. Cualquier crítica o consejo será bien acogido para posteriores traducciones.

En esta quinta edición y por primera vez, también hemos traducido el *Libro de problemas*, diseñado para ayudar al alumnado a entender cómo funcionan las células y compuesto por cuestiones conceptuales o numéricas relacionadas con la materia que se recoge en los capítulos del 1 al 20 de *Biología molecular de la célula*. Las soluciones de todos los problemas se hallan en el CD que acompaña al *Libro de problemas*.

Biología molecular de la célula tiene también como suplemento un DVD que incluye una colección extraordinaria de vídeos y animaciones que no sólo refuerzan muchos de los conceptos básicos del libro principal sino que, en algunos casos, también los amplían. Queremos destacar el esfuerzo de Ediciones Omega por no sólo traducir sino también doblar al castellano los comentarios que acompañan a todo este material multimedia.

En su conjunto, el libro *Biología molecular de la célula* y el DVD, con toda la iconografía y la gran cantidad de material multimedia, y el *Libro de problemas* y el CD con las soluciones, constituye una obra fundamental en el idioma castellano sobre Biología molecular de la célula.

Los traductores

I

INTRODUCCIÓN A LA CÉLULA

Parte I
Capítulos

1 Células y genomas

2 Química celular y biosíntesis

3 Proteínas



Células y genomas

1

La superficie de nuestro planeta está poblada por seres vivos sorprendentes, factorías químicas altamente especializadas que incorporan materia de su entorno y la utilizan para generar copias de sí mismos. Los organismos vivos son extraordinariamente diversos. ¿Qué puede ser más diferente que un tigre y un alga marina, o una bacteria y un árbol? Nuestros ancestros, sin conocimiento alguno de células o de DNA, nos explicaron que todos estos entes tenían algo en común. Hablaron de algo "vivo", se maravillaron de su existencia e intentaron definirlo, y se desesperaron intentando explicar qué eran y cómo se relacionaban con la materia "no viva".

Los descubrimientos del siglo pasado no han disminuido nuestra admiración por lo vivo, sino todo lo contrario. No obstante, han esclarecido en gran parte algunos misterios como la naturaleza de la vida. En la actualidad podemos decir que todos los seres vivos están formados por células y que estas unidades de materia viva comparten una maquinaria común para sus funciones más básicas. Los seres vivos, aunque infinitamente diversos por fuera, son muy similares por dentro. La Biología en su conjunto es el punto de encuentro de dos ideas: la asombrosa variedad individual y la constancia en los mecanismos fundamentales. En este primer capítulo comenzaremos a delinear las características universales comunes a toda la vida de nuestro planeta. Inspeccionaremos, brevemente, la diversidad celular y veremos cómo, gracias a un código común en el que están escritas las especificaciones de todos los organismos, es posible leer, medir y desentrañar estas especificaciones para alcanzar un conocimiento coherente de todas las formas de vida, desde las más pequeñas a las más grandes.

En este capítulo

LAS CARACTERÍSTICAS UNIVERSALES DE LAS CÉLULAS EN LA TIERRA 1

LA DIVERSIDAD DEL GENOMA Y EL ÁRBOL DE LA VIDA 11

LA INFORMACIÓN GENÉTICA EN EUCARIOTAS 26

LAS CARACTERÍSTICAS UNIVERSALES DE LAS CÉLULAS EN LA TIERRA

Se ha estimado que el número de especies que en la actualidad pueblan la tierra es superior a 10 millones (quizás a 100 millones). Cada una de estas especies es diferente, y cada una se reproduce a sí misma con exactitud, dando lugar a una progenie perteneciente a la misma especie, ya que el organismo progenitor aporta una información que especifica con gran detalle las características que tendrá su progenie. Este fenómeno de la *herencia* es fundamental en la definición de la vida, ya que la distingue de otros procesos como el crecimiento de cristales, la combustión de una vela o la formación de olas en el agua, procesos en los que se generan estructuras organizadas pero sin el mismo tipo de relación que existe entre las peculiaridades de los progenitores y las de su progenie. Como la llama de una vela, el organismo consume energía libre para generar y mantener su organización; esta energía libre se utiliza en el desarrollo de un enorme y complejo sistema de procesos químicos que están especificados por la información hereditaria.

La mayoría de los organismos vivos son células sencillas. Otros, como nosotros mismos, son enormes ciudades pluricelulares en las que grupos de células realizan funciones específicas y se relacionan mediante elaborados sistemas de comunicación. No obstante, en todos los casos –desde una bacteria solitaria al agregado de más de 10^{13} células que forma el cuerpo humano– cada organismo se ha originado por división celular a partir de una sola célula. Por lo tanto, la célula es el vehículo a través del que se transmite la información hereditaria que define cada especie (**Figura 1–1**). Además y determinada por esta misma información, la célula contiene la maquinaria necesaria para obtener materiales del ambiente y para generar una nueva célula idéntica a sí misma, que contendrá una nueva copia de información hereditaria. Sólo la célula dispone de esta capacidad.

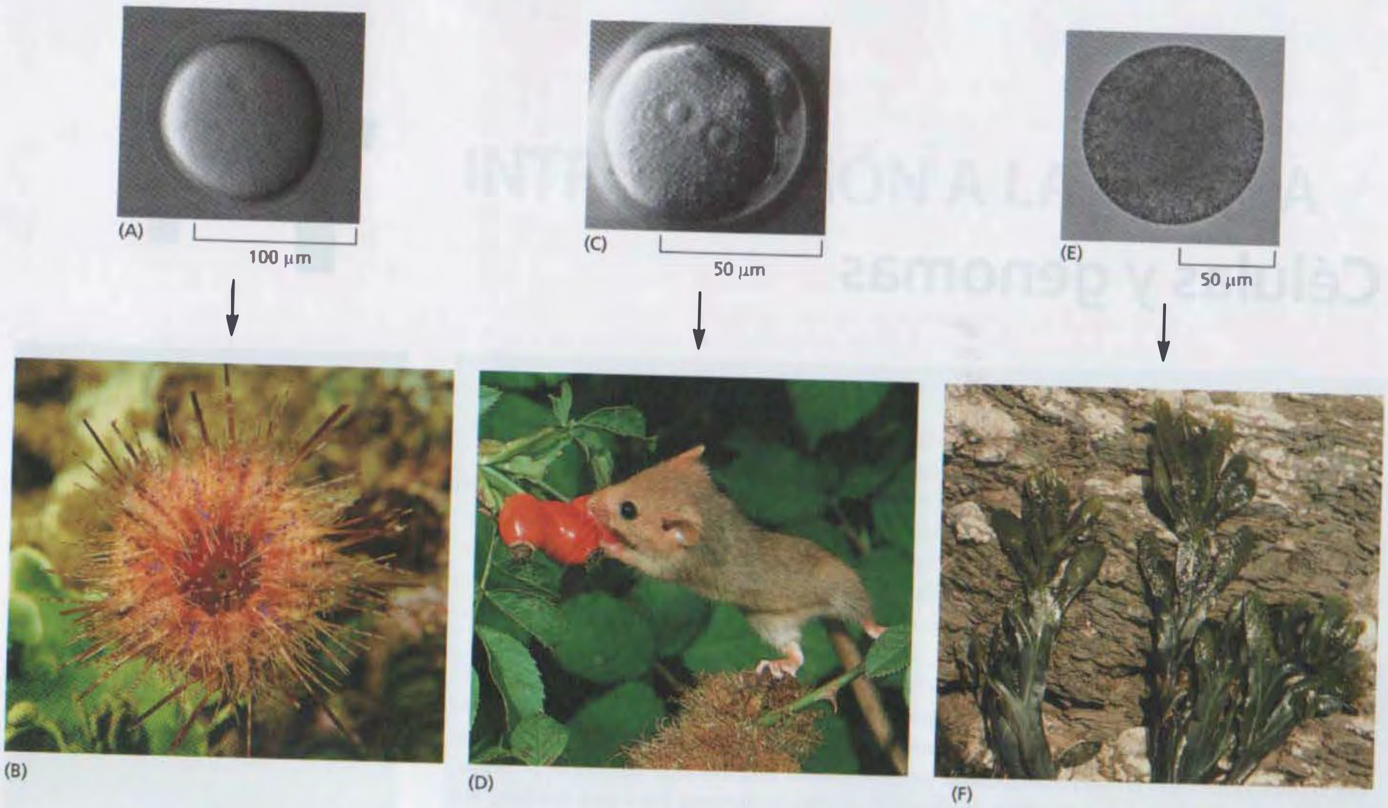


Figura 1-1 La información hereditaria de un óvulo fecundado determina la naturaleza de todo un organismo pluricelular. (A y B) Un óvulo de erizo de mar da lugar a un erizo de mar. (C y D) Un óvulo de ratón da lugar a un ratón. (E y F) Un óvulo del alga marina *Fucus* genera una alga *Fucus*. (A, cortesía de David McClay; B, cortesía de M. Gibbs, Oxford Scientific Films; C, cortesía de Patricia Calarco, de G. Martin, *Science* 209:768-776, 1980. Con la autorización de AAAS; D, cortesía de O. Newman, Oxford Scientific Films; E y F, cortesía de Colin Brownlee.)

Todas las células guardan su información hereditaria en el mismo código químico lineal (el DNA)

Los ordenadores nos han familiarizado con el concepto de la información como algo cuantificable –un millón de bytes para guardar algunos centenares de páginas de texto o una imagen procedente de una cámara digital, 600 millones para guardar la música en un CD, etc. También nos han hecho entender que una misma información se puede almacenar en diferentes formatos físicos. El desarrollo de la informática implica que los disquetes y las cintas de ordenador que utilizábamos hace 10 años para guardar nuestra información resultan ilegibles en las máquinas actuales. Las células vivas, igual que los ordenadores, contienen información; se estima que llevan evolucionando y diversificándose desde hace más de 3 mil millones y medio de años. Desde esta perspectiva, parecía poco probable que todas ellas guardasen la información de la misma manera y que los archivos de una célula pudiesen ser leídos por el sistema de lectura de otros tipos celulares. Sorprendentemente, esto es lo que ocurre. Todas las células vivas de la Tierra, sin ninguna excepción conocida, guardan su información hereditaria en forma de moléculas de DNA de doble cadena –dos largos polímeros paralelos no ramificados formados por cuatro tipos de monómeros. Estos monómeros, que denominamos con apodos de un alfabeto de cuatro letras –A, T, C, G– están unidos entre sí formando una larga secuencia lineal que codifica la información genética de la célula, de la misma manera que la secuencia de unos y ceros codifica la información en un ordenador. Podemos tomar un fragmento de DNA (ácido desoxirribonucleico: desoxiribonucleic acid) de una célula humana e inserirlo en una bacteria, o un fragmento de DNA de una bacteria e inserirlo en una célula humana, y esta información será leída, interpretada y copiada correctamente. En la actualidad, gracias a diversos métodos químicos, los científicos y científicas pueden obtener y leer la secuencia de monómeros presente en cualquier molécula de DNA –compuesta por millones de nucleótidos– y así descifrar la información hereditaria contenida en cada organismo.

Todas las células replican su información hereditaria mediante una polimerización sobre un molde

Los mecanismos que hacen posible la vida dependen de la estructura de la molécula del DNA de doble cadena. Cada monómero de una de las cadenas sencillas del DNA –denominado **nucleótido**– tiene dos partes: un azúcar (la desoxirribosa) con un grupo fosfato unido, y una *base* que puede ser adenina (A), guanina (G), citosina (C) o timina (T) (**Figura 1–2**). Cada azúcar está unido al siguiente azúcar de la cadena por el grupo fosfato mediante un enlace fosfodiéster y forma un polímero cuyo eje central está formado por los azúcares-fosfato y del cual sobresalen las bases. El polímero de DNA puede crecer por la unión de monómeros a uno de sus extremos. En el caso de una cadena sencilla de DNA, los monómeros pueden incorporarse al polímero de forma aleatoria, sin un orden preestablecido, ya que todos los nucleótidos pueden unirse entre sí del mismo modo en el sentido del crecimiento del polímero de DNA. Por el contrario, en la célula viva el DNA no se sintetiza como una cadena libre aislada sino sobre un patrón o molde de DNA de otra cadena preexistente. Las bases contenidas en la cadena patrón se unen a las bases de la nueva cadena siguiendo una estricta norma de complementariedad: A se une a T, y C se une a G. Este emparejamiento une a los nuevos monómeros en la cadena y además controla la selección del monómero que se añade a la cadena. De esta forma, una estructura de doble cadena consiste en dos secuencias complementarias de A, C, T y G. Además, las dos cadenas de nucleótidos se enrollan una sobre la otra generando una doble hélice (Figura 1–2E).

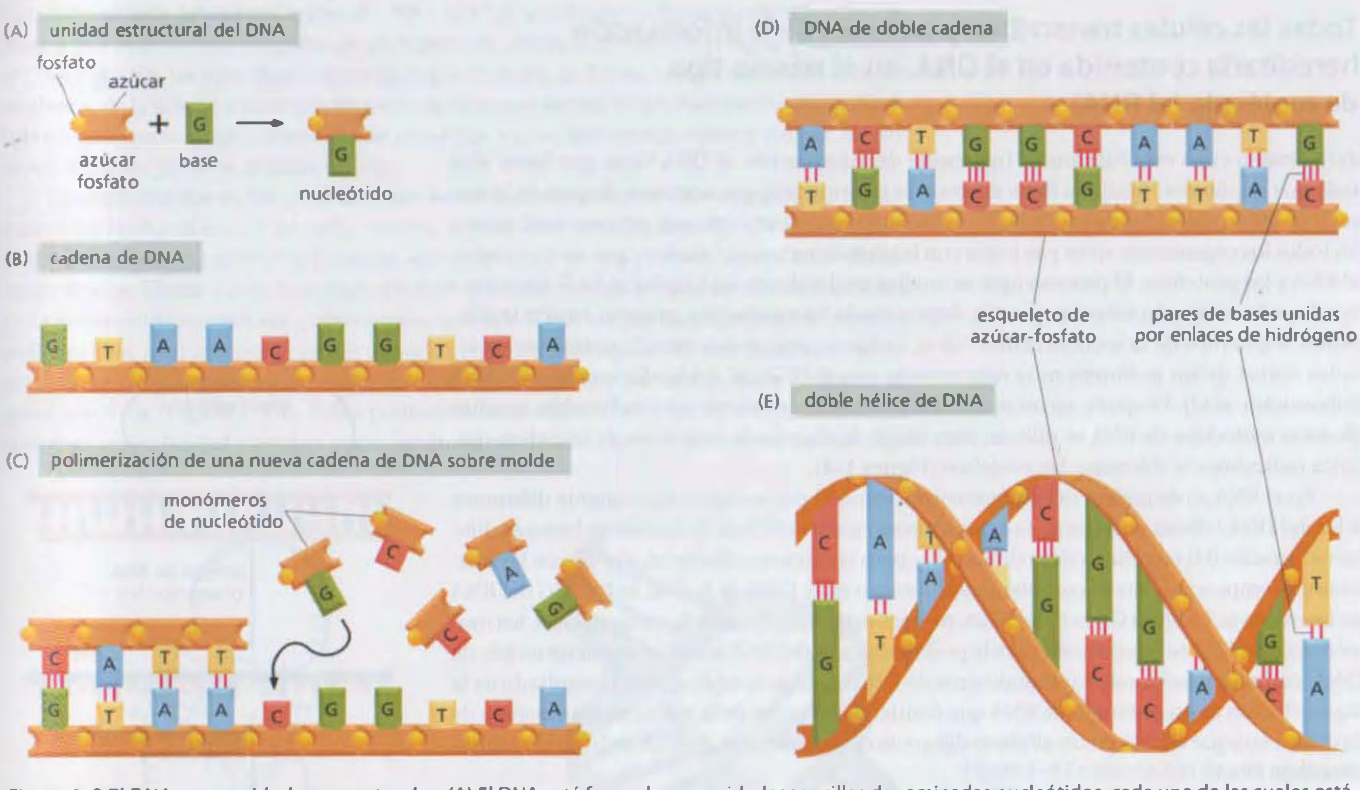


Figura 1–2 El DNA y sus unidades estructurales. (A) El DNA está formado por unidades sencillas denominadas nucleótidos, cada una de las cuales está formada por una molécula de azúcar, fosfato y un grupo lateral que contiene nitrógeno, o base. Las bases pueden ser de cuatro tipos (adenina, guanina, citosina o timina), que corresponden a los cuatro nucleótidos distintos que denominamos A, G, C y T. (B) Una cadena sencilla de DNA está formada por nucleótidos unidos entre sí por enlaces azúcar-fosfato. Nótese que cada una de las unidades de azúcar-fosfato son asimétricas, generando un esqueleto o cadena que tiene una direccionalidad determinada o polaridad. Esta direccionalidad guía los procesos moleculares por los que la información del DNA es interpretada y copiada en las células: la información siempre se "lee" en una dirección consistente, como un texto en español que se escribe y se lee de izquierda a derecha. (C) Gracias a esta polimerización sobre un molde, la secuencia de nucleótidos de una cadena de DNA determina la secuencia en la que los nucleótidos se unen en la cadena de DNA en crecimiento; una T de una cadena se empareja con una A de la otra, y una G de una cadena se empareja con una C de la otra. La nueva cadena presenta una secuencia de nucleótidos complementaria a la de la cadena antigua y un esqueleto con la direccionalidad opuesta: a la secuencia GTAA... de la cadena original le corresponde la secuencia ...TTAC. (D) Una molécula de DNA normal está formada por dos cadenas complementarias. Los nucleótidos de cada cadena están unidos por enlaces fuertes (covalentes); los nucleótidos complementarios de las cadenas opuestas se unen entre sí mediante enlaces de hidrógeno, más débiles. (E) Las dos cadenas se enroscan una alrededor de la otra y forman una doble hélice: una estructura resistente que puede acomodar cualquier secuencia de nucleótidos sin alterar su estructura básica.

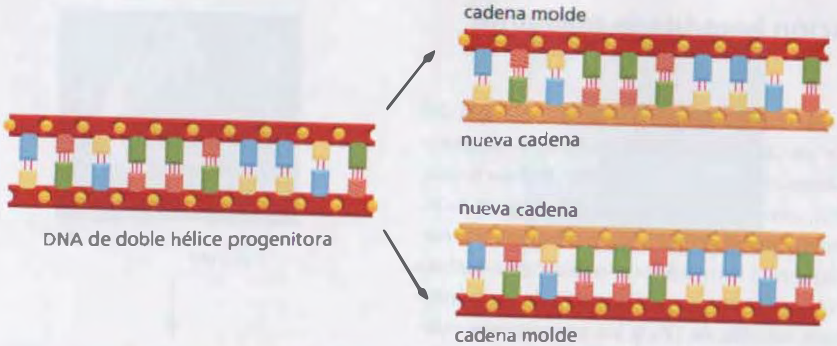


Figura 1–3 Copiado de la información genética por replicación del DNA. En este proceso, las dos cadenas de una doble hélice de DNA se separan y cada una de ellas actúa de molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria.

Los enlaces establecidos entre las bases son débiles si se comparan con las uniones azúcar-fosfato del resto del esqueleto. Esta debilidad permite separar las dos cadenas de DNA sin forzar la rotura de su esqueleto. Cada una de las cadenas puede comportarse como un molde o patrón en la síntesis de un nuevo DNA, una nueva copia de información hereditaria (**Figura 1–3**). En diferentes tipos celulares, el proceso de **replicación del DNA** se produce a velocidades diferentes, con controles de inicio y final diferentes y con moléculas reguladoras auxiliares diferentes. Pero la base del proceso es universal: el DNA constituye el almacén de la información y la *polimerización sobre un patrón* o *molde* es el modo en el que esta información hereditaria se copia y se transmite a lo largo del mundo vivo.

Todas las células transcriben porciones de la información hereditaria contenida en el DNA, en el mismo tipo de molécula (el RNA)

Para llevar a cabo esta función de transporte de información, el DNA tiene que hacer algo más que duplicarse. También debe expresar la información que contiene dirigiendo la síntesis de otras moléculas de la célula. El mecanismo responsable de este proceso es el mismo en todos los organismos vivos y se inicia con la síntesis secuencial de dos tipos de moléculas: el RNA y las proteínas. El proceso (que se analiza en detalle en los Capítulos 6 y 7) comienza con la polimerización sobre un patrón, denominada **transcripción**, proceso en el que diferentes segmentos de la secuencia de DNA se utilizan como molde para la síntesis de moléculas cortas de un polímero muy relacionado con el DNA: el **ácido ribonucleico** o **RNA** (ribonucleic acid). Después, en un proceso más complejo denominado **traducción**, muchas de estas moléculas de RNA se utilizan para dirigir la síntesis de polímeros de una clase química radicalmente diferente: las *proteínas* (**Figura 1–4**).

En el RNA, el esqueleto del polímero está formado por azúcares ligeramente diferentes a los del DNA (ribosa en lugar de la desoxirribosa) y, además, una de las cuatro bases es diferente –uracilo (U) en el lugar de la timina (T)– pero las otras tres bases –A, C y G– son las mismas y se emparejan con su complementaria como en el DNA: la A, el U, la C y la G del RNA se unen con la T, la A, la G y la C del DNA, respectivamente. Durante la transcripción, los monómeros de RNA se seleccionan para la polimerización del RNA sobre una cadena molde de DNA, como se seleccionan los monómeros de DNA durante la replicación. El resultado de la transcripción es un polímero de RNA que contiene una parte de la información genética de la célula, aunque escrita en un alfabeto diferente de monómeros de RNA en lugar de monómeros de DNA.

Un mismo fragmento de la secuencia de DNA se puede utilizar varias veces para guiar la síntesis de muchos transcritos de RNA idénticos entre sí. De esta forma, mientras que el archivo de información de la célula –en el DNA– es fijo y "sagrado", los transcritos de RNA se producen en gran número y son desechables (**Figura 1–5**). Como veremos, estos transcritos se utilizan como intermediarios en la transferencia de la información genética: principalmente actúan como un **RNA mensajero (mRNA: messenger RNA)** que dirige la síntesis de proteínas de acuerdo con las instrucciones almacenadas en el DNA.

Las moléculas de RNA presentan estructuras moleculares particulares que les confieren capacidades químicas sorprendentes. En forma de cadena sencilla, su esqueleto es flexible de manera que puede plegarse sobre sí mismo estableciendo uniones débiles entre diferentes partes de la misma molécula. Este fenomeno ocurre cuando fragmentos de la se-

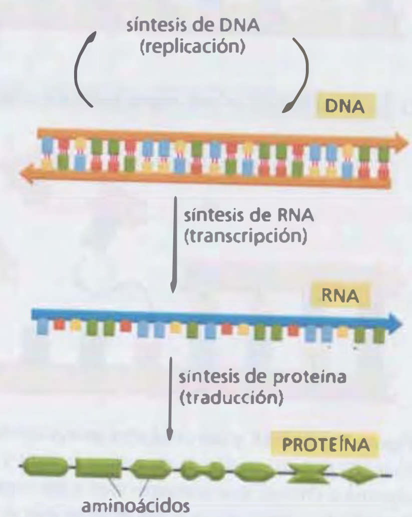


Figura 1–4 Del DNA a la proteína. La información genética se utiliza a través de un proceso que tiene dos etapas. En primer lugar, en la *transcripción*, segmentos de la secuencia del DNA se utilizan para guiar la síntesis de moléculas de RNA. Entonces, en la *traducción*, las moléculas de RNA se utilizan para guiar la síntesis de moléculas de proteína.

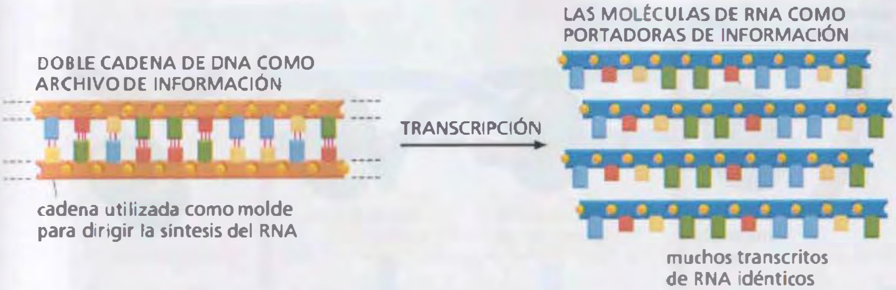


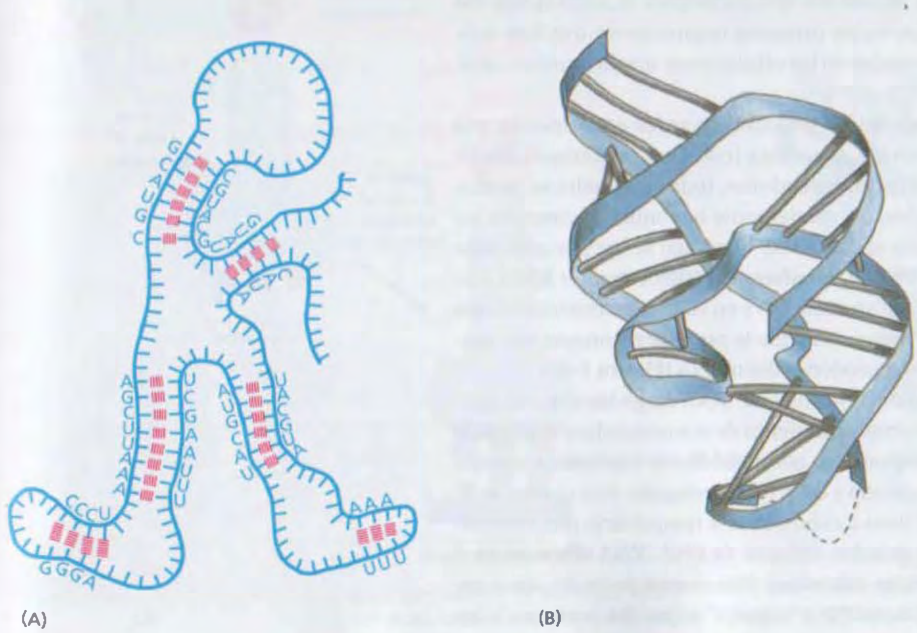
Figura 1–5 Cómo se transmite la información genética para que pueda ser utilizada en la célula. Cada célula contiene un conjunto fijo de moléculas de DNA –su archivo de información genética. Un segmento determinado de su DNA guía la síntesis de muchas moléculas idénticas de transcritos de RNA, que se utilizan como copias de trabajo de la información almacenada en el archivo. Se pueden hacer muchos conjuntos de moléculas de RNA diferentes transcribiendo partes determinadas de una larga secuencia de DNA, lo cual permite a cada célula utilizar su almacén de información de una manera diferente.

cuencia del RNA son localmente complementarios: por ejemplo un fragmento ...GGGG... tiene tendencia a asociarse con un fragmento de la molécula de secuencia ...CCCC... Estas asociaciones internas permiten al RNA plegarse por regiones concretas de su molécula (**Figura 1–6**). La forma de la molécula de RNA, fruto de este plegamiento, le permite reconocer y unirse a otras moléculas y, en ocasiones, catalizar cambios químicos en las moléculas a las que se han unido. Como veremos más adelante en el Capítulo 6, unas cuantas reacciones químicas catalizadas por el RNA son cruciales para algunos de los procesos más antiguos y básicos de las células vivas, lo cual ha sugerido que una catálisis más general guiada por el RNA llegó a desempeñar un papel crucial en la evolución inicial de la vida.

Todas las células utilizan las proteínas como catalizadores

Las moléculas de **proteínas**, como el DNA o el RNA, son largas cadenas no ramificadas formadas por monómeros tomados de un repertorio idéntico en todas las células vivas. Como el DNA y el RNA, las proteínas contienen la información en forma de una secuencia lineal de símbolos, de la misma forma que un mensaje humano escrito en un manuscrito. En cada célula existen muchos tipos diferentes de proteínas, y si no tenemos en cuenta el agua, constituyen la mayor parte de la masa celular.

Los monómeros de las proteínas, los **aminoácidos**, son muy diferentes de los monómeros del DNA o el RNA, y además, existen 20 tipos diferentes en lugar de 4. Todos los aminoácidos tienen una estructura central semejante, por la que pueden unirse a los demás aminoácidos. Unido a esta estructura central, se encuentra un grupo lateral que confiere a cada aminoácido su carácter químico característico. Cada una de las moléculas proteicas o **polipéptidos**, formada por la unión de varios aminoácidos siguiendo una secuencia determinada, se pliega y genera una estructura tridimensional que en su superficie presenta lugares reactivos (**Figura 1–7A**). Estos polímeros de aminoácidos se unen a otras moléculas con gran especificidad y actúan como **enzimas** catalizando reacciones en las que se rom-



(A) (B)

Figura 1–6 Conformación de una molécula de RNA. (A) El emparejamiento de los nucleótidos entre diferentes regiones del mismo polímero de RNA hace que la molécula adopte una forma característica. (B) Estructura tridimensional de una molécula de RNA, la del virus de la hepatitis delta, que cataliza la rotura de la cadena de RNA. La cinta *azul* representa el esqueleto azúcar-fosfato; las barras representan pares de bases. (B, basado en A.R. Ferré D'Amaré, K. Zhou y J.A. Doudna. *Nature* 395:567-574, 1998. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

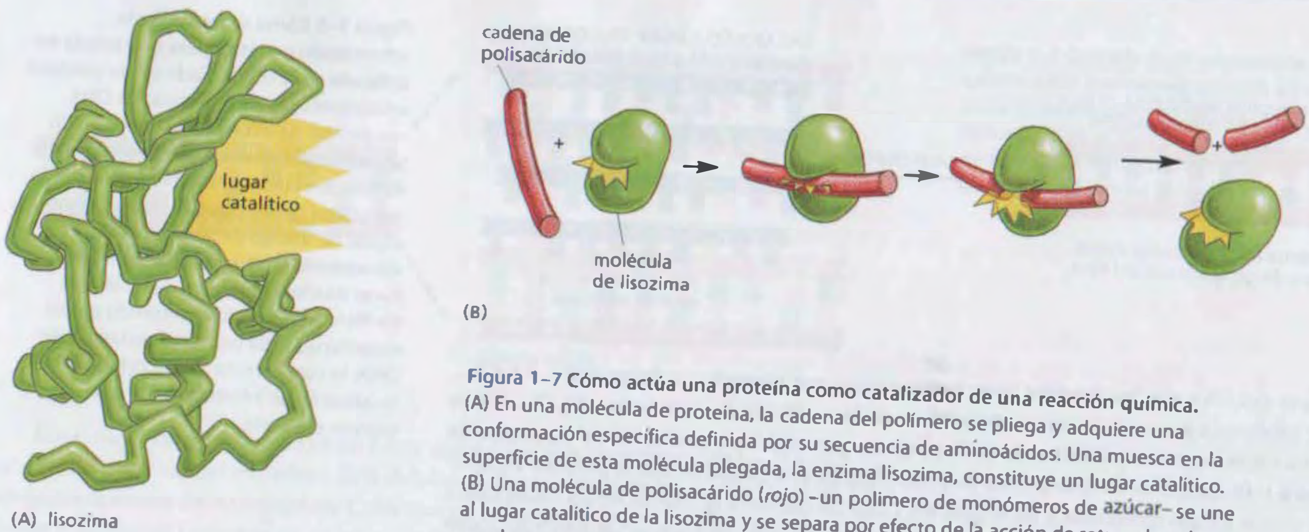


Figura 1–7 Cómo actúa una proteína como catalizador de una reacción química. (A) En una molécula de proteína, la cadena del polímero se pliega y adquiere una conformación específica definida por su secuencia de aminoácidos. Una muesca en la superficie de esta molécula plegada, la enzima lisozima, constituye un lugar catalítico. (B) Una molécula de polisacárido (*rojo*) –un polímero de monómeros de **azúcar**– se une al lugar catalítico de la lisozima y se separa por efecto de la acción de rotura de enlaces covalentes catalizada por los aminoácidos que rodean a la muesca.

pen o se forman enlaces covalentes. De esta forma, dirigen la gran mayoría de procesos químicos de la célula (Figura 1–7B). Las proteínas tienen muchas otras funciones –mantienen estructuras celulares, generan movimientos, traducen señales, etc.–; cada proteína cumple una función específica de acuerdo con su secuencia de aminoácidos especificada genéticamente. Las proteínas son las moléculas que ponen en acción la información genética de la célula.

Así, los polinucleótidos especifican la secuencia de los aminoácidos de las proteínas. A su vez, las proteínas catalizan muchas reacciones químicas en la célula, entre las que se incluye la síntesis de las moléculas de DNA y las reacciones a través de las cuales la información genética del DNA se utiliza para sintetizar tanto el RNA como las proteínas. Esta retroalimentación es la base del comportamiento autocatalítico y autorreproductivo de los organismos vivos (**Figura 1–8**).

Todas las células traducen de la misma manera el RNA a proteína

La traducción de la información genética contenida en el alfabeto de 4 letras de los polinucleótidos al alfabeto de 20 letras de las proteínas es un proceso complejo. Las reglas de esta traducción parecen en algunos aspectos claras y racionales y en otros aspectos peculiarmente arbitrarias. Estas normas (con pocas excepciones) son idénticas en todos los seres vivos. Se cree que estas arbitrariedades reflejan accidentes que sucedieron durante la historia inicial de la vida –propiedades que cambiaron en los primeros organismos y que han subsistido por la herencia y han quedado tan arraigadas en las células vivas que no pueden cambiarse sin producir efectos desastrosos.

La información contenida en la secuencia del RNA mensajero se lee en grupos de tres nucleótidos: cada triplete de nucleótidos, o *codón*, especifica (codifica) un aminoácido de una proteína. Debido a que hay 64 ($= 4 \times 4 \times 4$) posibles codones, todos los cuales se producen en la naturaleza, pero sólo 20 aminoácidos, necesariamente hay muchos casos en los que varios codones corresponden a un mismo aminoácido. El código se lee por una clase especial de pequeñas moléculas de RNA, el **RNA de transferencia (tRNA**: **t**ranfer **RNA)**. Cada tipo de tRNA une en uno de sus extremos a un aminoácido y en su otro extremo tiene una secuencia específica de tres nucleótidos –un *anticodón*– que le permite reconocer por emparejamiento de bases, un codón o subgrupos de codones del mRNA (**Figura 1–9**).

Para la síntesis de proteínas, un conjunto de moléculas de tRNA cargadas con sus aminoácidos respectivos se unen a un mRNA por emparejamiento de sus anticodones con cada uno de los codones sucesivos del mRNA. Después, los aminoácidos se van uniendo entre ellos de forma que la proteína naciente va creciendo y cada tRNA, relegado de su carga, se libera. Este complejo conjunto de procesos se lleva a cabo por una maquinaria macromolecular gigante, el ribosoma, formada por dos grandes cadenas de RNA (**RNA ribosómico** o **rRNA**, de ribosomal **RNA)** y más de 50 proteínas diferentes. Este complejo molecular muy antiguo se une a un extremo de una molécula de mRNA y "cabalga" sobre ella capturando las

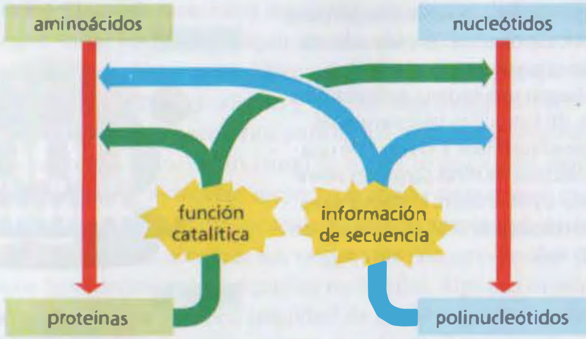


Figura 1–8 La vida es un proceso autocatalítico. Los polinucleótidos (polímeros de nucleótidos) y las proteínas (polímeros de aminoácidos) proporcionan la información de la secuencia y de las funciones catalíticas que –a través de un conjunto complejo de reacciones químicas– elaboran la síntesis de polinucleótidos y de proteínas del mismo tipo.

moléculas de tRNA cargadas y dirigiendo la unión de los aminoácidos que transportan; el resultado del proceso es la formación de una nueva cadena proteica (**Figura 1–10**).

El gen es el fragmento de la información genética que corresponde a una proteína

Por regla general, las moléculas de DNA son muy largas y contienen la especificación de miles de proteínas. Los segmentos de esta secuencia completa del DNA se transcriben en diferentes moléculas de mRNA, cada uno de los cuales codifica una proteína diferente. Cada unos de estos segmentos de DNA representa un **gen**. Una complicación adicional es que a menudo las moléculas de RNA transcritas a partir de un mismo segmento de DNA pueden ser procesadas de más de una manera diferente, generando una colección de versiones alternativas de cada proteína, especialmente en las células más complejas como son las de los vegetales y de los animales. Así pues, un gen se define de una forma general como un fragmento de la secuencia del DNA que corresponde a una sola proteína o a una colección de variantes de una proteína (o a una molécula de RNA catalítico o estructural, en el caso de los genes que no producen proteína sino RNA).

En todas las células, la *expresión* de determinados genes está regulada: en lugar de sintetizar el catálogo completo de posibles proteínas en todo momento, la célula ajusta la velocidad de transcripción y de traducción de diferentes genes de forma independiente y de acuerdo con sus necesidades. En el DNA celular existen secuencias de DNA no-codificantes –denominadas *DNA regulador*, distribuidas entre las regiones codificantes de proteínas, que se unen a proteínas especiales que controlan la velocidad local de transcripción

Figura 1–9 El RNA de transferencia. (A) Una molécula de tRNA especifica para el aminoácido triptófano. Un extremo de la molécula de tRNA está unido al triptófano, mientras que el otro muestra la secuencia de nucleótidos CCA (su anticodón) que reconoce el codón del triptófano presente en las moléculas del RNA mensajero. (B) Estructura tridimensional de la molécula de tRNA del triptófano. Obsérvese que el codón y el anticodón en (A) están en orientación antiparalela, como las dos hebras de un DNA de doble hélice (véase Figura 1-2). Por esta razón la secuencia del anticodón, en el tRNA, se lee de derecha a izquierda, mientras que la del codón en el mRNA, se lee de izquierda a derecha.

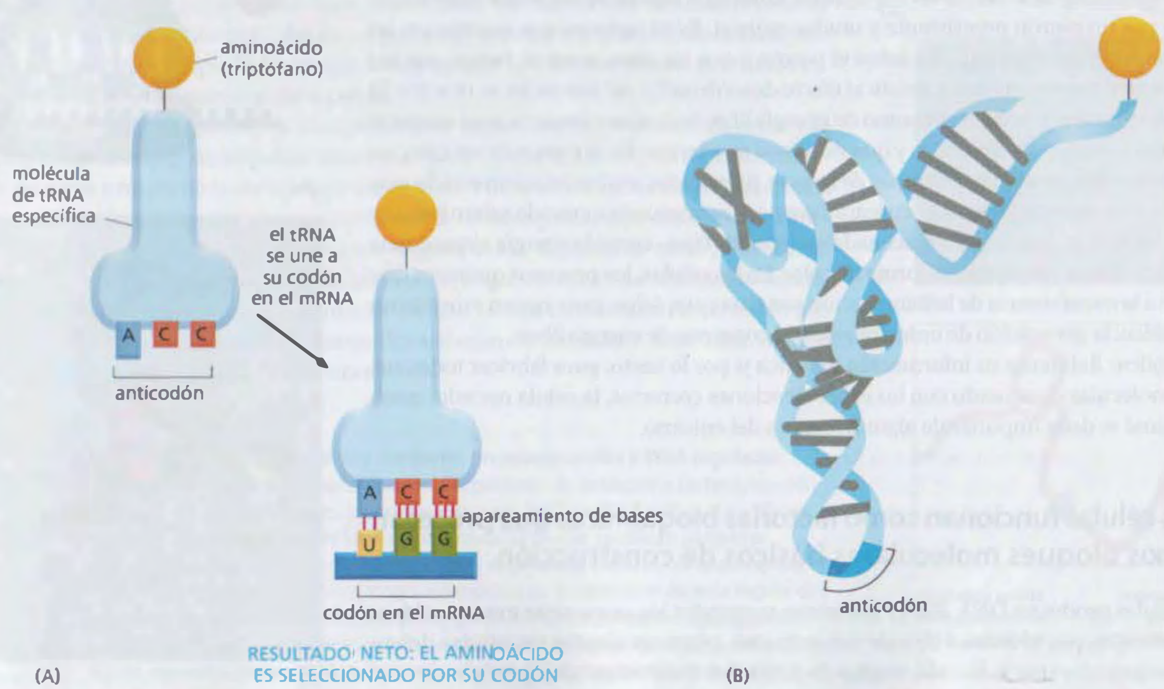
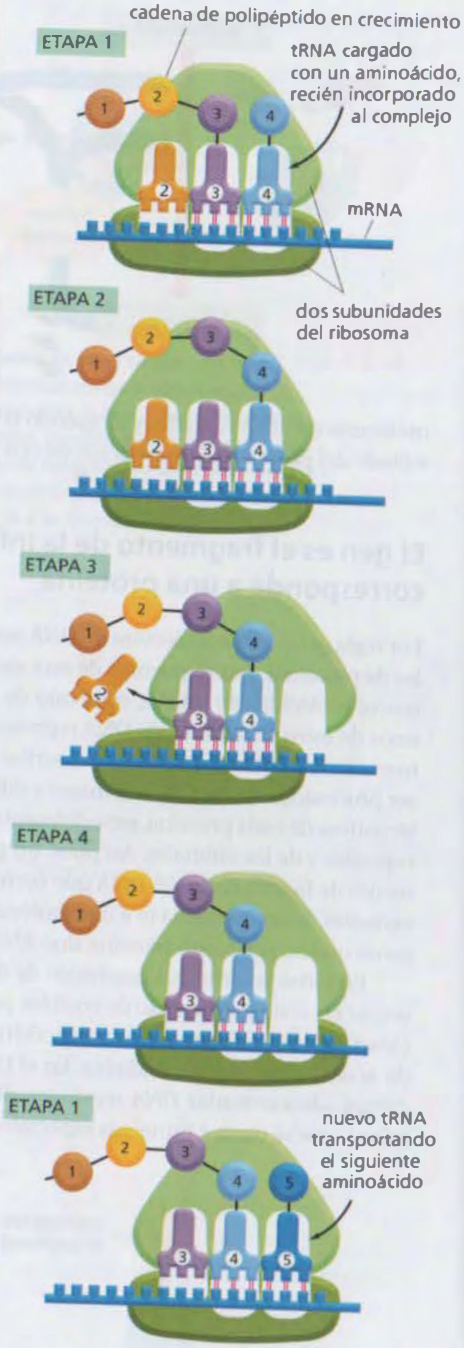
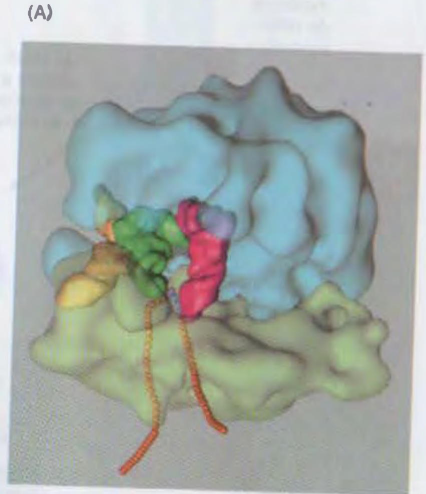


Figura 1–10 Un ribosoma trabajando. (A) El esquema muestra cómo se desplaza un ribosoma a lo largo de una molécula de mRNA, capturando las moléculas de tRNA cuyos anticodones coinciden con los codones presentes en el mRNA, y uniendo los aminoácidos que transportan para formar una cadena polipeptídica. El mRNA especifica la secuencia de aminoácidos. (B) Estructura tridimensional de un ribosoma bacteriano (*verde claro* y *azul*), desplazándose a lo largo de una molécula de mRNA (esferas *naranja*) con tres moléculas de tRNA (*amarillo, verde* y *rosado*) en diferentes fases del proceso de captura y liberación. El ribosoma es un complejo gigante de más de 50 proteínas y moléculas de RNA. (B, cortesía de Joachim Frank, Yanhong Li y Rajendra Agarwal.)



(A)


(B)

(**Figura 1–11**). Existen también otras regiones no-codificantes, algunas de las cuales actúan como elementos de puntuación, indicando el inicio y el final de la información de una proteína. La cantidad y la organización de las regiones reguladoras y no-codificantes en el DNA varía enormemente entre una clase de organismo y otro, pero la estrategia básica es universal. En este sentido, el **genoma** de una célula –la totalidad de la información genética incluida en su secuencia completa de DNA– dicta no sólo la naturaleza de las proteínas celulares, sino también cuándo y dónde se sintetizarán.

La vida necesita energía libre

Una célula viva es un sistema químico dinámico que actúa lejos del equilibrio químico. Para que una célula crezca o genere otra célula idéntica a sí misma, necesita captar del entorno, además de los materiales para la construcción, energía libre para dirigir las reacciones sintéticas necesarias. Este consumo de energía libre es fundamental para la vida. Cuando se detiene, la célula se va acercando al equilibrio químico y pronto muere.

La información genética también es fundamental para la vida. ¿Existe alguna conexión entre estos dos procesos? La respuesta es positiva: la energía libre es necesaria para la propagación de la información. Por ejemplo, para especificar un bit de información –que consiste en escoger una entre dos alternativas igualmente probables– hace falta utilizar una cierta cantidad de energía libre que se puede calcular. La relación cuantitativa entre ambas cantidades requiere algunos razonamientos más o menos profundos y depende de la definición precisa del término "energía libre" (tratado en el Capítulo 2). No obstante, no es difícil de entender intuitivamente.

Imaginemos las moléculas de una célula como un enjambre de objetos dotados de energía térmica, que se desplazan violentamente al azar y que chocan entre ellos. Para determinar una información genética –por ejemplo en forma de una secuencia de DNA– las moléculas de este maremagnum agitado deben ser capturadas, colocadas siguiendo un orden determinado definido por un patrón preexistente y unidas entre sí. Estas uniones que mantienen las moléculas en sus lugares adecuados sobre el patrón y que las unen entre sí, tienen que ser suficientemente fuertes como para resistir el efecto desordenador del movimiento térmico. El proceso se lleva a cabo gracias al consumo de energía libre, la cual es necesaria para asegurar que se forman los enlaces adecuados y que éstos son resistentes. En el caso más sencillo, las moléculas se pueden comparar a trampas de resorte, preparadas a saltar hasta un estado más estable, de menor energía, cuando encuentran sus parejas adecuadas; cuando saltan juntas y se unen, su contenido de energía almacenada –su energía libre– como la energía almacenada en el resorte, se libera y se disipa en forma de calor. En las células, los procesos químicos que acompañan a la transferencia de la información son más complejos, pero siguen este mismo principio básico: la generación de orden requiere el consumo de energía libre.

Para replicar fielmente su información genética y, por lo tanto, para fabricar todas sus complejas moléculas de acuerdo con las especificaciones correctas, la célula necesita energía libre, la cual se debe importar de alguna manera del entorno.

Todas las células funcionan como factorías bioquímicas que procesan los mismos bloques moleculares básicos de construcción

Todas las células producen DNA, RNA y proteínas, y en todos los casos estas macromoléculas están formadas por el mismo tipo de subunidades, por lo que todas las células deben contener y manipular una colección similar de pequeñas moléculas, incluyendo azúcares,

nucleótidos y aminoácidos, así como otras sustancias necesarias de forma universal para su síntesis. Por ejemplo, todas las células requieren el nucleótido fosforilado *ATP* (*adenosina trifosfato*: adenosine triphosphate) como bloque de construcción para la síntesis del DNA y del RNA. Además, todas las células producen y utilizan esta molécula como transportadora de energía libre de grupos fosfato necesarios para dirigir muchas otras reacciones químicas.

Aunque todas las células funcionan como factorías bioquímicas esencialmente de la misma forma, se diferencian en detalles respecto al modo de procesar muchas de las pequeñas moléculas. A diferencia de lo que ocurre con las macromoléculas relacionadas con la información, no resulta fácil caracterizar los rasgos que son universales de las reacciones químicas en las que intervienen estas pequeñas moléculas. Algunos organismos, como las plantas, para poder elaborar la práctica totalidad de estas pequeñas moléculas orgánicas únicamente requieren nutrientes sencillos y energía solar. Por el contrario, otros organismos como los animales se alimentan de seres vivos y obtienen ya elaboradas muchas de las moléculas orgánicas. Volveremos a este punto más adelante.

Todas las células están envueltas por una membrana plasmática por la que deben pasar los nutrientes y los materiales de desecho

Como mínimo existe otra característica de las células que es universal: cada célula está incluida dentro de una membrana, la denominada **membrana plasmática**. Este contenedor actúa como una barrera selectiva permitiendo a la célula concentrar los nutrientes que obtiene de su ambiente y, a su vez, retener los productos que sintetiza para su uso propio, con la excepción de los productos de desecho. Sin la presencia de una membrana plasmática, la célula no podría mantener su integridad como un sistema químico coordinado.

Las moléculas que forman esta membrana tienen la propiedad fisicoquímica de ser *anfifílicas*, esto es, tienen una parte que es hidrofóbica (insoluble en agua) y otra parte que es hidrofílica (soluble en agua). Cuando estas moléculas se colocan en agua, se agregan espontáneamente y ordenan sus porciones hidrofóbicas de forma que estén en el máximo contacto posible entre ellas escondiéndolas del agua, mientras que sus porciones hidrofílicas quedan expuestas al agua. Las moléculas anfifílicas adecuadas, como las moléculas de fosfolípidos que constituyen la mayor parte de la membrana plasmática, se agregan de forma espontánea en el agua y originan una *bicapa* que genera pequeñas vesículas cerradas (**Figura 1-12**). Este fenómeno se puede poner de manifiesto en el laboratorio mezclando fosfolípidos y agua: bajo condiciones apropiadas se forman pequeñas vesículas cuyo contenido acuoso está aislado del medio externo.

Aunque los detalles químicos son variables para cada caso concreto, las colas hidrofóbicas de las moléculas predominantes en las membranas celulares son polímeros hidrocarbonados ($-CH_2-CH_2-CH_2-$). Su ensamblaje espontáneo formando una vesícula bilaminar constituye uno de los muchos ejemplos de un principio general importante: las células producen moléculas cuyas propiedades químicas hacen que se *autoensamblen* formando estructuras moleculares necesarias para la célula.

El contorno celular no puede ser completamente impermeable. Si una célula crece y se reproduce, debe ser capaz de importar materiales para su crecimiento y de exportar materiales de desecho a través de la membrana plasmática. Por lo tanto, todas las células tienen en su membrana plasmática proteínas especializadas en transportar específicamente moléculas desde un lado al otro de esta membrana (**Figura 1-13**). Algunas de estas *proteínas de transporte de membrana*, como algunas de las proteínas que catalizan las reacciones fundamentales de pequeñas moléculas en el interior celular, se han conservado de tal modo a lo largo de la evolución que podemos reconocer las semejanzas familiares entre ellas, incluso entre los grupos más distantes de organismos vivos.

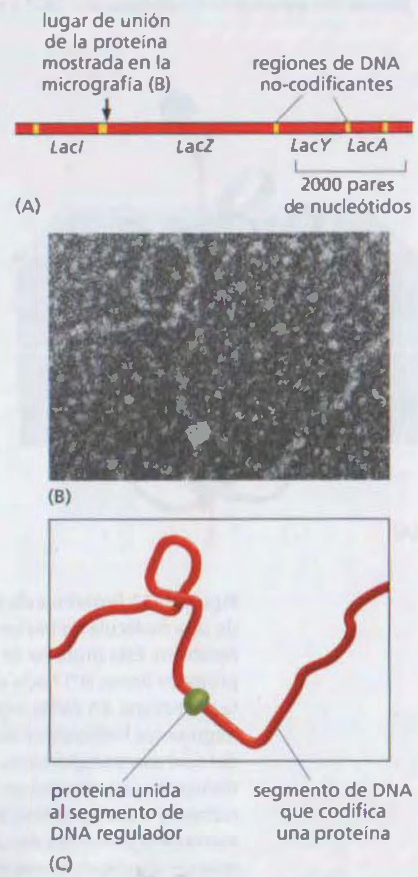


Figura 1-11 Regulación génica mediante proteínas unidas a DNA regulador. (A). Diagrama de una pequeña porción del genoma de la bacteria *Escherichia coli*. Esta porción contiene genes (denominados *LacI, LacZ, LacY* y *LacA*) que codifican 4 proteínas diferentes. Entre los fragmentos de DNA que codifican proteínas (*rojo*) existen segmentos reguladores y otros segmentos de DNA no-codificantes (*amarillo*). (B) Imagen de microscopía electrónica de transmisión de esta región del DNA, con una proteína (codificada por el gen *LacI*) unida al fragmento regulador; esta proteína controla la velocidad de transcripción de los genes *LacZ, LacY* y *LacA*. (C) Un esquema de las estructuras mostradas en (B). (B, cortesía de Jack Griffith.)

El transporte de proteínas en la membrana plasmática determina en gran medida las moléculas que entran en la célula y las proteínas catalíticas del interior de la célula determinan las reacciones que sufren estas moléculas. Así pues, especificando las proteínas que fabrica la célula, la información genética almacenada en la secuencia del DNA determina no sólo las propiedades químicas de la célula, sino también su forma y su comportamiento, ya que ambos procesos están gobernados y controlados por las proteínas de la célula.

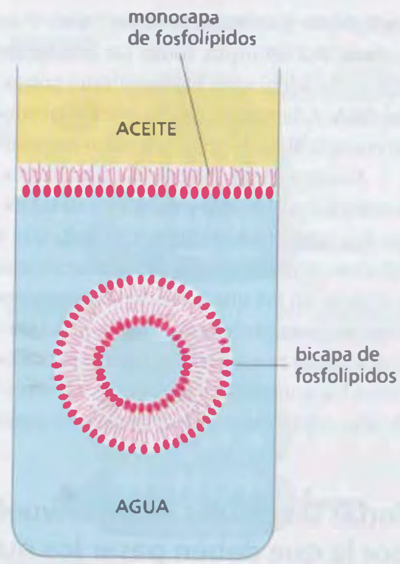


Figura 1-12 Formación de una membrana por moléculas anfifílicas de fosfolípidos. Estas moléculas presentan una cabeza hidrofílica (soluble en agua, fosfato) y una cola hidrofóbica (insoluble en agua, hidrocarbonada). En una interfase entre aceite y agua, las moléculas se agregan entre sí formando una lámina, con sus cabezas orientadas hacia el agua y sus colas orientadas hacia el aceite. Cuando se sumergen en agua, se agregan formando bicapas que albergan compartimientos acuosos.

Una célula viva puede existir con menos de 500 genes

El principio básico de la transferencia de información biológica es bastante sencillo, pero ¿qué complejidad tienen las células vivas en realidad? Concretamente, ¿cuáles son los requerimientos mínimos para la vida? Podemos tener una respuesta aproximada considerando una especie que tiene uno de los genomas conocidos más pequeño –la bacteria *Mycoplasma genitalium* (**Figura 1-14**). Este organismo vive como parásito en los mamíferos y su ambiente le proporciona, ya sintetizadas, muchas de sus pequeñas moléculas. Sin embargo, tiene que sintetizar todas las grandes moléculas –(DNA, RNA y proteínas)– que necesita para el proceso de la herencia. Sólo tiene 480 genes en su genoma de 580.070 pares de nucleótidos, que representan 145.018 bytes de información, aproximadamente lo que se necesitaría para almacenar la información de un capítulo de este libro. La biología celular puede ser complicada, pero no imposible.

Es probable que el número mínimo de genes necesarios para que una célula sea viable en un entorno actual no sea menor de 200-300, a pesar de que sin ninguna excepción conocida, el juego central de genes que comparten todas las especies vivas es de unos 60.

Resumen

Los organismos vivos se reproducen a sí mismos transmitiendo su información genética a su progenie. Cada célula es la unidad autorreproductiva más pequeña y es el vehículo de transmisión de la información genética en todas las especies vivas. Cada célula de nuestro planeta guarda su información genética en la misma forma química –una doble cadena de DNA. La célula replica su información separando las cadenas de DNA y utiliza cada una de ellas como molde para la polimeri-

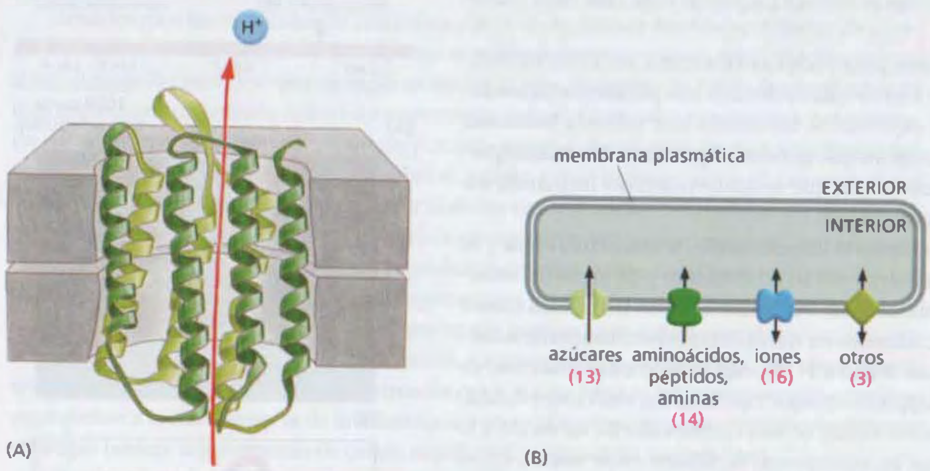


Figura 1-13 Proteínas de transporte a través de la membrana. (A) Estructura de una molécula de bacteriorrodopsina, de una arqueobacteria, *Halobacterium halobium*. Esta proteína de transporte utiliza la energía de la luz para bombear protones (iones H^+) hacia el exterior de la célula. La cadena polipeptídica atraviesa la membrana. En varias regiones presenta una conformación helicoidal y estos fragmentos helicoidales se ordenan y forman las paredes de un canal a través del cual son transportados los iones. (B) Esquema del conjunto de proteínas de transporte encontradas en la membrana de la bacteria *Thermotoga maritima*. Los números entre paréntesis se refieren al número de proteínas de transporte de membrana diferentes de cada tipo. La mayoría de las proteínas de cada clase están relacionadas evolutivamente con el resto y con sus equivalentes en otras especies.



(A) 5 µm



(B) 0,2 µm

Figura 1–14 *Mycoplasma genitalium*. (A) Electromicrografía de barrido mostrando la forma irregular de la bacteria, debido a la ausencia de una pared celular rígida. (B) Sección (electromicrografía de transmisión) de una célula de *Mycoplasma*. De los 477 genes de *Mycoplasma genitalium*, 37 de ellos codifican los tRNA, rRNA y otros RNA no mensajeros. Se conocen o intuyen las funciones de 297 genes que codifican proteínas. De ellos, 153 están involucrados en la replicación, la transcripción, la traducción y en otros procesos en los que participan DNA, RNA y proteína; otros 29 codifican proteínas de la membrana y estructuras superficiales de la célula; 33 están involucrados en el transporte de nutrientes y de otras moléculas a través de la membrana; 71 participan en la conversión de energía y en la síntesis y degradación de pequeñas moléculas y 11 participan en la regulación del ciclo celular y otros procesos. (A, cedida por S. Razin y cols. *Infect. Immun.* 30:538-546, 1980. Con la autorización de la American Society for Microbiology; B, por cortesía de Roger Cole, en Medical Microbiology 4.ª ed., [S. Baron ed.]. Galveston: University of Texas, Medical Branch, 1996.)

zación de una nueva cadena de DNA de secuencia complementaria de nucleótidos. La misma estrategia de polimerización sobre un molde se utiliza para transcribir porciones de la información desde el DNA a moléculas formadas por un polímero similar, el RNA. El RNA, a su vez, dirige la síntesis de moléculas de proteína mediante una maquinaria de traducción mucho más compleja, en la que participa una gran máquina plurimolecular, el ribosoma, compuesto por RNA y proteína. Las proteínas son los principales catalizadores de casi todas las reacciones químicas de la célula; sus otras funciones incluyen el control selectivo de la importación y de la exportación de pequeñas moléculas a través de la membrana plasmática que delimita la célula. La función específica de cada proteína depende de su secuencia de aminoácidos, la cual está especificada en la secuencia de nucleótidos de un fragmento de DNA, esto es, el gen que codifica esa proteína. De esta forma, el genoma de una célula determina sus propiedades químicas y las propiedades químicas de todas las células vivas son básicamente similares ya que deben permitir la síntesis de DNA, RNA y proteínas. Las células más sencillas que se conocen en la actualidad tienen algo menos de 500 genes.

LA DIVERSIDAD DEL GENOMA Y EL ÁRBOL DE LA VIDA

El éxito de los organismos vivos basados en las formas químicas del DNA, RNA y proteína, seleccionadas de entre una infinidad de otras formas químicas que podemos imaginar, ha sido espectacular. Los organismos han poblado los océanos, han cubierto los territorios, se han infiltrado en la corteza de la Tierra y han modelado la superficie de nuestro planeta. Nuestra atmósfera rica en oxígeno, los depósitos de carbón y de petróleo, las capas de minerales de hierro, los acantilados de cal y de mármol... todo esto, de forma directa o indirecta es el resultado de la actividad biológica sobre nuestro planeta.

Los organismos vivos no están limitados por las temperaturas habituales de la tierra, el agua y la luz del sol. Podemos encontrar organismos vivos en las oscuras profundidades del océano, en las abrasivas lavas volcánicas, por debajo de la superficie helada del Antártico o enterrados varios kilómetros bajo la corteza de la Tierra. Las criaturas que viven en estas condiciones extremas generalmente son poco conocidas, no solo por su inaccesibilidad, sino porque muchas de ellas son microscópicas. Incluso en hábitats más próximos al nuestro, la mayoría de organismos son tan pequeños que para poder observarlos necesitamos equipamiento especial. Por ello no suele ser noticia para nosotros a no ser que causen alguna enfermedad o destruyan las vigas de madera de nuestras casas. Los microorganismos constituyen la mayoría de la materia viva que puebla la Tierra. Solo recientemente y gracias a nuevos métodos de análisis molecular y específicamente del análisis de las secuencias de DNA, hemos podido empezar a obtener una visión de la vida que no esté distorsionada por nuestra percepción a escala humana.

En esta sección, consideramos la diversidad de los organismos y sus posibles interrelaciones. Actualmente podemos caracterizar, catalogar y comparar cualquier conjunto de organismos vivos con referencia a sus secuencias de DNA, ya que la información genética de todos los organismos está escrita en el lenguaje universal de secuencias de DNA y las secuencias de DNA de cualquier organismo se pueden obtener por métodos bioquímicos estandarizados. A partir de comparaciones de este tipo podemos estimar el lugar que ocupa cada organismo dentro del árbol familiar de especies vivas: el "árbol de la vida". Pero, antes

de describir lo que revela esta aproximación, hemos de considerar los sistemas por los que las células obtienen en diferentes ambientes la materia y la energía necesaria para sobrevivir y proliferar, así como los mecanismos por los que algunas clases de organismos dependen de otros para sus necesidades químicas básicas.

Las células pueden alimentarse de una gran variedad de fuentes de energía libre

Los organismos vivos obtienen su energía libre de diferentes maneras. Algunos, como los animales, los hongos o las bacterias que viven en el intestino humano, la obtienen alimentándose de otros seres vivos o de los compuestos orgánicos que estos seres vivos producen. A este tipo de organismo se le denomina *organotrofos* (del griego *trophe*, alimento). Otros organismos obtienen su energía directamente del mundo inanimado (no vivo). Este grupo está constituido por dos clases de organismos: los que obtienen la energía de la luz solar y los que obtienen la energía a partir de sistemas ricos en energía de compuestos químicos inorgánicos presentes en el ambiente (sistemas químicos que están alejados del equilibrio químico). Los organismos de la primera clase se denominan *fototrofos* (que se alimentan de la luz del sol) y los del segundo grupo se denominan *litotrofos* (que se alimentan de las piedras). Los organismos organotrofos no pueden subsistir sin los conversores primarios de energía, los cuales son las formas de vida más abundantes.

Los organismos fototrofos incluyen diversos tipos de bacterias, así como las algas y las plantas. De estos organismos dependemos nosotros y casi todos los organismos vivos que podemos observar a nuestro alrededor. Los organismos fototrofos han cambiado totalmente las características químicas de nuestro entorno: el oxígeno presente en la atmósfera de la Tierra es el producto final de sus actividades biosintéticas.

Los organismos litotrofos no constituyen un elemento obvio de nuestro mundo, ya que son microscópicos y la mayoría de ellos habitan lugares que los humanos no frecuentan, como la profundidad de los océanos, el interior de la corteza terrestre u otros ambientes inhóspitos. Sin embargo, constituyen una parte importante del mundo vivo y son especialmente importantes bajo cualquier consideración que realicemos de la historia de la vida en nuestro planeta.

Algunos organismos litotrofos obtienen la energía a partir de reacciones *aeróbicas*, que utilizan el oxígeno molecular del ambiente. Debido a que el O_2 atmosférico es el producto final de los organismos vivos, estos litotrofos aeróbicos, en algún sentido se alimentan de los productos de la vida anterior. Sin embargo, existen otros litotrofos que viven anaeróbicamente en lugares en los que el oxígeno molecular es escaso o no existe, en circunstancias similares a las que debieron existir en los primeros días de la vida sobre la Tierra, antes que el oxígeno se acumulase.

El lugar más inhóspito de todos ellos son los *afloramientos hidrotermales* situados en las profundidades de los océanos Pacífico y Atlántico, en regiones en las que el suelo oceánico se expande, formando nuevos componentes de la corteza de la Tierra, a partir del material que emerge del interior de la Tierra (**Figura 1–15**). En estas regiones, el agua marina infiltrada se calienta y es proyectada hacia arriba a modo de un géiser submarino llevándose consigo una gran cantidad de materiales derivados de las profundas rocas calientes. Una mezcla típica de materiales transportados incluye H_2S, H_2, CO, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Ni^{2+}, CH_2, NH_4^+ y compuestos ricos en fósforo. En las proximidades del afloramiento vive una rica población de microbios a partir de esta dieta austera, obteniendo energía libre de reacciones químicas que se producen con los compuestos químicos disponibles. Otros organismos –como las ostras, los mejillones o los gusanos marinos– se alimentan de los microbios de estos respiraderos del fondo oceánico y forman un completo ecosistema similar al establecido entre las plantas y los animales al que pertenecemos, pero alimentado por energía geoquímica en lugar de luz solar (**Figura 1–16**).

Algunas células fijan nitrógeno y dióxido de carbono para otros organismos

Construir un organismo vivo requiere materia y energía libre. El DNA, el RNA y las proteínas están formados por seis elementos: hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo. Estos elementos son muy abundantes en el ambiente inanimado, en las rocas de la Tierra, en

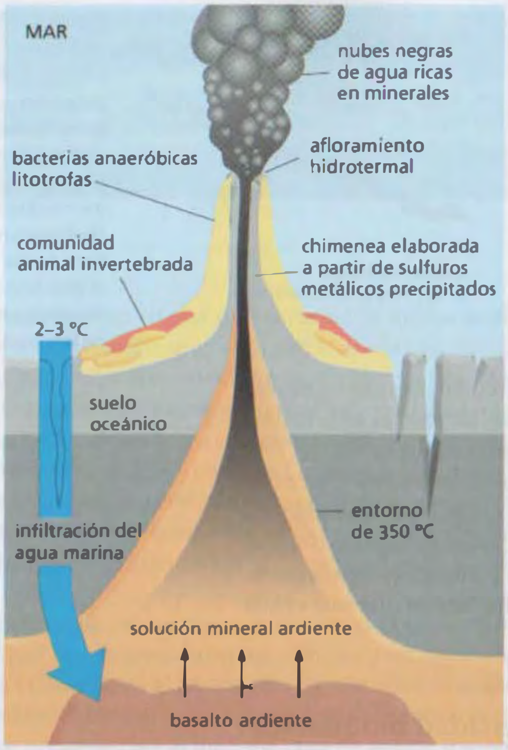


Figura 1–15 Geología de un afloramiento hidrotermal en el suelo oceánico. El agua se infiltra hacia las rocas calientes del interior de la Tierra, donde se calienta y es empujada hacia arriba arrastrando minerales de estas rocas ardientes. Se establece un gradiente térmico desde más de 350 °C en las proximidades del afloramiento hasta los 2-3 °C de las profundidades oceánicas. Los minerales precipitan por el contacto del agua fría y forman una chimenea. Diferentes tipos de organismos, resistentes a diferentes temperaturas, viven en diferentes hábitats en las proximidades de la chimenea. Una chimenea típica puede tener unos cuantos metros de altura y presentar un flujo de 1-2 m/segundo

el agua o la atmósfera; pero no se encuentran en formas químicas fáciles de incorporar en moléculas biológicas. El N_2 y el CO_2 atmosféricos son muy poco reactivos, por lo que se requieren grandes cantidades de energía libre para dirigir reacciones que utilicen estas moléculas inorgánicas generando compuestos orgánicos necesarios para biosíntesis posteriores, es decir, para *fijar* nitrógeno y dióxido de carbono, de modo que el N y el C sean disponibles para los organismos vivos. Muchos tipos de células vivas no tienen la maquinaria bioquímica necesaria para realizar esta fijación, por lo que dependen de otros tipos de células que realicen este trabajo para ellas. Nosotros, como el resto de animales, dependemos de las plantas como fuente de carbono orgánico y de compuestos nitrogenados. Las plantas pueden fijar el dióxido de carbono a partir de la atmósfera pero no tienen la capacidad de fijar el



Figura 1–16 Organismos vivos en el afloramiento hidrotermal. Varias especies litotrofas de bacterias y de arqueobacterias tienen su hábitat cerca del afloramiento, a temperaturas próximas a los 120 °C, del que obtienen su alimento. Un poco más lejos, donde la temperatura es menor, varios tipos de animales invertebrados viven alimentándose de estos microorganismos. Mención especial requiere los grandes gusanos tubiformes (2 metros) que, en lugar de alimentarse de células litotrofas, viven en simbiosis con ellas: unos órganos especializados del gusano mantienen un número elevado de bacterias oxidativas de azufre. Estas bacterias capturan la energía hidrotermal y la suministran a sus huéspedes, que carecen de boca, de intestino y de ano. La dependencia del gusano tubiforme respecto a las bacterias para la captación de la energía hidrotermal es análoga a la dependencia de los vegetales respecto a los cloroplastos para la captura de la energía solar, de la que trataremos más adelante en este capítulo. Sin embargo, los gusanos tubiformes han evolucionado a partir de animales más convencionales y se han adaptado a la vida en el afloramiento hidrotermal. (Cortesía de Dudley Foster, Woods Hole Oceanographic Institution.)



Figura 1–17 Formas y tamaños de algunas bacterias. Aunque la mayoría de las bacterias son pequeñas, como se muestra en la imagen, midiendo algunas micras de largo, también hay especies gigantes. Un ejemplo extremo (no mostrado) es la bacteria *Epulopiscium fishelsoni*, que tiene forma cilíndrica y vive en el intestino del pez cirujano, llegando a medir 600 μm de longitud.

nitrógeno atmosférico, por lo que dependen en parte de las bacterias fijadoras de nitrógeno para suplir su necesidad de compuestos nitrogenados. Por ejemplo, las plantas de la familia del guisante mantienen en simbiosis bacterias fijadoras de nitrógeno en sus raíces.

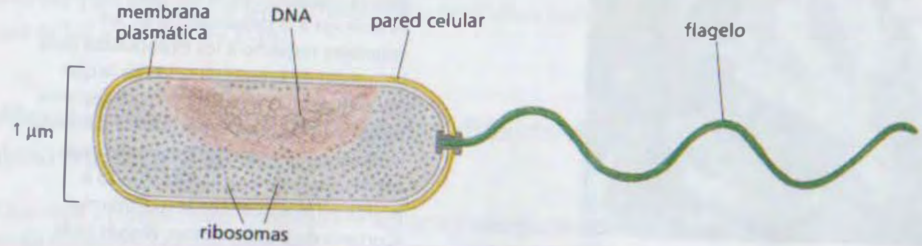
Por lo tanto, las células vivas difieren mucho en algunos de los aspectos más básicos de sus propiedades bioquímicas. No es sorprendente encontrar que células con necesidades y capacidades complementarias hayan desarrollado estrechas asociaciones. Algunas de estas asociaciones, como veremos después, han evolucionado hasta el punto en que los organismos han perdido su identidad propia y han unido sus fuerzas formando una sola célula compuesta.

Las células procariotas presentan la mayor diversidad bioquímica

Desde que se inició la utilización del microscopio óptico, ha resultado evidente que los organismos vivos pueden clasificarse en dos grupos según su estructura: los organismos **eucariotas** y los **procariotas**. Los eucariotas guardan su DNA en un compartimiento intracelular delimitado por una membrana denominada núcleo (término derivado del griego "verdaderamente nucleado", de los términos *eu*, "bien" o "verdadero" y *karyon*, "corazón" o "núcleo"). Los procariotas no presentan un compartimiento nuclear diferenciado para almacenar su DNA. Las plantas, los hongos y los animales son eucariotas; las bacterias son procariotas como lo son las arqueas, una clase diferente de células procariotas (se trata de ellas más adelante).

La mayoría de las células procariotas son pequeñas, simples en cuanto a su apariencia externa (**Figura 1–17**) y viven como individuos independientes o en comunidades organizadas de forma muy laxa en lugar de formar organismos pluricelulares. Típicamente tienen una forma esférica o de bastoncillo, de apenas unas cuantas micras en su eje mayor. A menudo presentan una cubierta de protección denominada *pared celular*, por debajo de la cual se encuentra una membrana plasmática que envuelve el compartimiento citoplasmático único, que contiene el DNA, el RNA, las proteínas y una gran cantidad de pequeñas moléculas necesarias para la vida. Al microscopio electrónico, el interior celular aparece como una matriz de textura cambiante sin una estructura organizada (**Figura 1–18**).

Figura 1–18 Estructura de una bacteria. (A) La bacteria *Vibrio cholerae* muestra una organización sencilla. *Vibrio* tiene un apéndice helicoidal en un extremo –un flagelo– que rota empujando a la célula hacia adelante. (B) Electromicrografía de transmisión de una sección longitudinal de la bacteria *E. coli*. Esta bacteria está emparentada con *Vibrio* pero tiene muchos flagelos distribuidos en su superficie (no visibles en esta sección). El DNA de ambas células se concentra en la zona más pálida de la bacteria. (B, cortesía de E. Kellenberger.)





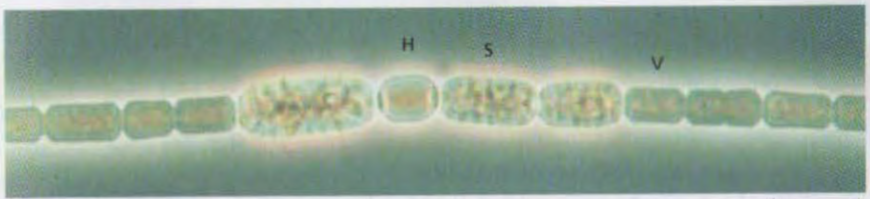


Figura 1–19 La bacteria fototrofa *Anabaena cylindrica* al microscopio óptico. Las células de esta especie forman largos filamentos pluricelulares. La mayoría de las células (marcadas con una *V*) realizan fotosíntesis, mientras otras están especializadas en la fijación del nitrógeno (marcadas con una *H*) o se transforman en esporas resistentes (marcadas con una *S*). (Cortesía de Dave G. Adams.)

Las células procariotas viven en una gran variedad de nichos ecológicos y tienen unas propiedades bioquímicas extraordinariamente variadas –mucho más que las células eucariotas. Las especies organotrofas pueden utilizar casi cualquier tipo de moléculas orgánicas como alimento, desde azúcares o aminoácidos hasta hidrocarburos o gas metano. Las especies fototrofas (**Figura 1–19**) almacenan la energía de la luz por diversas vías. Algunas de ellas generan oxígeno como producto final y otras no. Las especies litotrofas pueden alimentarse con una dieta de nutrientes inorgánicos: obtienen el carbono del CO_2, y utilizan el H_2S como combustible para obtener sus necesidades energéticas (**Figura 1–20**), el H_2, el Fe^{2+}, el azufre elemental, o cualquier otro de la gran cantidad de productos químicos presentes en el ambiente.

Muchas partes del mundo microscópico están aún sin explorar. Los métodos bacteriológicos tradicionales han proporcionado un conocimiento considerable de las especies que pueden ser aisladas y cultivadas en el laboratorio. No obstante, el análisis de las secuencias de DNA de las poblaciones bacterianas de muestras de hábitats naturales –como el suelo, el agua de mar o incluso la cavidad bucal humana– nos ha abierto los ojos al hecho de que la mayoría de las especies no se pueden cultivar mediante técnicas convencionales de laboratorio. De acuerdo con una estimación, el 99% de las especies procariotas todavía no han sido caracterizadas.

El árbol de la vida tiene tres ramas principales: las bacterias, las arqueobacterias y los eucariotas

Tradicionalmente, la clasificación de los seres vivos se ha fundado en el estudio comparativo de su apariencia externa: podemos ver que un pez tiene ojos, mandíbulas, espinazo, cerebro, etc., como nosotros, mientras que un gusano no; que un rosal es "pariente" de un manzano y más diferente que el césped. Como demostró Darwin, podemos interpretar estas similitudes familiares en términos de evolución a partir de ancestros comunes y encontrar los restos de muchos de estos ancestros preservados en el registro fósil. De esta manera ha sido posible empezar a dibujar el árbol genealógico de los organismos que muestre las diversas líneas de descendencia así como los puntos de ramificación en la historia en los que los ancestros de un grupo de especies empiezan a ser diferentes a los de otro grupo.

Sin embargo, cuando las diferencias entre organismos se hacen muy grandes, estos métodos comienzan a fallar. ¿Cómo decidir si un hongo es un pariente más cercano de una planta o de un animal? Cuando se trata de los procariotas la tarea todavía es más difícil: un bastoncillo o una esfera microscópicos se parecen mucho entre sí. Por lo tanto, los microbiólogos han tenido que clasificar los procariotas atendiendo a sus propiedades bioquímicas y a sus requerimientos nutricionales. No obstante, esta aproximación también tiene errores. Entre la confusa variedad de comportamientos bioquímicos resulta difícil saber qué diferencias reflejan realmente diferencias en la historia evolutiva.



Figura 1–20 Una bacteria litotrofa. *Beggiatoa* vive en ambientes ricos en azufre. Obtiene energía oxidando el H_2S y, además, puede fijar carbono incluso en la oscuridad. Obsérvese los depósitos amarillos de azufre en el interior de la célula. (Cortesía de Ralph W. Wolfe.)

El análisis del genoma ha proporcionando una vía sencilla, más directa y potente para determinar relaciones evolutivas. La secuencia completa del DNA de un organismo define su naturaleza con una precisión casi perfecta, completa y con un detalle exhaustivo. Además, esta especificación está en forma digital –una serie de letras– que puede ser introducida directamente en un ordenador y comparada con la información correspondiente a otro ser vivo. El DNA está sujeto a cambios aleatorios que se han acumulando durante largos periodos de tiempo (como veremos en seguida), por lo que el número de diferencias entre las secuencias de DNA de dos organismos proporciona una indicación directa, objetiva y cuantitativa de la distancia evolutiva entre ellos.

Esta aproximación ha demostrado que los organismos que tradicionalmente hemos clasificado juntos como "bacterias" pueden tener un origen evolutivo tan diferente como lo

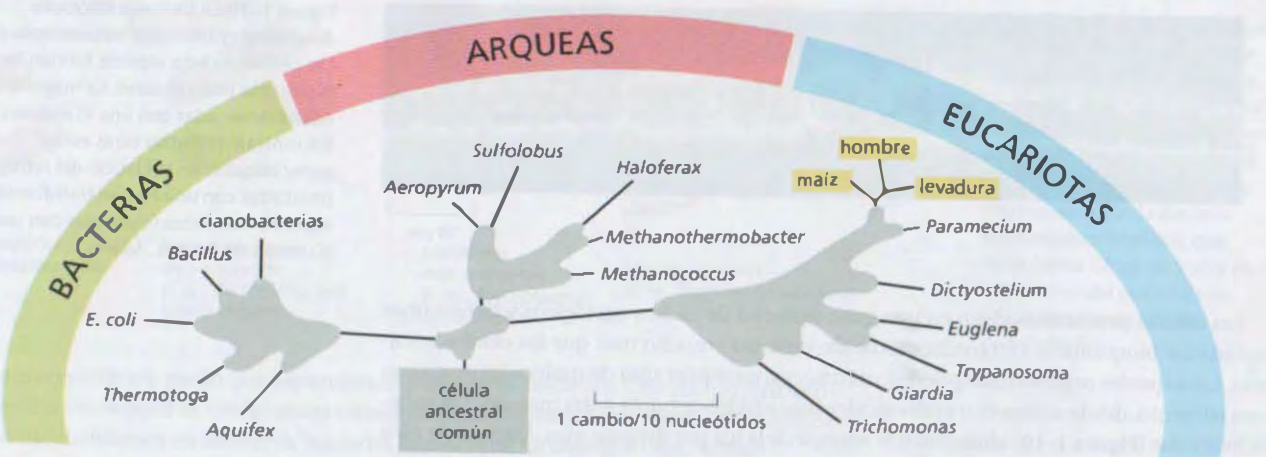


Figura 1–21 Las tres divisiones principales (dominios) del mundo viviente. Tradicionalmente la palabra bacteria se ha utilizado para definir a los procariotas en general, pero en la actualidad se han redefinido para referirse específicamente a las bacterias. El árbol mostrado se basa en las comparaciones de las secuencias de nucleótidos de las subunidades del RNA ribosómico de diferentes especies; la distancia en el diagrama representa una estimación del número de cambios evolutivos que se han producido en esta molécula en cada linaje (véase Figura 1-22). Las partes del árbol sombreadas en *gris* corresponden a las incertidumbres sobre detalles del verdadero patrón de divergencia de especies a lo largo del proceso de la evolución: las comparaciones de secuencias de nucleótidos o de aminoácidos de diferentes moléculas así como otros criterios implican el diseño de árboles algo diferentes. Sin embargo, existe un consenso general sobre la divergencia inicial de los tres dominios básicos: las bacterias, las arqueas y los eucariotas.

tiene un procariota y un eucariota. En la actualidad parece que los procariotas incluyen dos grupos diferentes de seres que divergieron al inicio de la historia de la vida sobre la Tierra, incluso antes o al mismo tiempo que los ancestros de los eucariotas formasen un grupo independiente. Los dos grupos de procariotas se denominan **bacterias** (o eubacterias) y **arqueas** (o arqueobacterias). Por lo tanto, el mundo vivo tiene tres grandes divisiones o *dominios*: las bacterias, las arqueobacterias y los eucariotas (**Figura 1–21**).

Las arqueas se encuentran habitualmente habitando ambientes inhóspitos que la especie humana evita, como pantanos, estaciones de tratamiento de aguas residuales, profundidades oceánicas, salinas o manantiales calientes y ácidos. Sin embargo, también se encuentran en ambientes menos extremos y más familiares, como desde los suelos o los lagos hasta el estómago del ganado. Por su apariencia externa no son fáciles de distinguir de las bacterias. A nivel molecular, las arqueas se parecen más a los eucariotas en su maquinaria de manipulación del material genético (replicación, transcripción y traducción), pero se parecen más a las bacterias en su procesos metabólicos y de conversión energética. Analizaremos más adelante como puede explicarse todo esto.

Algunos genes evolucionan rápidamente mientras que otros se conservan

Tanto durante el almacenaje como durante el copiado del material genético se pueden producir accidentes y/o errores aleatorios que pueden alterar la secuencia de nucleótidos, es decir, generar **mutaciones**. Como consecuencia de ello, cuando una célula se divide, a menudo sus dos células hijas no son idénticas entre sí o a su progenitor. Algunas veces poco frecuentes el error puede representar un cambio favorable; más probablemente el error no supondrá diferencias importantes en las capacidades de la célula; en muchos casos, el error causará daños importantes, por ejemplo, alterando la secuencia de una proteína clave. Cambios debidos a errores del primer tipo tenderán a perpetuarse, ya que la célula alterada tendrá una mayor probabilidad de reproducirse. Cambios debidos a errores del segundo tipo –cambios *selectivamente neutros*– pueden ser o no perpetuados: depende de si la célula o sus familiares tendrán o no éxito en la competencia por los recursos limitados. Los cambios que causen daños importantes no conducen a la célula a ninguna parte, por lo general provocan su muerte y, por tanto, no dejan descendencia. Mediante la repetición de este ciclo de ensayo y error –de *mutación* y *selección natural*– los organismos evolucionan y sus especificaciones genéticas cambian proporcionándoles nuevas vías de aprovechamiento del entor-

no más eficaces para poder sobrevivir en competencia con otros organismos, reproduciéndose con más éxito.

Claramente, durante el curso de la evolución algunas partes del genoma cambian más fácilmente que otras. Un segmento de DNA que no codifica ninguna una proteína y que no tiene ningún papel regulador importante puede cambiar a una velocidad limitada por la frecuencia de los errores aleatorios que sufra. Por el contrario, un gen que codifique una proteína esencial altamente optimizada o una molécula de RNA no puede ser alterado con tanta facilidad: cuando se produce un error, la célula afectada casi siempre es eliminada. Por lo tanto, los genes de este último tipo están *altamente conservados* a lo largo de la evolución. A través de 3,5 mil millones de años o más de historia evolutiva, muchas características del genoma han cambiado haciéndose irreconocibles, pero los genes más conservados siguen siendo reconocibles en todas las especies vivas.

Estos últimos genes son los que podemos analizar para determinar las relaciones familiares entre los organismos más alejados en el árbol genealógico. Los estudios que han llevado a la clasificación del mundo vivo en los tres dominios de bacterias, arqueas y eucariotas se basan en el análisis de uno de los dos RNA principales que componen el ribosoma, el denominado RNA ribosómico de la subunidad pequeña. Este componente del ribosoma se ha conservado desde el inicio de la historia de la vida sobre la Tierra, ya que la traducción es fundamental para todas las células vivas (**Figura 1–22**).

La mayoría de las bacterias y de las arqueas tienen entre 1000 y 6000 genes

La selección natural ha favorecido a las células procariotas capaces de reproducirse más rápidamente tomando materiales del entorno y replicándose de forma más eficiente, a la mayor velocidad permitida por el aporte de alimento disponible. Un tamaño pequeño implica una gran cantidad de área por unidad de volumen, lo que ayuda a maximizar la captación de nutrientes a través de la membrana plasmática y favorece una velocidad de reproducción elevada.

Probablemente por estas razones, la mayoría de los procariotas llevan muy poco sobrepeso de equipaje; sus genomas son pequeños, con genes empaquetados muy próximos y con la menor cantidad posible de DNA de regulación entre ellos. El pequeño tamaño del genoma hace relativamente sencilla la identificación de la secuencia completa del DNA. En la actualidad, disponemos de esta información de muchas especies de bacterias y de arqueas, y de unas cuantas especies de eucariotas. Como se ilustra en la **Tabla 1–1**, la mayoría de los genomas de las bacterias y de las arqueas contienen entre 10^6 y 10^7 pares de nucleótidos, que codifican entre 1000 y 6000 genes.

Una secuencia completa de DNA revela los genes que un organismo tiene y los que le faltan. Cuando comparamos los tres dominios del mundo vivo, podemos empezar a intuir cuáles son los genes comunes en todos ellos y que, por lo tanto, debían estar presentes en la célula ancestral de todos los seres vivos actuales, y cuáles son específicos de una rama concreta del árbol de la vida. Sin embargo, para explicar estas observaciones es necesario considerar un poco más detenidamente cómo se generan y cómo evolucionan los genes.

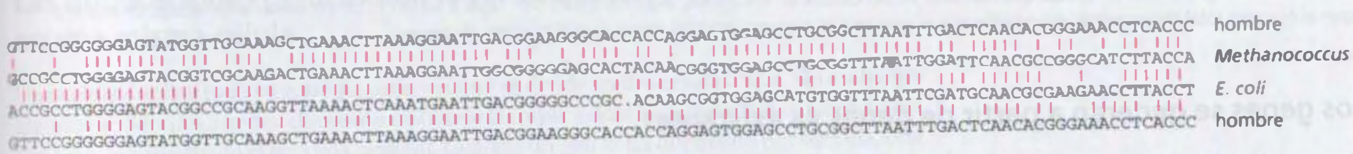


Figura 1–22 **Información genética conservada desde la época del último ancestro común de todos los organismos vivos.** Se muestra una parte del gen del más pequeño de los dos componentes de RNA del ribosoma. (La molécula completa tiene unos 1500-1900 nucleótidos de longitud según las especies de que se trate.) Se alinean las secuencias de segmentos correspondientes de una arquea (*Methanococcus jannaschii*), una bacteria (*Escherichia coli*) y un eucariota (*Homo sapiens*). Los lugares en los que los nucleótidos son idénticos entre las diferentes especies se indican con una línea roja vertical. La secuencia humana se repite en la parte inferior del alineamiento para facilitar las tres comparaciones. El punto hacia la mitad de la secuencia de *E. coli* indica un lugar en el que a lo largo de la evolución o bien se ha eliminado un nucleótido del linaje de las bacterias o se ha insertado un nucleótido en los otros dos linajes. Nótese que las secuencias de estos tres organismos, representativas de los tres dominios del mundo vivo, se diferencian unas de las otras aproximadamente en el mismo grado, pero mantienen similitudes inequívocas.

Tabla 1–1 Algunos genomas secuenciados por completo

ESPECIES	CARACTERÍSTICAS ESPECIALES	HÁBITAT	TAMAÑO DEL GENOMA (MILES DE PARES DE NUCLEÓTIDOS POR GENOMA HAPLOIDE)	NÚMERO ESTIMADO DE GENES QUE CODIFICAN PROTEÍNAS
BACTERIAS				
Mycoplasma genitalium	genoma más pequeño de cualquier célula conocida	tracto genital humano	580	468
Synechocystis sp.	fotosintéticas, generadoras de oxígeno (cianobacterias)	lagos y corrientes de agua	3573	3168
Escherichia coli	favorita del laboratorio	tracto digestivo humano	4639	4289
Helicobacter pylori	causa úlceras estomacales y predispone para cáncer de estómago	estómago humano	1667	1590
Bacillus anthracis	produce ántrax	suelo	5227	5634
Aquifex aeolicus	litotrofa, vive a elevadas temperaturas	afloramientos hidrotermales	1551	1544
Streptomyces coelicolor	fuente de antibióticos; genoma gigante	suelo	8667	7825
Treponema pallidum	espiroqueta, produce la sífilis	tejidos humanos	1138	1041
Rickettsia prowazekii	bacteria muy próxima a las mitocondrias, causa el tifus	piojos y humanos (parásito intracelular)	1111	834
Thermotoga maritima	organotrofo, vive a temperaturas elevadas	afloramientos hidrotermales	1860	1877
ARQUEAS				
Methanococcus jannaschii	litotrofos, anaeróbicos y productos de metano	afloramientos hidrotermales	1664	1750
Archaeoglobus fulgidus	litotrofos u organotrofos, anaeróbicos, reductores de azufre	afloramientos hidrotermales	2178	2493
Nanoarchaeum equitans	arqueobacteria más pequeña conocida; anaeróbicos; parásito de otras arqueobacterias más grandes	afloramientos hidrotermales y afloramientos cálidos volcánicos	491	552
EUCARIOTAS				
Saccharomyces cerevisiae (levadura de germinación)	modelo eucariota más pequeño	piel de los granos de uva, cerveza	12.069	~6300
Arabidopsis thaliana (berro)	modelo de organismo de plantas con flores	suelo y aire	~142.000	~26.000
Caenorhabditis elegans (gusano nematodo)	animal sencillo con un desarrollo perfectamente previsible	suelo	~97.000	~20.000
Drosophila melanogaster (mosca del vinagre)	herramienta clave para el estudio del desarrollo de los animales	fruta envejecida	~137.000	~14.000
Homo sapiens (hombre)	el modelo mamífero más estudiado	casas	~3.200.000	~24.000

El tamaño del genoma y el número de genes es variable entre cadenas de una misma especie, especialmente en bacterias y arqueobacterias. La tabla muestra datos de cadenas concretas que han sido secuenciadas. En eucariotas, algunos genes dan lugar a variantes de proteínas alternativas, de manera que el número total de proteínas expresadas por el genoma es sustancialmente mayor que el número de genes.

Los genes se generan a partir de genes ya existentes

El material básico de la evolución es la secuencia de DNA que ya existe. No hay ningún mecanismo natural por el que se generen grandes cadenas de DNA de secuencia nueva aleatoria. Así, ningún DNA es completamente nuevo. La innovación puede ocurrir por diversas vías (**Figura 1–23**):

1. *Mutación intragénica*: un gen ya existente puede ser modificado por cambios en su secuencia de DNA mediante diferentes tipos de errores que fundamentalmente ocurren en el proceso de replicación del DNA.
2. *Duplicación génica*: un gen existente puede ser duplicado generando así en una misma célula un par de genes que inicialmente son idénticos y que a partir de este momento pueden divergir en el transcurso de la evolución.

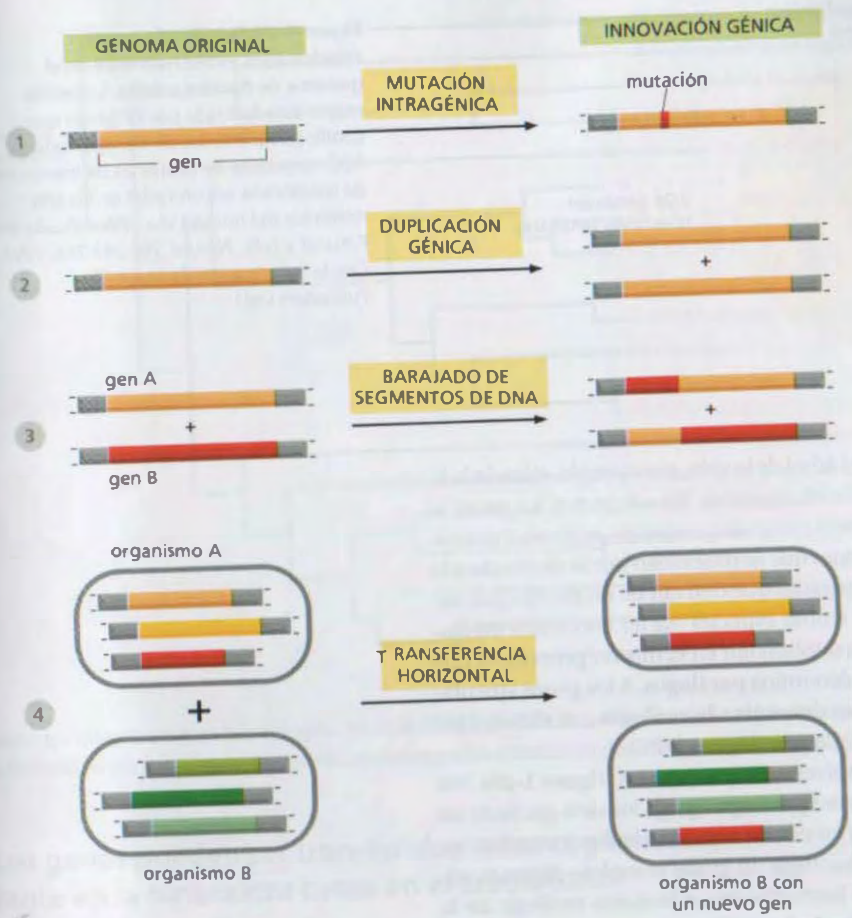


Figura 1–23 Cuatro modelos de innovación génica y sus efectos en la secuencia del DNA de un organismo. Cuando dos tipos diferentes de células entran en una asociación simbiótica permanente, se produce una forma especial de transferencia horizontal. Los genes de una de las células pueden ser transferidos al genoma de la otra célula, como veremos más adelante al tratar el caso concreto de las mitocondrias y de los cloroplastos.

3. *Barajado de fragmentos*: dos o más genes existentes pueden romperse y reagruparse generando un gen híbrido formado por segmentos de DNA que originariamente pertenecían a genes independientes.
4. *Transferencia horizontal (intracelular)*: un fragmento de DNA puede ser transferido desde el genoma de una célula al de otra célula, incluso de una especie diferente. Este proceso contrasta con la *transferencia vertical* de información génica habitual entre los progenitores y la progenie.

Cada uno de estos tipos de cambios deja una huella característica en la secuencia de DNA de un organismo y proporcionan una clara evidencia de que se han producido los cuatro tipos de procesos. En capítulos posteriores describiremos los mecanismos subyacentes a estos procesos, pero por ahora nos centraremos en sus consecuencias.

Las duplicaciones génicas dan lugar a familias de genes próximos en una misma célula

Una célula duplica todo su genoma cada vez que se divide en dos células hijas. Sin embargo, algunos accidentes pueden dar como resultado la duplicación inapropiada de una parte del genoma, manteniendo el genoma original. Cuando un gen se ha duplicado por esta vía, una de las dos copias queda libre para mutar y especializarse en la realización de una función diferente en la misma célula. Repetidos ciclos de este proceso de duplicación y divergencia, durante muchos millones de años, han permitido que algunos genes generen una familia de genes que se pueden hallar dentro de un mismo genoma. El análisis de la secuencia del DNA de genomas de organismos procariotas ponen de manifiesto muchos ejemplos de este tipo de familias génicas: por ejemplo en *Bacillus subtilis*, el 47% de los genes tiene uno o más genes relacionados de forma obvia (**Figura 1–24**).

Cuando los genes se duplican y divergen de esta manera, los individuos de una especie resultan dotados de diferentes variantes del gen inicial. Este proceso evolutivo tiene que distinguirse de la divergencia genética que ocurre cuando una especie se separa en dos líneas

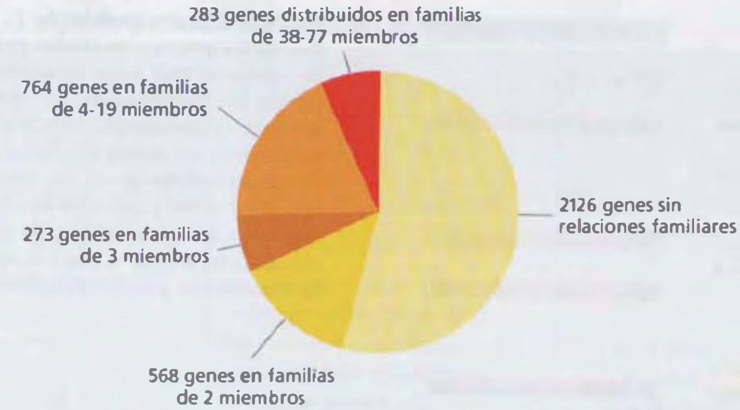


Figura 1–24 Familias de genes relacionados evolutivamente en el genoma de *Bacillus subtilis*. La familia mayor está formada por 77 genes que codifican variedades de transportadores ABC –una clase de proteínas de transporte de membrana encontradas en los tres dominios del mundo vivo. (Modificado de F. Kunst y cols., *Nature*, 390:249-256, 1997. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

de descendencia diferentes en una bifurcación del árbol de la vida, por ejemplo, cuando la línea humana de descendencia se separó de la de los chimpancés. En este punto, los genes se vuelven diferentes en el curso de la evolución, pero continúan teniendo funciones correspondientes en las dos especies hermanas. A los genes que se relacionan por la descendencia de esta forma –es decir, genes de dos especies separadas que derivan de un mismo gen ancestral presente en el último ancestro común de ambas especies –se les denomina **ortólogos**. A los genes relacionados que derivan de una duplicación en el mismo genoma –y que posiblemente divergirán en sus funciones– se les denomina **parálogos**. A los genes vinculados por una descendencia de cualquier tipo se les denomina **homólogos**, un término general que se utiliza para englobar ambos tipos de relación (**Figura 1–25**).

Las relaciones familiares entre genes pueden volverse muy complejas (**Figura 1–26**). Por ejemplo, un organismo que tiene una familia de genes parálogos (p. ej., los siete genes de las hemoglobinas α, β, γ, δ, ε, ζ y θ) puede evolucionar en dos especies separadas (como los humanos y los chimpancés) cada una de las cuales mantiene un grupo completo de genes parálogos. Los 14 genes son homólogos, siendo la hemoglobina α humana ortóloga de la hemoglobina α del chimpancé, pero paráloga de las hemoglobinas β, humana y del chimpancé, y así sucesivamente. Además, las hemoglobinas de los vertebrados (la proteína que transporta el oxígeno en la sangre) es homóloga a la mioglobina (proteína que se une al oxígeno en el músculo) de los vertebrados, así como de otros genes más distantes que codifican proteínas que unen oxígeno de los organismos invertebrados, plantas, hongos y bacterias. A partir de las secuencias del DNA generalmente resulta sencillo reconocer que dos genes de

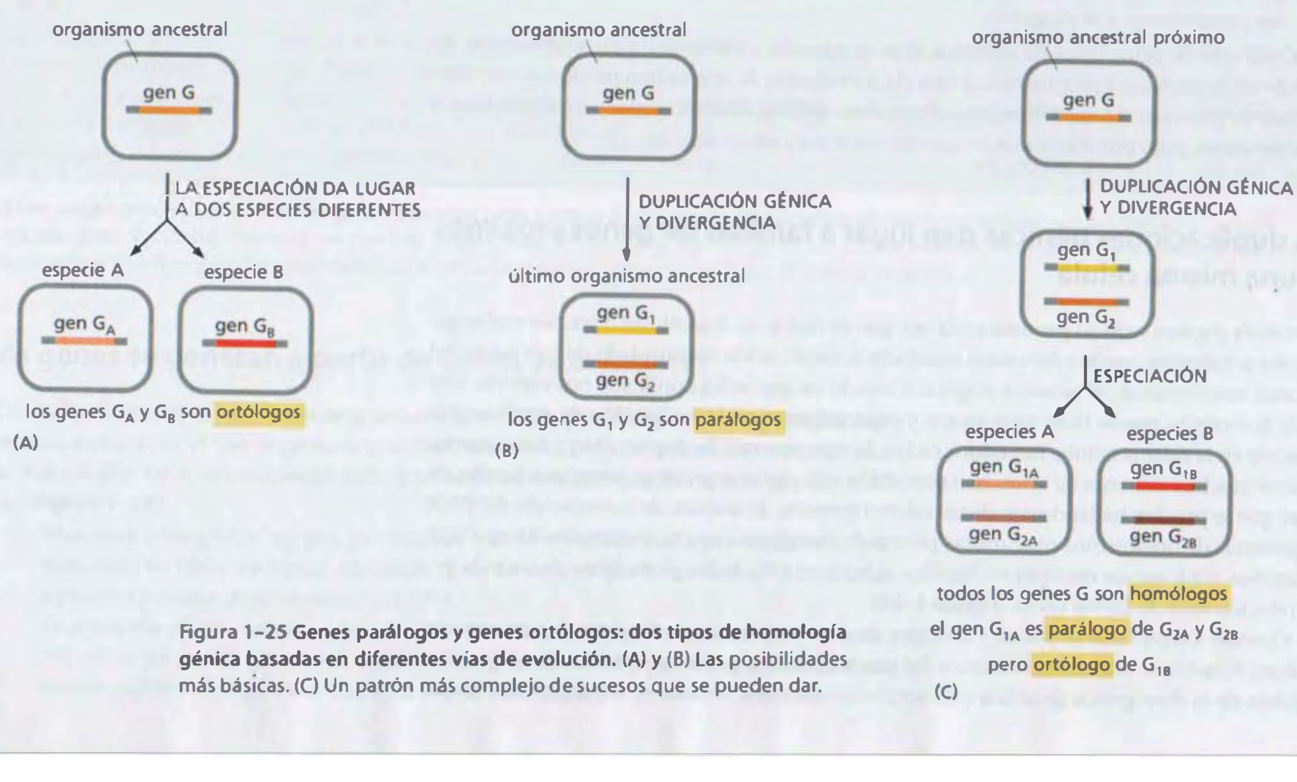


Figura 1–25 Genes parálogos y genes ortólogos: dos tipos de homología génica basadas en diferentes vías de evolución. (A) y (B) Las posibilidades más básicas. (C) Un patrón más complejo de sucesos que se pueden dar.

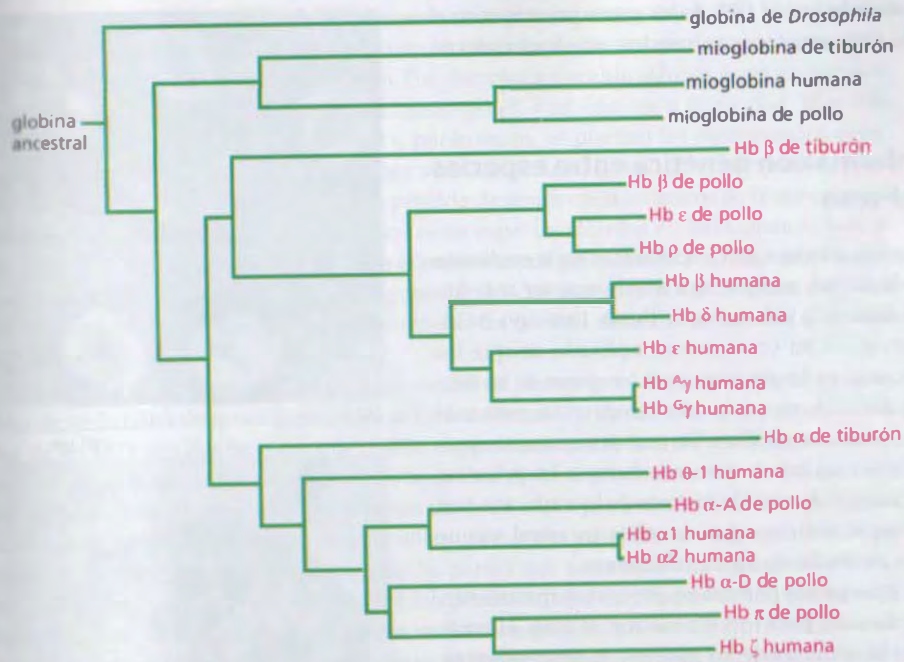


Figura 1–26 Una compleja familia de genes homólogos. Este diagrama muestra el "pedrigí" de los genes de la hemoglobina (Hb), de la mioglobina y de la globina en el hombre, en el pollo, en el tiburón y en *Drosophila*. La longitud de cada línea horizontal es proporcional al grado de divergencia en la secuencia de aminoácidos.

especies diferentes son homólogos; es más difícil decidir, sin disponer de otra información adicional, si son ortólogos que se encuentran en un momento determinado de su evolución.

Los genes pueden ser transferidos entre organismos, tanto en la naturaleza como en el laboratorio

Los procariotas también proporcionan ejemplos de transferencia horizontal de genes de una especie a otra. El ejemplo más claro lo constituyen las secuencias que sabemos que derivan de virus bacterianos, también denominados *bacteriófagos* (**Figura 1–27**). Los **virus** no son células vivas, pero pueden actuar como vectores para la transferencia de genes: son pequeños paquetes de material génico que han evolucionado como parásitos de la maquinaria biosintética y reproductiva de células huésped. Se replican en una célula, emergen de ella con una cubierta de protección y entran en otra célula, infectándola. Esta segunda célula puede ser o no de la misma especie que la primera. A menudo, la célula infectada morirá debido a la proliferación masiva de partículas virales en su interior, pero a veces el DNA viral en lugar de generar de forma directa estas partículas puede permanecer en el huésped durante muchas generaciones de la célula como un pasajero relativamente inocuo, bien como un fragmento intracelular independiente de DNA, conocido como *plásmido*, o como una secuencia que se inserta en el DNA de la célula huésped. En sus viajes, los virus pueden llevarse consigo accidentalmente algunos fragmentos del DNA del genoma de la célula huésped y transportarlos a otra célula. Estas transferencias de material génico ocurren con frecuencia en procariotas y también pueden producirse entre células eucariotas de la misma especie.

La transferencia horizontal de genes entre células eucariotas de especies diferentes es poco frecuente y no parece que haya resultado demasiado relevante en la evolución de los eucariotas (a pesar de que durante la evolución de las mitocondrias y de los cloroplastos se han producido transferencias masivas de genomas bacterianos a genomas eucariotas, como comprobaremos más adelante). Por el contrario, la transferencia horizontal de genes ocurre mucho más frecuentemente entre especies diferentes de procariotas. Muchos procariotas tienen la destacable capacidad de captar de su ambiente incluso moléculas de DNA no vírico, capturando así la información genética que contienen. Por esta vía, o por la transferencia mediada por virus, las bacterias y las arqueas han adquirido genes de células vecinas con relativa facilidad. De esta forma, se ha observado que han evolucionado nuevas y en ocasiones peligrosas especies de bacterias en ecosistemas bacterianos que habitan hospitales o varios nichos del cuerpo humano. Por ejemplo, la transferencia horizontal génica es la responsable de la expansión en los últimos 40 años de cepas de *Neisseria gonorrheae*, la bacteria que produce la gonorrea, resistentes a la penicilina. En una escala temporal mayor, los resultados

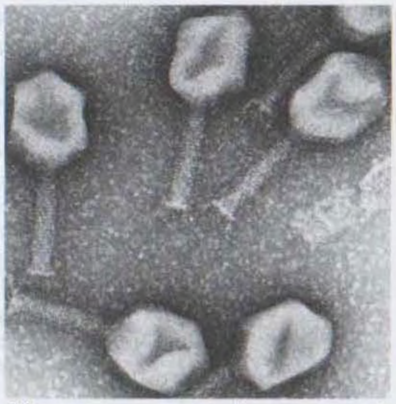
pueden ser incluso más profundos; se ha estimado que el 18% de los genes presentes en el genoma actual de *E. coli* se han adquirido de otras especies por transferencia horizontal en los últimos 100 millones de años.

El intercambio horizontal de la información genética entre especies se ha hecho realidad a través del sexo

Los intercambios horizontales de la información genética son importantes en la evolución de las bacterias y de las arqueas en el mundo actual, aunque han tenido que ser más frecuentes y promiscuos durante los primeros días de la vida sobre la Tierra. Este tipo de intercambios horizontales explicaría la observación en otro caso complicada de que los eucariotas parecen ser más similares a las arqueas en lo que respecta a los genes de las funciones básicas de los procesos de replicación del DNA, transcripción y traducción, pero más similares a las bacterias en los genes de los procesos metabólicos. En cualquier caso, sea porque la transferencia horizontal de genes ocurrió más frecuentemente durante las primeras etapas de la vida sobre la Tierra, o haya continuado durante la historia de la evolución con una frecuencia baja, ha tenido el efecto de complicar el concepto de célula ancestral, ya que cada genoma celular es un conjunto de partes derivadas de fuentes diferentes.

La transferencia horizontal entre procariotas puede parecer un proceso sorprendente, pero tiene su paralelo en un fenómeno muy familiar para todos nosotros: el sexo. Además de la habitual transferencia vertical de material genético de los padres a la descendencia, la reproducción sexual genera una transferencia horizontal de información génica a gran escala entre dos linajes celulares inicialmente separados: los de la madre y del padre. Por supuesto, una característica fundamental del sexo es que el intercambio genético normalmente sólo ocurre entre miembros de la misma especie. Pero independientemente de si se produce entre especies o dentro de una misma especie, la transferencia horizontal de genes deja una huella característica: genera individuos que están más relacionados con un conjunto de parientes con respecto a determinados genes y más relacionados con otro conjunto de parientes con respecto a otros grupos de genes. Comparando las secuencias del DNA de genomas humanos individuales, un visitante inteligente del espacio exterior podría deducir que se reproducen sexualmente, incluso sin conocer nada del comportamiento humano.

La reproducción sexual se ha generalizado especialmente entre los eucariotas (aunque no es universal). Incluso las bacterias realizan de vez en cuando intercambios sexuales controlados de DNA con otros miembros de su especie. La selección natural ha favorecido claramente a los organismos que se podían reproducir sexualmente, aunque los evolucionistas teóricos discuten sobre las ventajas selectivas del sexo.


(A) 100 nm


(B) 100 nm

Figura 1–27 Transferencia vírica de DNA de una célula a otra. (A) Electromicrografía de transmisión de algunas partículas de un virus bacteriano, el bacteriófago T4. La cabeza de este virus contiene el DNA vírico; la cola contiene la maquinaria para inyectar el DNA en la bacteria huésped. (B) Sección de la bacteria con el bacteriófago T4 adherido a su superficie. Los elementos oscuros del interior de la bacteria son las cabezas de las nuevas partículas del bacteriófago T4 en proceso de ensamblaje intracelular. Cuando estén maduras, la bacteria explotará liberándolas. (A, cortesía de James Paulson; B, cortesía de Jonathan King y Erika Hartwig de G. Karp, Cell and Molecular Biology, 2.ª ed. New York, John Wiley & Sons, 1999. Con la autorización de John Wiley & Sons.)

A partir de la secuencia de un gen a menudo se puede deducir su función

Las relaciones familiares entre genes son importantes no solo por su interés histórico sino porque simplifican de forma espectacular las labores de descifrado de las funciones de los genes. Cuando se ha determinado la secuencia de un nuevo gen, pulsando algunas teclas de un ordenador un científico puede buscar en la base completa de secuencias génicas otros genes relacionados. En muchos casos ya se habrá determinado experimentalmente la función de uno o más de estos homólogos y, por lo tanto, como la secuencia génica determina la función del gen, frecuentemente podremos realizar una buena predicción de la función del nuevo gen: es probable que sea similar a la de sus homólogos.

De esta forma es posible descifrar una gran parte de la biología de un organismo analizando la secuencia de DNA de su genoma y utilizando la información que actualmente tenemos de las funciones de los genes en otros organismos estudiados con más profundidad.

Más de 200 familias de genes son comunes para las tres ramas principales del árbol de la vida

Una vez conocidas las secuencias del genoma completo de organismos representativos de los tres dominios –arqueobacterias, bacterias y eucariotas– podemos buscar sistemática-

mente homologías que nos indiquen secuencias comunes en este árbol de la vida. De esta forma podemos empezar a obtener información de la herencia común de todos los seres vivos. Sin embargo, no resulta nada sencillo. Por ejemplo, a menudo algunas especies han perdido algunos de sus genes ancestrales; otros genes, casi con toda seguridad, han sido adquiridos por transferencia horizontal y, por lo tanto, no pueden ser considerados como ancestrales aunque sean compartidos por varias especies. Los estudios comparativos recientes indican claramente que tanto la pérdida de genes característicos de linaje como la transferencia horizontal, en algunos casos entre especies alejadas evolutivamente, han sido factores importantes de la evolución al menos entre procariotas. Finalmente, durante los últimos 2 o 3 mil millones de años algunos genes compartidos por individuos distintos han evolucionado de forma diferente como se ha podido determinar con los métodos actuales.

Debido a estos caprichos del proceso evolutivo, parece que sólo una pequeña proporción de las familias de genes ancestrales se ha conservado de forma universal y reconocible. Así, de las 4873 familias de genes que codifican proteínas que se han definido recientemente por comparación de los genomas de 50 bacterias, de 13 arqueobacterias y de 3 eucariotas unicelulares, sólo 63 son realmente ubicuos (es decir, están presentes en todos los genomas analizados). La gran mayoría de estas familias universales comprende componentes de los sistemas de traducción y de transcripción. No parece que se trate de una aproximación realista de un conjunto de genes ancestrales. Un proceso mejor de búsqueda, aunque todavía rudimentario, consiste en tener en cuenta las familias génicas que tienen representantes en varias, aunque no forzosamente todas, las especies de los tres dominios principales. Este tipo de análisis ha revelado 264 familias conservadas ancestrales. A cada una de estas familias se les puede asignar una función (como mínimo en términos de actividad bioquímica general, pero habitualmente con mayor precisión). La gran mayoría de estas familias génicas compartidas participan en la traducción y en el transporte y metabolismo de los aminoácidos (**Tabla 1–2**). Este conjunto de familias génicas altamente conservadas sólo representa una pequeña parte de la herencia común de la vida actual. Será posible reconstruir de forma más precisa el último ancestro universal gracias a nuevas secuenciaciones de genomas y análisis comparativos más detallados.

Las mutaciones revelan las funciones de los genes

Sin información adicional, la simple observación de la secuencia de los genes no permite determinar sus funciones. Podemos reconocer que el gen B es parecido al gen A, pero ¿cómo podemos determinar en primera instancia la función del gen A? Incluso conociendo la función del gen A, ¿cómo podemos decir si la función del gen B es la misma que la del gen A, como sugiere la similitud de sus secuencias? En definitiva, ¿cómo podemos conectar el mundo de la información genética abstracta y el mundo de los organismos vivos?

El análisis de las funciones de los genes depende de dos aproximaciones complementarias: la genética y la bioquímica. La aproximación genética arranca con el estudio de mutantes: podemos encontrar o elaborar un organismo en el que un gen determinado esté alterado y examinar los cambios que se producen en la estructura y en el comportamiento del organismo (**Figura 1–28**). La aproximación bioquímica examina la función de las moléculas: podemos extraer determinadas moléculas de un organismo y estudiar sus actividades químicas. Combinando ambas aproximaciones y estudiando las alteraciones químicas presentes en un organismo mutante, es posible encontrar las moléculas cuya producción depende de un determinado gen. Al mismo tiempo, los estudios del comportamiento de un organismo mutante pueden indicar las funciones de estas moléculas en el conjunto global del organismo. De esta forma, la genética y la bioquímica, conjuntamente, proporcionan un camino para relacionar los genes, las moléculas y la estructura y la función del organismo.

En los últimos años, se han producido rápidos progresos gracias el estudio de las secuencias del DNA y de las herramientas de la biología molecular. A partir de la comparación de secuencias podemos identificar subregiones particulares en el interior de un gen preservadas sin cambios durante el curso de la evolución. Es probable que estas subregiones conservadas sean, en términos funcionales, las zonas más importantes de un gen. Podemos analizar su contribución individual a la actividad del producto del gen ya que mediante experimentos es posible generar mutaciones en lugares concretos del gen o construir artificialmente genes híbridos que combinen partes de un gen y partes de otro gen. Otra

Tabla 1–2 Número de familias génicas, clasificadas por función, que son comunes para los tres dominios del mundo vivo

FUNCIÓN DE LA FAMILIA GÉNICA	NÚMERO DE FAMILIAS "UNIVERSALES"
Procesamiento de la información	
Traducción	63
Transcripción	7
Replicación, reparación y recombinación	13
Procesos celulares y señalización	
Control del ciclo celular, mitosis y meiosis	2
Mecanismos de defensa	3
Mecanismos de transducción de señal	1
Pared celular/biogénesis de membrana	2
Tráfico intracelular y secreción	4
Modificaciones postraduccionales, recambio proteico, chaperonas	8
Metabolismo	
Producción y conversión de energía	19
Metabolismo y transporte de carbohidratos	16
Metabolismo y transporte de aminoácidos	43
Metabolismo y transporte de nucleótidos	15
Metabolismo y transporte coenzimático	22
Metabolismo y transporte de lípidos	9
Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	8
Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios	5
Mal caracterizados	
Función bioquímica predecible, papel biológico desconocido	24

Para este análisis, las familias de genes se han definido como "universales" si se encuentran representadas en los genomas de al menos dos arqueas diferentes (*Archaeoglobus fulgidus* y *Aeropyrum pernix*), dos bacterias distantes evolutivamente (*Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*) y un eucariota (levadura, *Saccharomyces cerevisiae*). (Datos obtenidos de R.L. Tatusov, E.V. Koonin y D.J. Lipman, *Science*, 278:631-637, 1997, con el consentimiento de AAAS; R.L. Tatusov et al., BMC *Bioinformatics* 4:41, 2003, con el consentimiento de BioMed Central; y de la base de datos COGs de la US National Library of Medicine.)

posibilidad es diseñar organismos que produzcan grandes cantidades de RNA mensajero o de la proteína especificada por un gen, para facilitar el análisis bioquímico. Los especialistas en estructura molecular pueden establecer la conformación tridimensional del producto génico mediante la determinación la posición exacta de cada uno de sus átomos. Los bioquímicos pueden determinar cómo actúa cada una de las partes de la molécula, especificada genéticamente sobre el comportamiento químico global, y los biólogos celulares estudiar el comportamiento de las células diseñadas para expresar una versión mutante del gen.

Sin embargo, no se dispone de una receta universal para determinar la función de un gen ni de un formato universal para poder describirla. Por ejemplo, podemos descubrir que el producto de un gen determinado cataliza una cierta reacción química y no tener ni idea de la relevancia que tiene esta reacción en el organismo. La caracterización funcional de cada familia de productos génicos, aparte de la descripción pura de las secuencias génicas, representa un nuevo reto al ingenio de los biólogos. Además, no conoceremos nunca completamente la función real de un gen hasta que aprendamos cuál es su función en el organismo completo. Por lo tanto, para dar sentido a las funciones de los genes tenemos que estudiar organismos, no sólo moléculas o células aisladas.



Figura 1-28 Un fenotipo mutante puede reflejar la función de un gen. Una levadura normal (de la especie *Schizosaccharomyces pombe*) se compara con un mutante en el cual un solo cambio ha transformado a la célula desde una forma recta (*izquierda*) hasta una forma de T (*derecha*) fruto de la alteración de un gen. Por lo tanto, el gen mutado tiene una función en el control de la morfología celular. Pero, ¿cómo cumple esta función en términos moleculares? Es una pregunta difícil que necesita de un análisis bioquímico para poder ser contestada. (Cortesía de Kenneth Sawin y Paul Nurse.)

Los biólogos moleculares han centrado sus estudios en *E. coli*

Los organismos vivos son muy complejos, por lo que cuanto más aprendemos acerca de una especie cualquiera, más atractiva se vuelve como objetivo de estudios posteriores. Cada descubrimiento genera nuevas cuestiones y proporciona nuevas herramientas con las que podemos afrontar las preguntas generales en el contexto del organismo seleccionado. Por esta



Figura 1-29 El genoma de *E. coli*. (A) Conjunto de varias células de *E. coli*. (B) Diagrama del genoma de *E. coli* (para la cepa de *E. coli* K-12). El diagrama es circular debido a que el DNA de *E. coli*, como el de otros procariotas, forma un único circulo cerrado. Los genes que codifican proteínas se muestran en *barras amarillas* o *anaranjadas*, dependiendo de la cadena de DNA a partir de la que son transcritas. Los genes que codifican exclusivamente moléculas de RNA se indican con *flechas verdes*. Algunos genes se transcriben a partir de una cadena de la doble hélice de DNA (en el sentido de las agujas del reloj en este diagrama) y otras a partir de la otra cadena (en el sentido opuesto). (A, cortesía del doctor Tony Brain y David Parker/Photo Researchers; B, adaptado de F.R. Blattner y cols., *Science* 277:1453-1462, 1997. Con la autorización de AAAS.)

razón, muchos grupos de investigación han dirigido sus esfuerzos a analizar diferentes aspectos de un mismo **organismo modelo**.

En el enormemente variado mundo de las bacterias, el foco de atención de la biología molecular ha sido la bacteria *Escherichia coli* o *E. coli*. (véase Figuras 1-17 y 1-18). Esta pequeña bacteria con forma de bastoncillo vive por lo general en el tracto digestivo del hombre y de otros vertebrados, pero puede crecer fácilmente en el medio nutritivo de un frasco de cultivo. Se adapta a condiciones químicas variables, se reproduce rápidamente y puede evolucionar con rapidez por mutación y selección. Como ocurre con otras bacterias, diferentes cepas de *E. coli* clasificadas como miembros de una misma especie pueden diferenciarse genéticamente mucho más que lo que se diferencian entre sí diferentes variedades de organismos que se reproducen sexualmente, como una planta o un animal. Una cepa de *E. coli* puede tener muchos centenares de genes que no tiene otra cepa, de forma que ambas pueden tener en común sólo el 50% de su genoma. La cepa estándar de laboratorio de *E. coli* K-12 tiene un genoma de unos 4,6 millones de pares de nucleótidos en una sola molécula de DNA circular, que codifica unos 4300 tipos de proteínas diferentes (**Figura 1-29**).

En términos moleculares, tenemos un conocimiento más profundo de la biología de *E. coli* que de la de cualquier otro organismo vivo. La mayor parte de nuestro conocimiento sobre los mecanismos fundamentales de la vida, por ejemplo, cómo se replica el DNA o cómo se descodifican las instrucciones contenidas en el DNA para dirigir la síntesis de una proteína, proceden de estudios realizados en *E. coli*. Los mecanismos genéticos básicos son procesos que se conservan a lo largo de la evolución y son también esenciales en nuestras células y en *E. coli*.

Resumen

Los procariotas (células sin núcleo diferenciado) son los organismos más diversos bioquímicamente. Incluyen especies que pueden obtener toda su energía y todos sus nutrientes a partir de fuentes

químicas inorgánicas como las mezclas reactivas de materiales que se generan en los afloramientos hidrotermales del fondo oceánico (un tipo de dieta que pudo nutrir las primeras células vivas hace 3,5 mil millones de años). Las comparaciones de las secuencias de DNA revelan las relaciones familiares entre los organismos vivos y han mostrado que los procariotas se clasifican en dos grupos de divergencia temprana durante el curso de la evolución: las bacterias (o eubacterias) y las arqueas. Conjuntamente con los eucariotas (células con un núcleo incluido en una membrana) constituyen las tres ramas principales del árbol de la vida. La mayoría de las bacterias y de las arqueas son pequeños organismos unicelulares con genomas compactos de entre 1000 y 6000 genes. Muchos de los genes de un organismo muestran profundos parecidos familiares en sus secuencias de DNA, lo que implica que se generaron a partir de un mismo gen ancestral a través de duplicación y divergencia génicas. Los parecidos familiares (homologías) también resultan evidentes cuando se comparan secuencias génicas entre especies diferentes. Se han descrito más de 200 familias génicas tan conservadas que se pueden reconocer como comunes en la mayoría de las especies de los tres dominios del mundo vivo. Así, una vez conocemos la secuencia de DNA de un nuevo gen, a menudo es posible deducir su función a partir de la función de un gen homólogo estudiada en un organismo modelo intensamente estudiado, como la bacteria E. coli

LA INFORMACIÓN GENÉTICA EN EUCARIOTAS

En general, las células eucariotas son mayores y más complejas que las células procariotas. Sus genomas también son más grandes y más elaborados que los procariotas. Su mayor tamaño se asocia a diferencias radicales en la estructura y en las funciones celulares. Además, muchos tipos de células eucariotas pueden forman organismos pluricelulares que adquieren un nivel de complejidad inalcanzable por cualquier procariota.

Debido a su complejidad, los organismos eucariotas enfrentan a los biólogos moleculares con un conjunto especial de retos, algunos de los cuales expondremos en este libro. Cada vez más, los biólogos abordan estos retos a través del análisis y la manipulación de la información genética presente en las células y en los organismos. Por ello, resulta importante para los profanos conocer alguna de las características especiales del genoma eucariota. Comenzaremos con una breve revisión sobre la organización de las células eucariotas, sobre cómo esta organización se refleja en su estilo de vida y sobre las diferencias entre los genomas de los procariotas. Este conocimiento delimitará la estrategia mediante la que los biólogos moleculares, aprovechando la información genética, intentan descubrir cómo funcionan los organismos eucariotas.

Las células eucariotas se originaron como depredadores

Por definición, las células eucariotas mantienen su DNA en un compartimiento interno llamado núcleo. La *envoltura nuclear*, una membrana de doble capa, envuelve el núcleo y separa el DNA del citoplasma. Los eucariotas también tienen otras características que los distinguen de los procariotas (**Figura 1–30**). Sus células son unas 10 veces más largas y unas 1000 veces más voluminosas. Poseen un *citoesqueleto*, esto es, un sistema de proteínas filamentosas que cruzan el citoplasma y que forman, conjuntamente con la gran cantidad de proteínas que se unen a ellas, un sistema de motores, rodillos y entrecruzamientos que dan a la célula su tensión mecánica, controlan su forma y dirigen y guían sus movimientos. <GTTA> <ATGG> <TCGC> La envoltura nuclear constituye sólo una parte de un sistema de *membranas internas* cuya estructura es similar a la de la membrana plasmática, y que delimitan espacios diferenciados en la célula, muchos de los cuales participan en la digestión y en la secreción. Las células animales y las células eucariotas de vida libre llamadas *protozoos* pueden cambiar su forma rápidamente y engullir otras células y pequeños objetos por *fagocitosis* debido a la ausencia de una pared semejante a la bacteriana (**Figura 1–31**).

Desconocemos cómo y en qué orden han evolucionado estas propiedades. Una posibilidad es que todas las células eucariotas constituyan el reflejo de la forma de vida de una célula eucariota primigenia depredadora que vivía capturando y alimentándose de otras células (**Figura 1–32**). Este tipo de vida requiere una célula de gran tamaño con una membrana plasmática flexible con un citoesqueleto capaz de soportar y mover esta membrana. Además, requiere que el largo y frágil DNA esté retenido en un compartimiento nuclear aislado, para proteger el genoma de posibles daños producidos durante el movimiento del citoesqueleto.

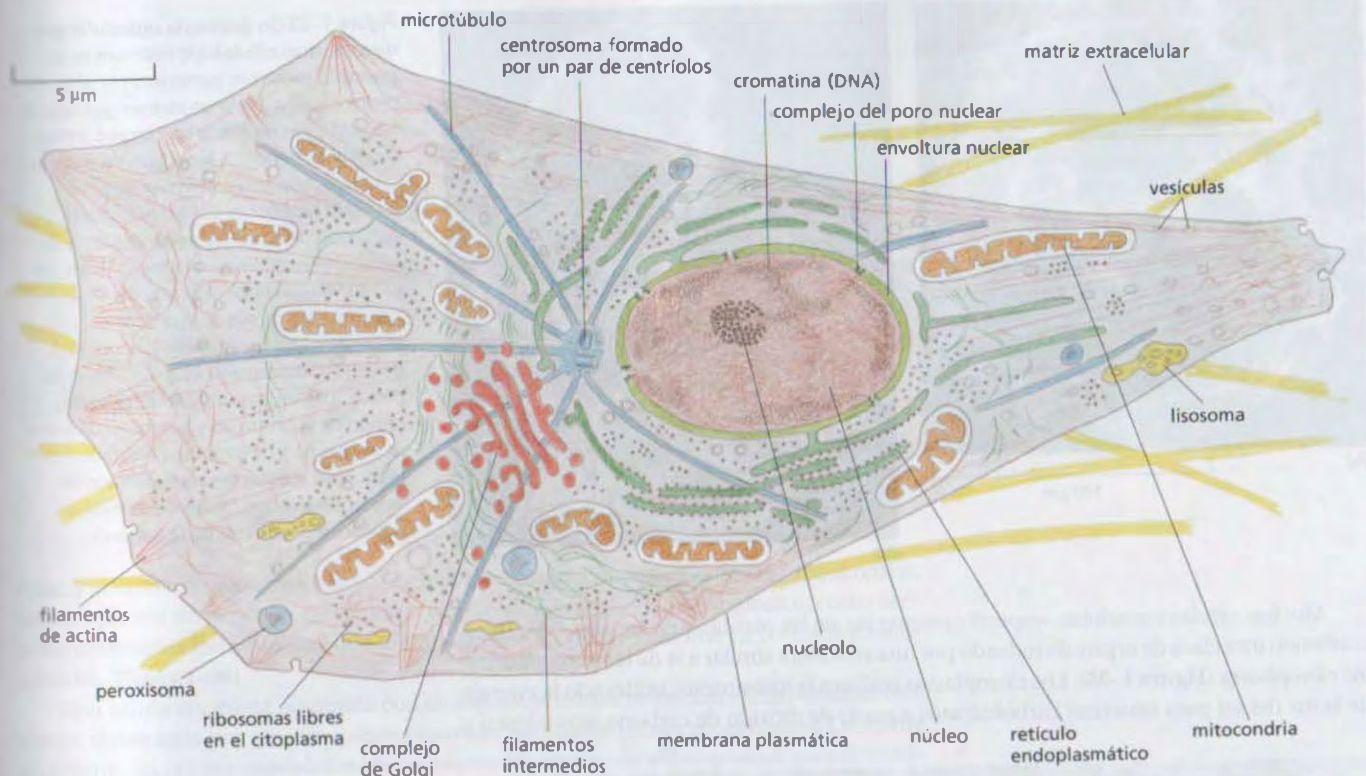


Figura 1-30 **Características principales de las células eucariotas.** El esquema ilustra una célula animal típica. No obstante, la práctica totalidad de sus componentes pueden encontrarse en vegetales, hongos y eucariotas unicelulares como las levaduras y protozoos. Las células vegetales contienen cloroplastos además de los elementos mostrados y su membrana plasmática está rodeada por una resistente pared celular formada mayoritariamente por celulosa.

Las células eucariotas actuales han evolucionado gracias a un proceso simbiótico

Una forma de vida predadora nos ayuda a explicar otra característica de las células eucariotas. Prácticamente todas estas células contienen *mitocondrias* (**Figura 1-33**). Se trata de pequeños corpúsculos en el citoplasma, envueltos por una doble membrana, que capturan oxígeno y generan energía a partir de la oxidación de moléculas alimenticias –como los azúcares– produciendo así la mayor parte del ATP que consumen las actividades de la célula. Las mitocondrias tienen un tamaño parecido al de las bacterias más pequeñas y, como ellas, contienen su propio genoma en forma de una molécula circular de DNA, sus propios ribosomas que son diferentes a los de las células eucariotas y sus propios RNA de transferencia. Está generalmente aceptado que las mitocondrias se originaron a partir de bacterias libres metabolizadoras de oxígeno (*aeróbicas*) que fueron capturadas por una célula eucariota ancestral que no podía utilizar el oxígeno por sí misma (es decir, que era *anaeróbica*). Al escapar de la digestión, estas bacterias evolucionaron en simbiontes con la célula que las capturó y con su progenie, recibiendo refugio y alimentación en compensación por la generación de energía que producían para sus huéspedes (**Figura 1-34**). Parece que esta asociación entre una célula predadora eucariota, anaeróbica y primitiva, y la bacteria se estableció hace unos mil quinientos millones de años, cuando la atmósfera de la Tierra empezó a enriquecerse en oxígeno.

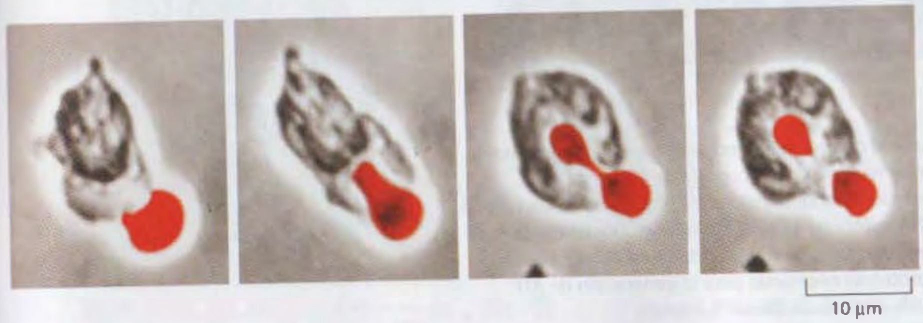


Figura 1-31 **Fagocitosis.** Esta serie de imágenes obtenidas de una película muestran un glóbulo blanco humano (un neutrófilo) incorporando un eritrocito incubado con anticuerpos (coloreado artificialmente de *rojo*). (Cortesía de Stephen E. Malawista y Anne de Boisfleury Chevance.)

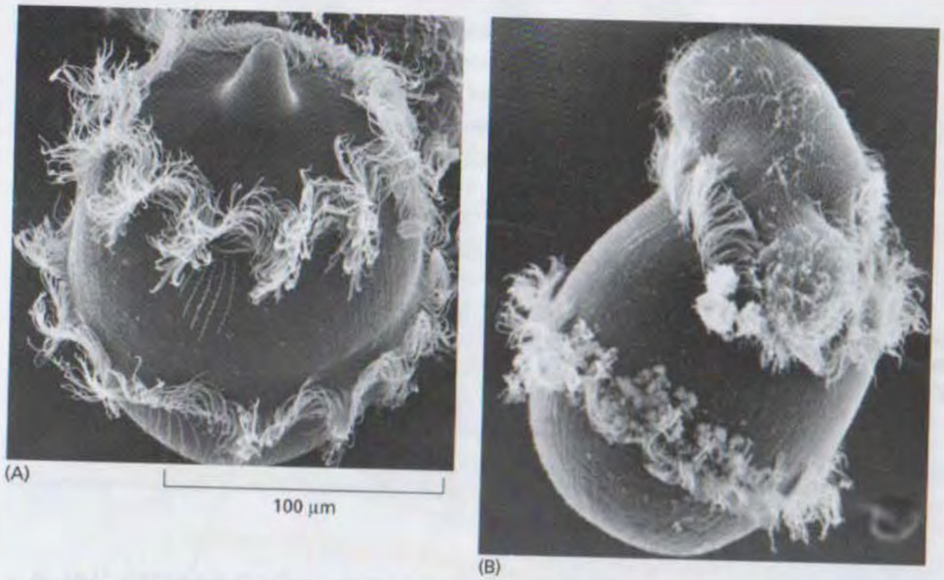


Figura 1–32 Un eucariota unicelular que devora otras células. (A) *Didinium* es un protozoo carnívoro perteneciente al grupo de los *ciliados*. Tiene un cuerpo globular de unos 150 µm de diámetro con dos anillos de cilios –apéndices semejantes a flagelos–, sinuosos, que baten constantemente. Su parte anterior es lisa excepto por la presencia de una protrusión en forma de labio. (B) Normalmente *Didinium* nada por el agua a gran velocidad gracias al batido sincronizado de sus cilios. Cuando encuentra una presa asequible, por lo general otro protozoo, libera multitud de pequeños dardos paralizantes desde su región de la protrusión. Entonces, *Didinium* se engancha y devora a su presa por fagocitosis mediante una expansión de su membrana que casi es de su mismo tamaño. (Por cortesía de D. Barlow.)

Muchas células eucariotas –específicamente las de las plantas y de las algas– también contienen otra clase de orgánulo rodeado por una envoltura similar a la de las mitocondrias: los *cloroplastos* (**Figura 1–35**). Los cloroplastos realizan la fotosíntesis, utilizando la energía de la luz del sol para sintetizar carbohidratos a partir de dióxido de carbono atmosférico y

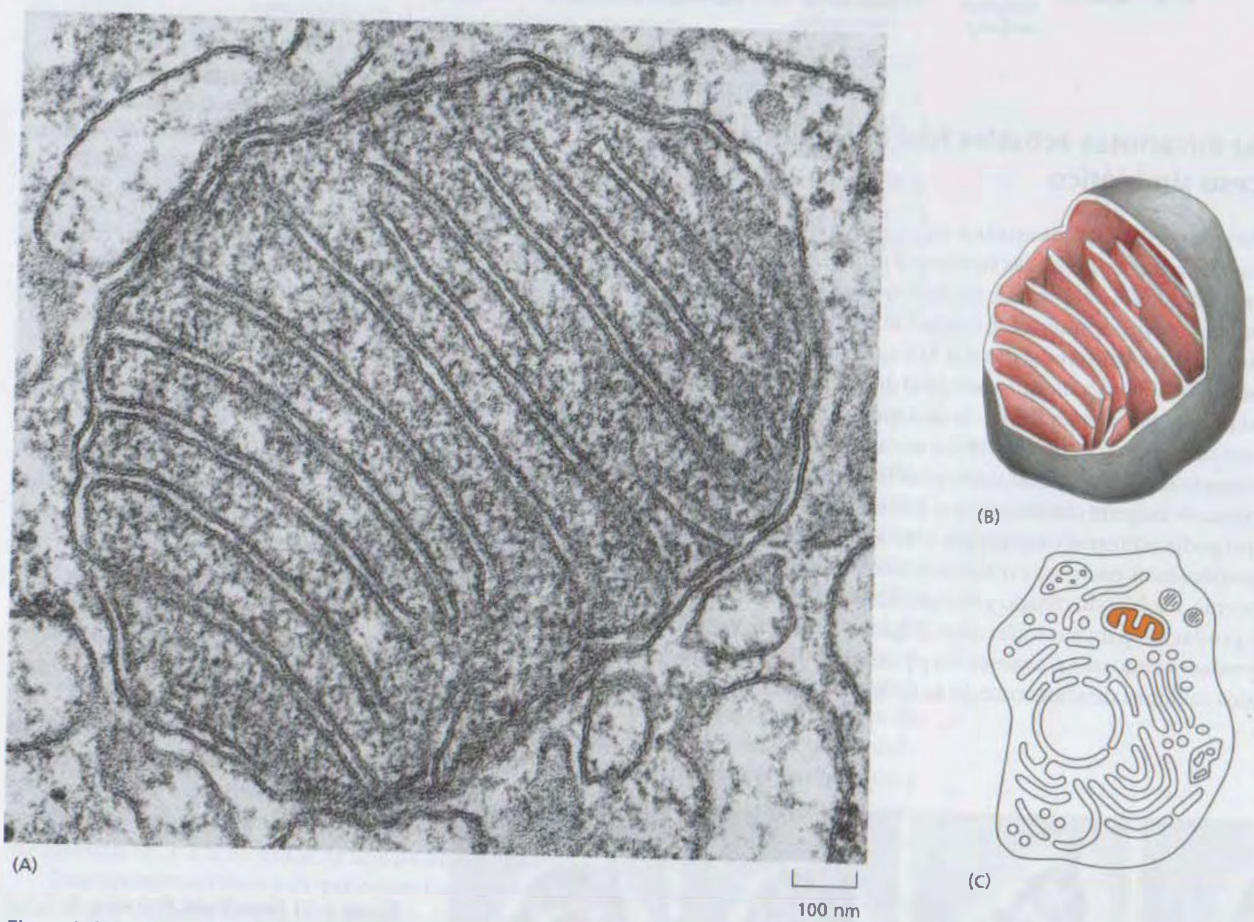


Figura 1–33 Una mitocondria. (A) Sección longitudinal de una mitocondria observada por medio de un microscopio electrónico de transmisión. (B) Esquema de una mitocondria de la que se ha eliminado un fragmento para poder observar su estructura tridimensional. (C) Esquema de una célula eucariota con una mitocondria, conteniendo el DNA mitocondrial y los ribosomas. Obsérvese la membrana externa lisa en contraste con los repliegues o crestas mitocondriales de la membrana interior. Las crestas mitocondriales contienen las proteínas necesarias para la generación de ATP a partir de la oxidación de moléculas alimenticias. (A, cortesía de Daniel S. Friend.)

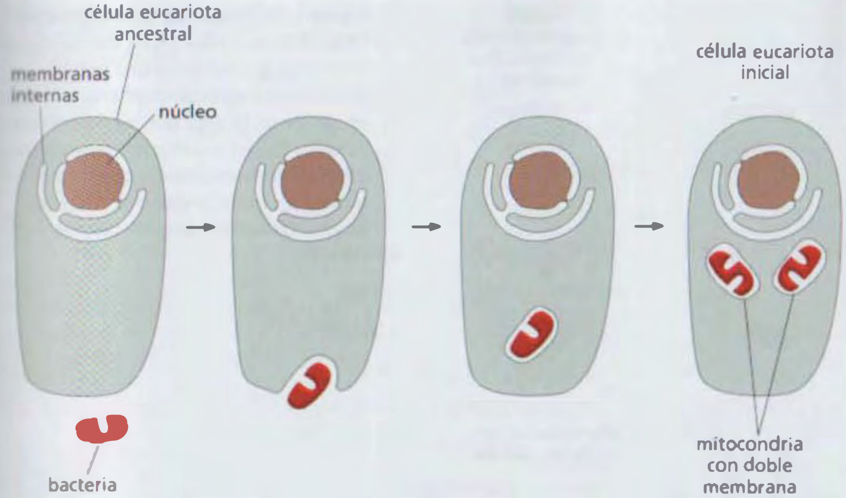


Figura 1–34 El origen de las mitocondrias. Se cree que una célula eucariota ancestral fagocitó la bacteria ancestral de las actuales mitocondrias e inició una relación simbiótica.

agua, y liberan los productos a la célula huésped como alimento. Como las mitocondrias, los cloroplastos tienen su propio genoma y casi con toda seguridad se originaron como bacterias simbiontes fotosintéticas que fueron capturadas por células que ya contenían mitocondrias (**Figura 1–36**).

Una célula eucariota equipada con cloroplastos no necesita cazar otras células; está siendo alimentada por sus cloroplastos cautivos heredados de sus progenitores. De forma semejante, las células vegetales, aunque poseen un equipo de citoesqueleto para el movimiento han perdido la capacidad de cambiar rápidamente su morfología y de capturar otras células por fagocitosis. Por el contrario, crean a su alrededor una fuerte y protectora pared celular. Si la célula eucariota ancestral fue realmente un depredador de otros organismos, podemos considerar a las células vegetales como eucariotas que han efectuado una transición desde la caza a la agricultura.

Los hongos representan otra manera de vida eucariota. Las células de los hongos, como las células animales, tienen mitocondrias pero no cloroplastos. Pero a diferencia de las células animales y de los protozoos, tienen una pared externa robusta que limita su capacidad de movimiento rápido y de devorar otras células. Parece que los hongos han pasado de ser cazadores a basureros: otras células secretan moléculas de nutrientes o las liberan cuando mueren; los hongos se alimentan de estas moléculas y realizan una digestión necesariamente extracelular gracias a la secreción de enzimas digestivas al exterior.

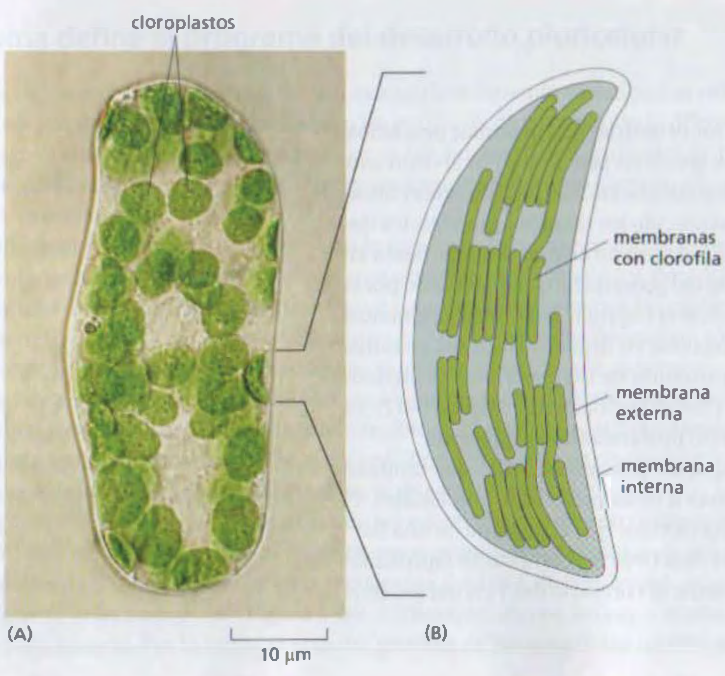


Figura 1–35 Los cloroplastos. Estos orgánulos capturan la energía de la luz del sol en células vegetales y en algunos eucariotas unicelulares. (A) Célula aislada de una hoja de una planta con flor, vista al microscopio óptico, que muestra sus cloroplastos verdes. (B) Esquema de uno de los cloroplastos y de su sistema interno de membranas replegadas que contienen las moléculas de clorofila, por las que se absorbe la luz. (A, cortesía de Preeti Dahiya.)

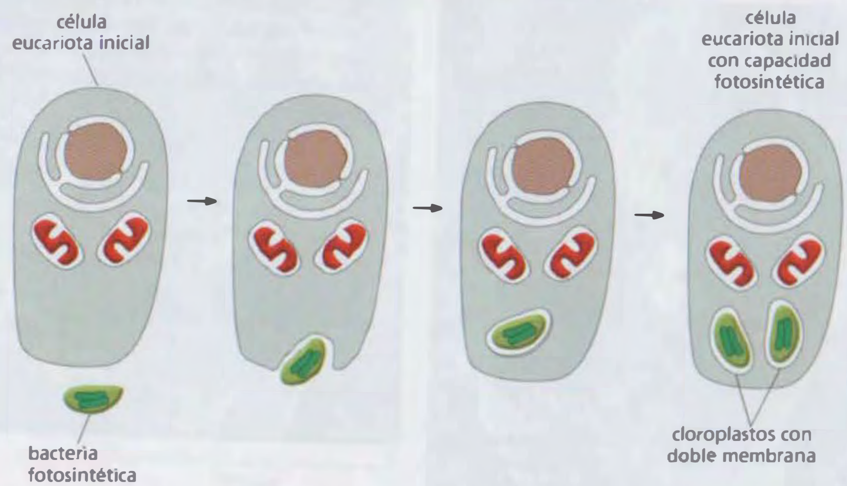


Figura 1-36 Origen de los cloroplastos. Una célula eucariota inicial, que ya contenía mitocondrias, incorporó una bacteria fotosintética (una cianobacteria) y la retuvo en simbiosis. Se cree que los cloroplastos actuales tienen sus ancestros en una sola especie de cianobacterias que fueron adoptadas como simbiontes internos (endosimbiontes) hace mil millones de años.

Los eucariotas tienen genomas híbridos

La información génica de las células eucariotas tiene un origen híbrido, ya que procede de ancestros eucariotas anaeróbicos y de las bacterias que adoptaron como simbiontes. La mayor parte de esta información está almacenada en el núcleo, pero pequeñas cantidades de ella residen todavía en el interior de las mitocondrias y, en las células vegetales y en las algas, en los cloroplastos. El DNA mitocondrial y el DNA de los cloroplastos se puede separar del DNA nuclear, y se puede analizar y secuenciar. Se ha encontrado que el genoma de las mitocondrias y de los cloroplastos está degenerado, ya que se trata de versiones acortadas de los genomas bacterianos de los que derivan y carecen de muchos de los genes que tienen funciones esenciales. Por ejemplo, en una célula humana el genoma mitocondrial sólo tiene 16.569 pares de nucleótidos y codifica 13 proteínas, dos componentes del RNA ribosómico y 22 RNA de transferencia.

Los genes que faltan en el genoma de las mitocondrias y de los cloroplastos no se han perdido totalmente, ya que muchos de ellos se han trasladado desde el genoma del simbionte al DNA del núcleo del huésped por mecanismos desconocidos. El DNA nuclear humano contiene muchos genes que codifican proteínas cuyas funciones se ejercen en el interior de las mitocondrias. En los vegetales, el DNA nuclear también contiene genes que especifican proteínas necesarias en los cloroplastos.

El genoma eucariota es grande

La selección natural ha favorecido evidentemente las mitocondrias con genomas pequeños, de la misma forma que ha favorecido las bacterias con genomas pequeños. Por el contrario, parece que los genomas nucleares de la mayoría de los eucariotas han podido crecer libremente. Posiblemente la forma de vida eucariota ha favorecido los tamaños grandes: los depredadores necesitan ser más grandes que sus presas y el tamaño celular se incrementa en proporción al tamaño de su genoma. Quizá el aumento del genoma ha estado dirigido por la acumulación de elementos parásitos transponibles (véase el Capítulo 5), es decir, segmentos "egoístas" de DNA que pueden insertar copias de sí mismos en diversos sitios del genoma. Sea cual sea la explicación correcta, el genoma de la mayoría de los eucariotas es algunos órdenes de magnitud mayor que el de las eubacterias y las arqueobacterias (**Figura 1-37**). La libertad de crecimiento de la cantidad de DNA ha tenido profundas consecuencias.

Los eucariotas no solamente tienen más genes que los procariotas, sino que también tienen muchísimo más DNA que no codifica proteínas u otras moléculas funcionales. El genoma humano contiene 1000 veces más pares de nucleótidos que el genoma de una bacteria típica, 20 veces más genes y cerca de 10.000 veces más DNA no-codificante (aproximadamente el 98,5% del genoma humano es no-codificante, al contrario del 11% del genoma de la bacteria *E. coli*).

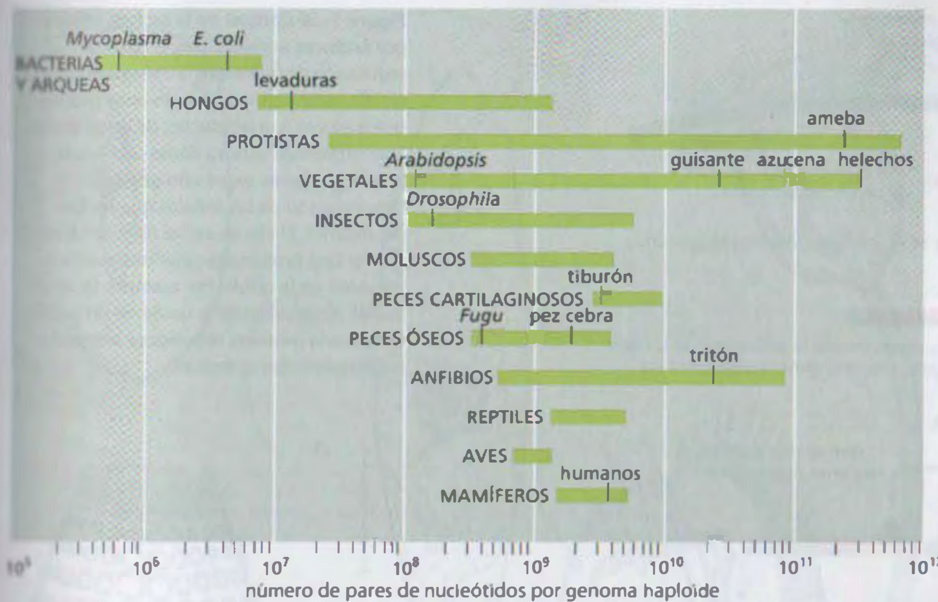


Figura 1–37 **Comparación de tamaños de genomas.** El tamaño del genoma se muestra en pares de nucleótidos de DNA por genoma haploide, es decir, por copia sencilla de genoma. (Las células de los organismos de reproducción sexual son diploides: contienen dos copias del genoma, una heredada de la madre y otra del padre.) Organismos muy relacionados pueden variar mucho en su cantidad de DNA, a pesar de que tienen un número similar de genes funcionales diferentes. (Datos obtenidos de W.H. Li, Molecular Evolution, pp. 380-383. Sunderland, MA, Sinauer, 1997.)

Los genomas de eucariotas son ricos en DNA de regulación

Es casi seguro que la mayor parte de nuestro DNA no-codificante es "chatarra" que podría eliminarse, que se ha mantenido como un conjunto de papeles viejos porque sin la presión de hacer que un archivo sea pequeño, es más sencillo retenerlo todo que escoger la información valiosa para descartar el resto. Algunas especies eucariotas excepcionales, como el pez globo (**Figura 1–38**), constituye un ejemplo del libertinaje con sus congéneres; tienen la capacidad de desprenderse de grandes cantidades de DNA no-codificante. A pesar de ello, este pez es similar en estructura, comportamiento y capacidades a otras especies próximas que tienen muchísima mayor cantidad de este DNA no-codificante.

Incluso en genomas eucariotas compactos como el del pez globo, hay más DNA no-codificante que DNA codificante. Parte de este DNA no-codificante tiene funciones importantes, ya que regula la expresión de genes adyacentes. Con este DNA de regulación, los eucariotas han desarrollado vías diferentes de control de cuándo y cómo se ponen en juego los diferentes genes. Esta sofisticada regulación génica es crucial para la formación de organismos pluricelulares complejos.

El genoma define el programa del desarrollo pluricelular

Las células de un animal o de un vegetal son extraordinariamente variadas. Las células adiposas, las células de la piel, las células óseas o las neuronas muestran todo lo diferentes que pueden llegar a ser unas células. Todos estos tipos celulares son descendientes de una célula huevo fecundada (con pocas excepciones) y contienen un número idéntico de copias del genoma de la especie.

Las diferencias proceden de la forma en la que las células hacen uso selectivo de sus instrucciones genéticas siguiendo las claves que obtienen de su alrededor durante el desarrollo embrionario. El DNA no es sólo una lista de compra que especifica las moléculas que cada célula debe tener y la célula no es un conjunto de todos los ítems de esa lista. Por el contrario, la célula se comporta como una máquina multifuncional, dotada de sensores que reciben las señales ambientales y dotada de una gran habilidad para poder activar determinados grupos de genes según la secuencia de señales recibidas. El genoma es suficientemente grande como para acomodar la información que especifica un organismo pluricelular completo, pero cada una de las células sólo utiliza una parte de esta información.

Una gran parte de los genes del genoma de los eucariotas codifica proteínas que regulan la actividad de otros genes. La mayor parte de estas *proteínas reguladoras de genes* actúan uniéndose directa o indirectamente a las secuencias del DNA de regulación, adyacentes a los genes que se deben controlar (**Figura 1–39**) o interfiriendo con las capacidades de otras proteínas para hacerlo. Por lo tanto, el enorme genoma de los eucariotas no sólo especifica



Figura 1–38 **El pez globo (*Fugu rubripes*).** Este organismo tiene un genoma de 400 millones de pares de nucleótidos, una cuarta parte del genoma del pez cebra, aunque ambas especies de peces tienen un número similar de genes. (De una talla en madera de Hiroshige, cortesía de Arts and Designs of Japan.)

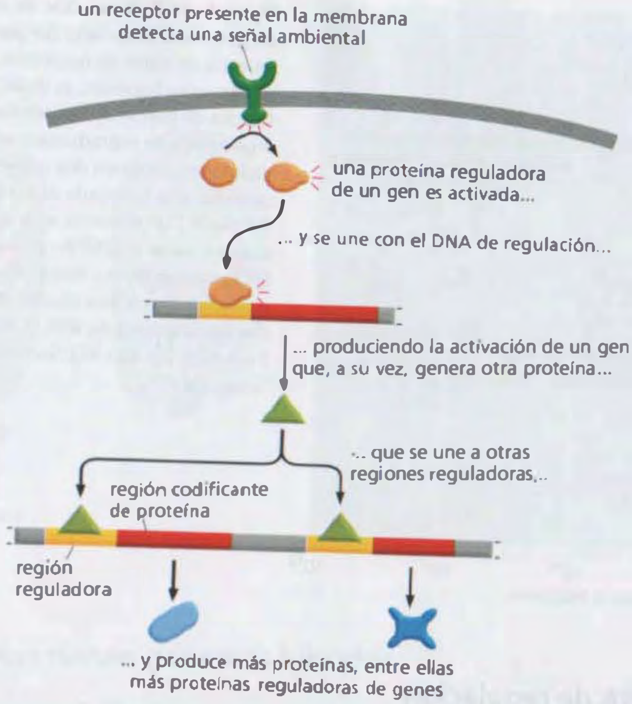


Figura 1-39 Control de la lectura génica por factores ambientales. El DNA de regulación permite que la expresión génica pueda estar regulada por diversas proteínas, que a su vez son productos de otros genes. Este esquema muestra cómo una célula puede ajustar su expresión génica dependiendo de las señales que recibe del exterior. El efecto inicial de la señal es activar una proteína reguladora que está presente en la célula. Por ejemplo, la señal puede desencadenar la unión de un grupo fosfato a la proteína reguladora alterando sus propiedades químicas.

el "hardware" de la célula, sino que también almacena el "software" que controla cómo se utiliza este "hardware" (**Figura 1-40**).

Las células no sólo reciben señales de forma pasiva; en lugar de ello, intercambian señales activamente con sus vecinas. Así, en un organismo pluricelular en desarrollo cada célula está gobernada por el mismo sistema de control, pero con consecuencias diferentes dependiendo de los mensajes intercambiados. Sorprendentemente, el resultado final es un patrón ordenado y preciso de células en diferentes estadios, cada una de las cuales muestra unas características apropiadas a su posición en la estructura pluricelular.

Muchos eucariotas viven como células solitarias: los protistas

Muchas especies de células eucariotas llevan una vida solitaria: algunas como cazadores (los *protozoos*), algunas como fotosintetizadores (las algas *unicelulares*) y otras como basureros (los hongos unicelulares o las *levaduras*). La **Figura 1-41** muestra algunas de las morfologías variadas que pueden tener estos eucariotas unicelulares o *protistas*. Especialmente la anatomía de los protozoos es, a menudo, muy elaborada e incluye estructuras específicas como vibrisas sensoriales, fotorreceptores, cilios sinusoidales, apéndices parecidos a extre-



Figura 1-40 Control génico del programa de desarrollo pluricelular. El papel de un gen de regulación se demuestra en el diente de dragón (género *Antirrhinum*). En este ejemplo, una mutación en un solo gen que codifica una proteína reguladora provoca el desarrollo de hojas en el lugar de flores: como la proteína de regulación ha cambiado, las células adoptan características que serían apropiadas para posiciones diferentes en la planta normal. El mutante está en la izquierda de la imagen y la planta normal en la derecha. (Cortesía de Enrico Coen y Rosemary Carpenter.)

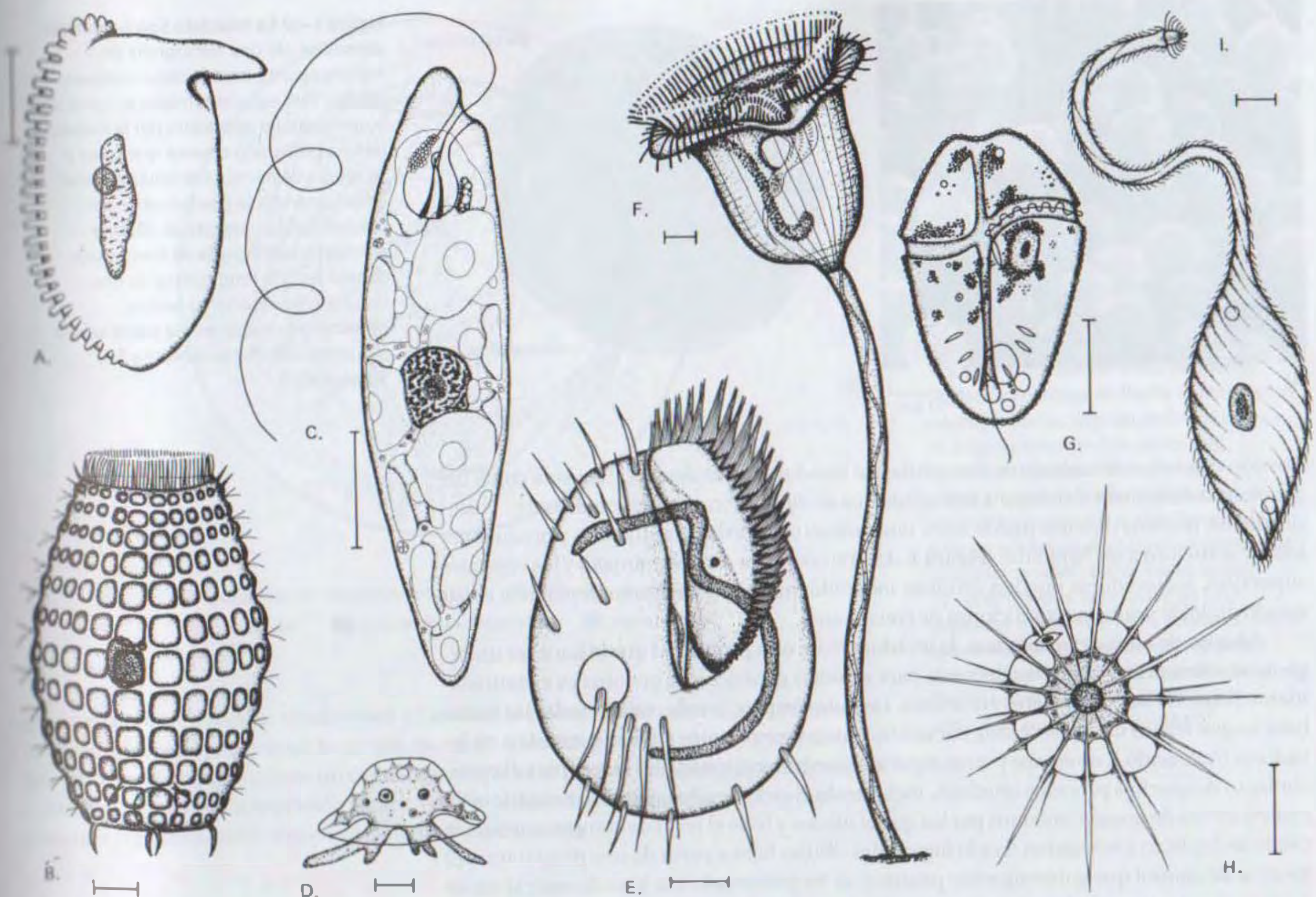


Figura 1–41 Miscelánea de protistas: un pequeño ejemplo de una clase muy diversa de microorganismos. Los dibujos se han realizado a diferentes escalas, pero en cada caso la barra de calibración representa 10 micras. Los organismos de (A), (B), (E), (F) e (I) son ciliados; (C) es un euglenoide; (D) es una ameba; (G) es un dinoflagelado; (H) es un heliozoo. (De M.A. Sleigh, Biology of Protozoa. Cambridge, UK; Cambridge University Press, 1973.)

midades, partes con funciones bucales, aguijones o haces contráctiles similares a músculos. Aunque son unicelulares, los protozoos pueden ser tan versátiles, tan intrincados y presentar comportamientos tan complejos como lo pueden ser muchos organismos pluricelulares (véase Figura 1–32). <ATGG><TCGC>

En términos de sus antecesores y de la secuencia del DNA, los protistas son más diversos que los animales pluricelulares, los vegetales y los hongos, que proceden de 3 ramas parecidas próximas en el "pedigrí" eucariota (véase Figura 1–21). Como los procariotas, los humanos han tendido a menospreciar los protistas porque son microscópicos. En la actualidad, con el desarrollo del análisis genómico, hemos empezado a entender su posición en el árbol de la vida y hemos empezado a contextualizar los indicios que estas extrañas criaturas nos ofrecen sobre nuestro distante pasado evolutivo.

Una levadura es el modelo eucariota más pequeño

A menudo, la complejidad molecular y genética nos intimida. Incluso más que los procariotas, los biólogos y biólogas necesitan concentrar sus limitados recursos en unos cuantos modelos de organismos eucariotas seleccionados para entender su complejidad.

Para analizar el interior de una célula eucariota, sin tener problemas adicionales derivados del desarrollo pluricelular, es necesario utilizar especies que siendo unicelulares sean lo más sencillas posible. La elección popular de este modelo eucariota mínimo ha sido la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (**Figura 1–42**), la misma especie que se utiliza para elaborar la cerveza o el pan.

S. cerevisiae es un pequeño miembro unicelular del reino de los hongos y, de acuerdo con los puntos de vista actuales, es tan próximo a los animales como a los vegetales. Es resistente y fácil de cultivar en un medio nutritivo sencillo. Como otros hongos tiene una pared celular, es relativamente inmóvil y presenta mitocondrias pero no cloroplastos. Cuando el medio de cultivo contiene gran cantidad de nutrientes, crece y se divide casi tan rápidamente como lo haría una bacteria. Puede reproducirse vegetativamente (es decir, por simple

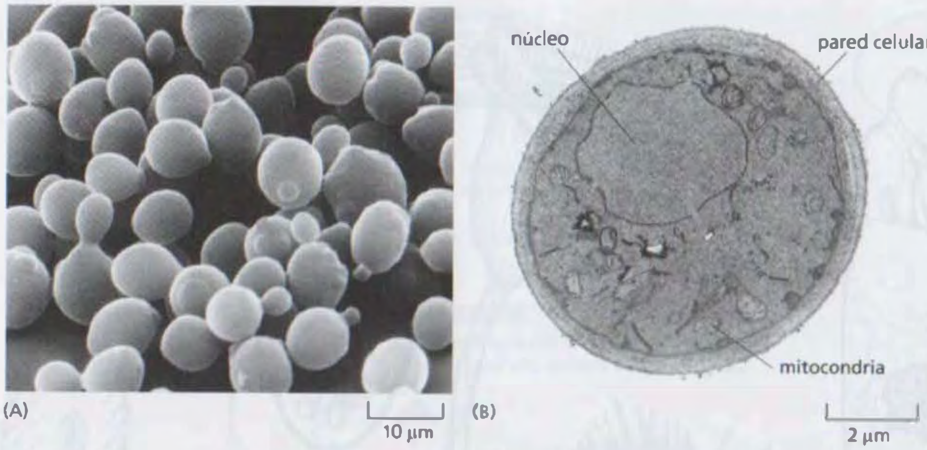


Figura 1–42 La levadura *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Una micrografía de microscopia de barrido de un conjunto de células. Esta especie también es conocida como levadura gemadora por la formación de una protrusión o gema que crece y se separa del resto de la célula original. En la fotografía se pueden observar muchas células con gemas. (B) Una electromicrofotografía de transmisión de una sección longitudinal de una levadura. Se observa su núcleo, mitocondrias y una gruesa pared celular. (A, cortesía de Ira Herskowitz y Eric Schabatach.)

división celular), o sexualmente: dos células de levadura *haploides* (con una sola copia del genoma) se fusionan y dan lugar a una célula que es *diploide* (con un genoma doble). Posteriormente, la célula diploide puede sufrir una *meiosis* (una división reductora) y produce células que vuelven a ser haploides (**Figura 1–43**). En contraste con los animales y los vegetales superiores, las levaduras pueden dividirse indefinidamente en su estado haploide o en su estado diploide según las condiciones de crecimiento.

Además de estas características, la levadura tiene otra propiedad que la hace ser un organismo extraordinariamente adecuado para estudios genéticos: su genoma es extremadamente pequeño bajo estándares eucariotas. De todas formas, puede realizar todas las tareas básicas que realiza cualquier célula eucariota. Como veremos más adelante, estudios en levaduras (utilizando *S. cerevisiae* y otras especies) han proporcionado las claves para el conocimiento de muchos procesos cruciales, incluyendo el ciclo de división celular eucariota: la cadena crítica de acontecimientos por los que el núcleo y todo el resto de componentes de la célula se duplican y se separan dando lugar a dos células hijas a partir de una progenitora. El sistema de control que gobierna estos procesos se ha preservado tan bien durante el curso de la evolución que muchos de sus componentes pueden ser funcionales indistintamente en levaduras o en células humanas: si una levadura mutante a la que le falta un gen esencial para el ciclo de división celular se suplementa con una copia de un gen homólogo humano, la levadura compensa su defecto y puede dividirse con normalidad.

Los niveles de expresión de todos los genes de un organismo se pueden seguir simultáneamente

La secuencia completa del genoma de *S. cerevisiae*, determinada en 1997, consiste en unos 13.117.000 pares de nucleótidos incluyendo la pequeña contribución del DNA mitocondrial (78.520 pares de nucleótidos). Este total sólo es unas 2,5 veces la cantidad de DNA de *E. coli* y codifica unas 1,5 veces más tipos de proteína que la bacteria (alrededor de 6300 en total). El estilo de vida de *S. cerevisiae* es similar en muchos aspectos al de la bacteria, y parece que esta levadura ha sido objeto de presiones selectivas que han mantenido su genoma compacto.

El conocimiento de la secuencia completa de un organismo –de una levadura o de un humano– abre nuevas perspectivas al conocimiento del funcionamiento de la célula: lo que antes parecía imposible ahora lo tenemos al alcance de la mano. Mediante técnicas que se describen en el Capítulo 8, hoy en día es posible, por ejemplo, seguir simultáneamente la cantidad de mRNA transcrito que se produce a partir de cada gen del genoma de una levadura bajo cualquier condición escogida, y observar cómo cambia este patrón completo de actividad

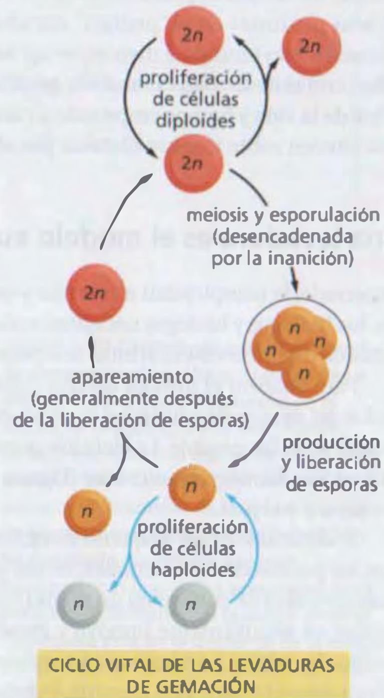


Figura 1–43 Los ciclos reproductores de la levadura *S. cerevisiae*. Dependiendo de las condiciones ambientales y de detalles de su genotipo, las células de esta especie pueden estar en estado diploide (2*n*), con un doble conjunto de cromosomas, o en estado haploide (*n*) con un solo conjunto de cromosomas. La forma diploide puede proliferar por división celular ordinaria o sufrir meiosis produciendo células haploides. La forma haploide puede proliferar por división celular normal o sufrir una fusión sexual con otra célula haploide convirtiéndose en diploide. La meiosis se produce por falta de alimento y da lugar a esporas (células haploides en estado latente, muy resistentes a condiciones ambientales adversas).

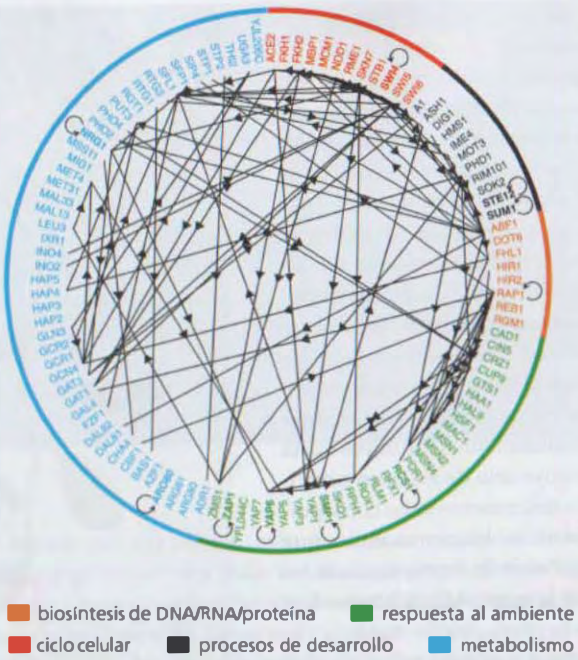


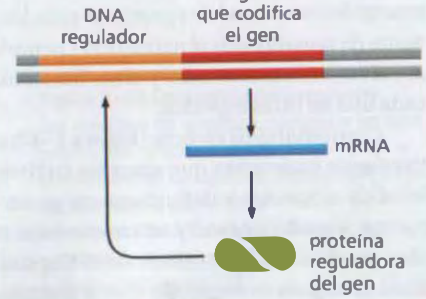
Figura 1–44 Red de interacciones entre proteínas reguladoras de genes y los genes que las codifican, en una célula de levadura. Se muestran los resultados de 106 de las 141 proteínas reguladoras de genes de *Saccharomyces cerevisiae*. De cada una de las proteínas se estudia su capacidad de unirse al DNA regulador de cada uno de los genes que codifican este conjunto de proteínas. En el diagrama los genes se distribuyen en círculo. Una flecha que apunta desde el gen A al gen B indica que la proteína codificada por A se une al DNA regulador de B, por lo que probablemente regula la expresión de B. Los pequeños círculos con cabeza de flecha indican genes cuyos productos regulan de forma directa su propia expresión. Los genes que gobiernan aspectos diferentes del comportamiento celular se muestran en colores diferentes. En el caso de una planta o de un animal pluricelulares, el número de proteínas reguladoras de genes es unas 10 veces mayor y la cantidad de DNA regulador quizás 100 veces mayor, de forma que el diagrama correspondiente sería extraordinariamente más complicado. (De T.I. Lee et al., *Science* 298:799-804, 2002. Con autorización de AAAS.)

génica cuando cambian las condiciones. El análisis se puede repetir con mRNA preparado a partir de mutantes que carecen de un gen escogido –cualquier gen bajo estudio. En principio esta aproximación proporciona un camino para revelar el sistema completo de relaciones de control que gobiernan la expresión génica, no sólo en las células de levadura sino también en cualquier organismo cuya secuencia genómica sea conocida.

Para que las células tengan sentido, necesitamos las matemáticas, ordenadores e información cuantitativa

A través de métodos que se basan en la información que tenemos sobre secuencias completas de genomas, es posible hacer listas de genes y de proteínas de una célula y empezar a intuir la red de interacciones que existen entre ellos (**Figura 1-44**). Pero, ¿cómo conseguiremos integrar toda esta información para conseguir entender cómo funcionan las células? Incluso para el caso de un solo tipo celular perteneciente a una sola especie de organismo, la ingente cantidad de datos que nos inunda parece sobrepasarnos. El tipo de razonamiento informal que utilizan habitualmente los biólogos parece inadecuado para dar cuenta de esta enorme complejidad. De hecho, la dificultad no sólo radica en una sobrecarga de información. Por ejemplo, los sistemas biológicos están llenos de circuitos de retroalimentación y el comportamiento de incluso el más sencillo de estos circuitos es extraordinariamente complicado como para poderlo predecir con la intuición (**Figura 1-45**), ya que pequeños cambios en los parámetros pueden generar cambios radicales en los parámetros de respuesta. Para poder ir desde un diagrama de un circuito hasta una predicción del comporta-

Figura 1–45 Un circuito regulador de genes muy sencillo: un solo gen que regula su propia expresión por la unión de su producto proteico a su propio DNA regulador. A menudo se utilizan diagramas tan sencillos como éste para resumir lo que conocemos (como en la Figura 1-44), pero estos diagramas dejan todavía muchas preguntas sin resolver. ¿Cuándo la proteína se une, inhibe o estimula la transcripción? ¿De qué forma escalonada depende la velocidad de transcripción de la concentración de proteína? ¿Cuánto tiempo, por término medio, cada molécula de proteína permanece unida al DNA? ¿Cuánto tarda en sintetizarse cada molécula de mRNA o de proteína o cuánto tarda cada tipo de molécula en ser degradada? Los modelos matemáticos muestran que para poder predecir el comportamiento incluso de este sencillo sistema génico, necesitamos respuestas cuantitativas a todas estas preguntas y a otras. En función de los valores de los diferentes parámetros, el sistema puede alcanzar un solo estado estacionario; comportarse como un interruptor capaz de existir en una colección de estados alternativos diferentes; oscilar o mostrar grandes fluctuaciones al azar.



miento del sistema necesitamos información cuantitativa detallada, y para obtener deducciones de esta información necesitamos matemáticas y ordenadores.

Estas herramientas para los razonamientos cuantitativos son esenciales, pero no son suficientes. Uno puede pensar que conociendo de qué forma cada proteína influencia a cada una de las demás proteínas y de qué forma está regulada la expresión de cada gen por los productos de los demás genes, ha de ser posible calcular cómo se comportará la célula en su conjunto, de la misma forma que un astrónomo puede calcular las órbitas de los planetas o un ingeniero químico puede calcular los flujos a través de una planta química. Sin embargo, cualquier intento de desarrollar este objetivo para una célula viva rápidamente pone de manifiesto los límites de nuestro estado actual de conocimiento. La información de que disponemos, por muy completa que sea, está plagada de lagunas e incertidumbres. Además, es mucho más cualitativa que cuantitativa. Muy a menudo los biólogos celulares estudian los sistemas de control celulares abocando su conocimiento sobre simples diagramas esquemáticos –este libro está lleno de ellos– en lugar de hacerlo en números, gráficos y ecuaciones diferenciales. El progreso desde descripciones cualitativas y razonamientos intuitivos hasta descripciones cuantitativas y deducciones matemáticas constituye uno de los retos principales de la biología celular contemporánea. Por ahora, este reto únicamente se ha conseguido en fragmentos muy simples de maquinaria de las células vivas –subsistemas en los que participan algunas proteínas diferentes, o dos o tres genes regulados de forma cruzada, en los que la teoría y los experimentos pueden ir estrechamente de la mano. Más adelante describiremos algunos de estos ejemplos.



Figura 1–46 ***Arabidopsis thaliana*****, el vegetal escogido como primer modelo para el estudio de la genética molecular de plantas.** (Cortesía de Toni Hayden y de la John Innes Foundation.)

Arabidopsis ha sido escogida entre 300.000 especies candidatas como modelo vegetal

La gran cantidad de organismos pluricelulares que podemos ver a nuestro alrededor –las flores, los árboles y los animale – parecen fantásticamente variados, pero están más próximos unos de otros en su origen evolutivo y son más similares en su biología celular básica que la gran cantidad de organismos microscópicos unicelulares. Además, son más similares en su biología celular básica que el conjunto de organismos unicelulares microscópicos. Así, mientras que las bacterias y los eucariotas están separados por más de 3000 millones de años de evolución divergente, los vertebrados y los insectos están separados unos 700 millones de años, los peces y los mamíferos unos 450 millones de años y las diversas especies de vegetales con flor por unos 150 millones de años.

Debido a las relaciones evolutivas tan próximas entre todas las plantas con flor, podemos de nuevo obtener conocimientos de la biología celular y molecular de todas las clases de este tipo de organismo centrándonos solamente en el estudio detallado de una o de unas cuantas especies. De los cientos de miles de especies de vegetales con flor presentes en la actualidad en la Tierra, los biólogos moleculares han decidido concentrar sus esfuerzos en una pequeña planta, el nastuerzo o *Arabidopsis thaliana* (**Figura 1–46**), que puede crecer en grandes cantidades en el interior y que produce cientos de plántulas cada 8-10 semanas. *Arabidopsis* tiene un genoma de 140 millones de pares de nucleótidos, cerca de 11 veces mayor que el de la levadura, y del que conocemos su secuencia completa.

El mundo de las células animales tiene como modelo un gusano, una mosca, un ratón y un ser humano

La mayoría de las especies de organismos vivos conocidos son pluricelulares y son objeto de una gran parte del esfuerzo realizado en investigación biológica. Cuatro especies han emergido como modelos punteros para los estudios genéticos moleculares. En orden ascendente de tamaño, son el nematodo *Caenorhabditis elegans*, la mosca *Drosophila melanogaster*, el ratón *Mus musculus* y el ser humano, *Homo sapiens*. Se ha secuenciado el genoma de cada una de estas especies.

Caenorhabditis elegans (**Figura 1–47**) es un pequeño gusano en forma de anguila, relativamente inofensivo, que ataca los cultivos. Con un ciclo vital de escasos días tiene la habilidad de sobrevivir indefinidamente en un estado congelado de animación suspendida. Su cuerpo sencillo y plano y su ciclo celular muy poco habitual es muy apropiado para estudios genéticos (se describen en el Capítulo 23) y lo convierten en un organismo modelo ideal. *C. elegans* se desarrolla con la precisión de un reloj desde un óvulo fecundado hasta un

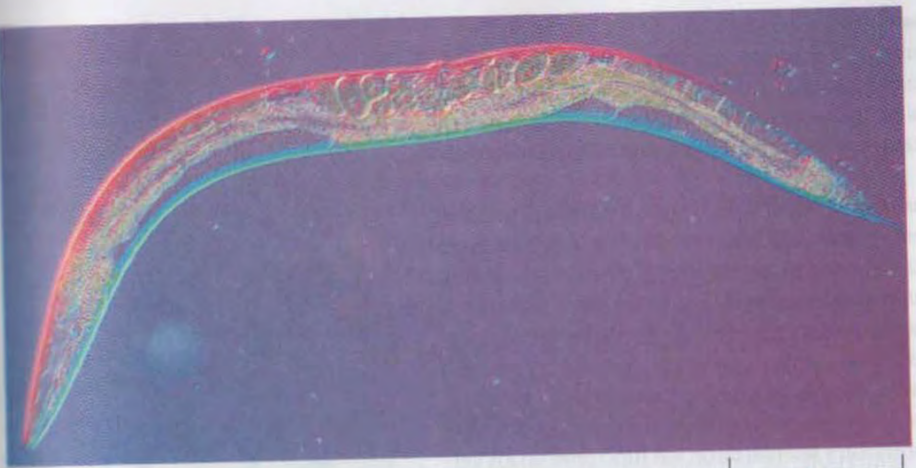


Figura 1–47 *Caenorhabditis elegans*, el primer organismo pluricelular cuyo genoma fue secuenciado por completo. Este pequeño nematodo, de 1 mm de longitud, vive en el suelo. Muchos de los individuos son hermafroditas y producen de forma simultánea tanto óvulos como espermatozoides. Aquí el animal se visualiza utilizando óptica de contraste interferencial, de forma que los límites de los tejidos se ven de colores brillantes. Cuando se observa con luz normal, el animal no se ve coloreado. (Cortesía de Ian Hope.)

gusano adulto formado por 959 células (más un número variable de huevos y espermatozoides), un grado de regularidad muy poco habitual para un animal. Actualmente disponemos de una detallada y minuciosa descripción temporal de la secuencia de acontecimientos por las que transcurre su desarrollo, cómo se dividen sus células, cómo se desplazan y cómo cambian sus características siguiendo un patrón de reglas estricto y predecible. Su genoma de 97 millones de pares de nucleótidos codifica 19.000 proteínas y además disponemos de una gran cantidad de mutantes y de otras herramientas para estudiar las funciones de sus genes. Aunque el gusano tiene un cuerpo plano muy diferente al nuestro, la conservación de los mecanismos biológicos ha sido suficiente para que el gusano constituya un modelo para muchos de los procesos de desarrollo y de biología celular que tienen lugar en el cuerpo humano. Por ejemplo, los estudios en el gusano ayudan a entender los programas de división celular y de muerte celular que determinan el número final de células de un organismo; un punto de vital importancia en la biología del desarrollo y de la investigación del cáncer.

Los estudios en *Drosophila* proporcionan una clave del desarrollo de los vertebrados

La mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* (**Figura 1–48**) es el organismo más utilizado como modelo genético; de hecho, las bases de la genética clásica se construyeron, en gran medida, gracias a estudios realizados en este insecto. Por ejemplo, hace 80 años nos proporcionó pruebas definitivas de que los genes –las unidades abstractas de información hereditaria– estaban contenidos en los cromosomas, objetos físicos concretos cuyo comportamiento había sido observado en la célula eucariota mediante microscopía óptica pero

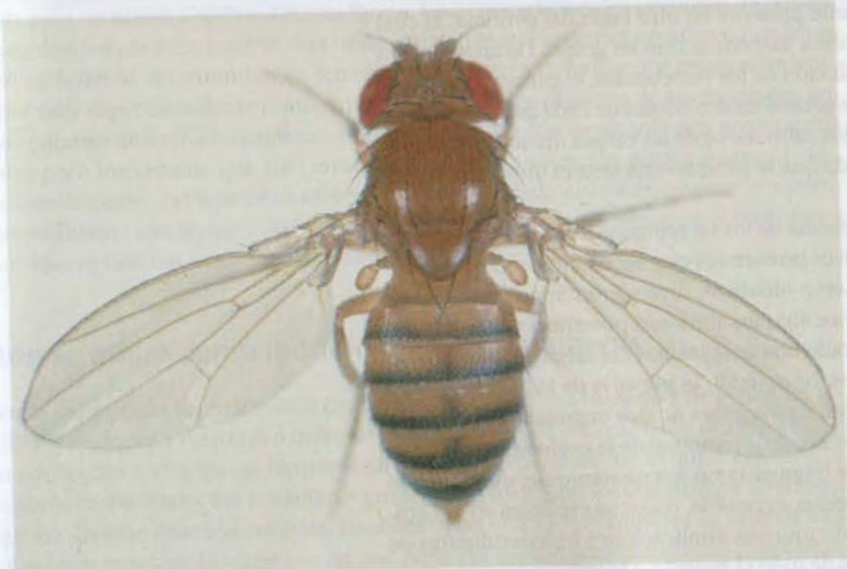


Figura 1–48 *Drosophila melanogaster*. Los estudios de genética molecular en esta mosca han proporcionado la clave para el conocimiento de cómo se desarrollan todos los animales a partir de un huevo hasta un adulto. (De E.B. Lewis, *Science*, 221, portada de la revista, 1983. Con la autorización de AAAS.)

cuya función era desconocida. La prueba se obtuvo a partir de una de las muchas características que hacen de *Drosophila* un organismo especialmente adecuado para los genetistas: tener en algunas de sus células unos cromosomas gigantes con bandas que son visibles (**Figura 1–49**). Algunos cambios específicos en la información hereditaria, manifestada en moscas mutantes, se correlacionaron exactamente con la pérdida o alteración de determinadas bandas de los cromosomas gigantes.

Más recientemente, *Drosophila*, más que ningún organismo, ha mostrado cómo trazar la cadena de acontecimientos causa-efecto desde las instrucciones genéticas codificadas en el DNA de los cromosomas hasta la estructura del cuerpo del organismo pluricelular adulto. Mutantes de *Drosophila* con partes de su cuerpo localizadas en zonas erróneas o alterados nos han proporcionado las claves para la identificación y caracterización de los genes necesarios para elaborar correctamente la estructura del cuerpo, con tracto digestivo, patas, ojos y todas las demás regiones del cuerpo situadas de forma correcta. Cuando estos genes de *Drosophila* se secuenciaron, los genomas de los vertebrados pudieron ser analizados para buscar homólogos. Estos homólogos se encontraron y se analizaron sus funciones en los vertebrados mediante el estudio de ratones en los que estos genes se habían mutado. Los resultados, como veremos más adelante en esta obra, revelan un sorprendente grado de similitud en los mecanismos moleculares del desarrollo de los insectos y de los vertebrados.

La mayoría de las especies conocidas de los organismos vivos son insectos. Incluso aunque *Drosophila* no tuviese nada en común con los vertebrados sino únicamente con los insectos, seguiría siendo un organismo modelo importante. Pero si el objetivo final es el conocimiento de la genética molecular de los vertebrados, ¿por qué se afronta el estudio de la genética molecular dando un rodeo y se analiza a *Drosophila* pudiendo abordar el problema directamente?

Drosophila sólo necesita 9 días para pasar de huevo fecundado hasta adulto. Es muchísimo más fácil y más barato de criar que cualquier vertebrado. Además su genoma es mucho más pequeño –cercano a 170 millones de pares de nucleótidos, respecto a los 3200 millones de los humanos. Este genoma codifica unas 14.000 proteínas y podemos obtener fácilmente mutantes de prácticamente cualquiera de estos genes. Pero existe una razón más poderosa por la que mecanismos genéticos difíciles de observar en vertebrados se descubren con más facilidad en la mosca. Como explicaremos ahora, está relacionada con la frecuencia de duplicación génica, que es considerablemente mayor en los genomas de los vertebrados que en el de la mosca y que posiblemente ha desempeñado un papel crucial en hacer que los vertebrados sean unas criaturas tan complicadas y misteriosas.



Figura 1–49 Los cromosomas gigantes de las glándulas salivares de *Drosophila*. Debido a que se han realizado un gran número de ciclos de duplicación del DNA sin división celular, cada uno de estos cromosomas contiene cerca de 1000 moléculas idénticas de DNA, todas ellas ordenadas. Esto hace muy fácil su observación al microscopio óptico donde se puede observar el patrón de bandas característico. Se pueden identificar bandas con genes concretos: una mosca mutante para un gen cualquiera presentará una alteración o pérdida de alguna banda en su cromosoma. Los genes que se transcriben activamente se localizan en las zonas "hinchadas" del cromosoma. Las bandas marcadas de oscuro en la fotografía son lugares en los que se han unido proteínas reguladoras al DNA. (Cortesía de B. Zink y R. Paro, de R. Paro, *Trends Genet.* 6:416-421, 1990. Con la autorización de Elsevier.)

El genoma de los vertebrados es el producto de duplicaciones repetidas

Casi todos los genes del genoma de los vertebrados son genes parálogos, esto es, otros genes que están en el mismo genoma, están relacionados entre sí y que deben haberse generado por duplicación génica. En muchos casos, un conjunto de genes está estrechamente relacionado con otro conjunto de genes semejante presente en otro lugar del genoma, lo cual sugiere que los genes no se duplicaron de forma individual sino en grupo. De acuerdo con una hipótesis, en un estadio inicial de la evolución de los vertebrados, el genoma completo sufrió dos duplicaciones consecutivas lo que generó cuatro copias de cada gen. En algunos grupos de vertebrados, como las familias de los salmones o de las carpas (incluido el pez cebra, un popular modelo animal) se ha sugerido que se produjo una tercera duplicación, que generó una multiplicidad génica de 8 veces.

El camino preciso de la evolución del genoma de los vertebrados todavía se desconoce debido a la gran cantidad de cambios evolutivos posteriores que sucedieron con posterioridad a estos procesos ancestrales. Genes que eran idénticos, divergieron; muchas copias de genes se perdieron por mutaciones disruptivas; algunos sufrieron posteriores ciclos de duplicación local. De esta forma el genoma, en cada una de las ramas del árbol de la vida de los vertebrados sufrió repetidas reorganizaciones, rompiendo la mayoría de las ordenaciones génicas originales. Una comparación del orden de los genes en dos organismos relacionados, como el hombre y el ratón, revela que –en la escala temporal de la evolución de los vertebrados– los cromosomas se fusionaron y se fragmentaron frecuentemente, desplazando grandes bloques de secuencias de DNA. De hecho, es posible, como se explicará en el Capítulo 7, que el estado actual sea el resultado de muchas duplicaciones independientes de fragmentos del genoma y no de duplicaciones de todo el genoma a la vez.



Figura 1–50 Dos especies del género *Xenopus*. *X. tropicalis* (arriba), presenta un genoma diploide; *X. laevis* (abajo) tiene el doble de DNA en cada célula. A partir tanto de los patrones de bandas de sus cromosomas y de la ordenación de los genes en ellos como de la comparación de las secuencias génicas, resulta evidente que este gran genoma de las especies ha evolucionado por duplicaciones de todo el genoma. Parece que estas duplicaciones ocurrieron como resultado del apareamiento entre ranas de especies ligeramente diferentes de *Xenopus*. (Cortesía de E. Amaya, M. Offield y R. Grainger, *Trends Genet.* 14:253-255, 1998. Con la autorización de Elsevier.)

Sin embargo, no existen dudas de que de vez en cuando durante la evolución se produjeron duplicaciones de todo el genoma, ya que podemos observar casos recientes en los que es fácilmente identificable una duplicación de grupos de cromosomas. Por ejemplo, el género de la rana *Xenopus* comprende un conjunto de especies similares relacionadas entre sí por duplicaciones o triplicaciones repetidas de todo el genoma. Entre estas ranas encontramos *X. tropicalis*, con un genoma diploide normal; las especies comunes de laboratorio *X. laevis* tienen un genoma duplicado y una cantidad doble de DNA por célula; por último, *X. ruwenzoriensis* tiene un genoma original pero duplicado 6 veces y 6 veces más DNA por célula (108 cromosomas, respecto a los 36 de *X. laevis*). Se estima que estas especies han divergido una de otra en los últimos 120 millones de años (**Figura 1–50**).

La redundancia genética constituye un problema para los genetistas, pero supone oportunidades para la evolución

Independientemente de los detalles de la historia de la evolución, es evidente que la mayoría de los genes del genoma de los vertebrados existen en varias versiones que alguna vez fueron idénticas. A menudo, estos genes relacionados son intercambiables funcionalmente para muchos objetivos. Este fenómeno se denomina **redundancia genética**. Para los científicos empeñados en descubrir todos los genes implicados en algún proceso particular, complica la tarea. Si un gen A es mutado y no se observa ningún efecto, no se puede concluir que el gen A es irrelevante desde un punto de vista funcional, ya que puede significar que este gen trabaja en paralelo con otros genes relacionados, que son suficientes para mantener casi con normalidad esta función incluso cuando falta el gen. En el genoma menos repetitivo de *Drosophila*, en el que la duplicación génica es menos habitual, el análisis es más directo: la función de los genes se determina directamente por las consecuencias que tienen las mutaciones en cada uno de ellos (la compañía que tiene un solo avión deja de volar cuando este aparato falla).

La duplicación del genoma ha permitido el desarrollo de formas más complejas de vida; proporciona al organismo un sinfín de copias de genes sobrantes que tienen la libertad de mutar y adquirir funciones variadas divergentes. Cuando una copia se optimiza para su utilización en el hígado, otra puede ser optimizada para su utilización en el cerebro o incluso adaptada para un nuevo objetivo. De esta forma, los genes adicionales permiten incrementar la complejidad y la sofisticación. En el momento en el que los genes adquieren funciones divergentes dejan de ser redundantes. Sin embargo, a menudo aunque los genes adquieran funciones muy especializadas continúan realizando algunos aspectos de sus funciones antiguas en paralelo de forma redundante. Entonces, la mutación de un solo gen provoca una alteración poco importante que sólo revela una parte de su función génica (**Figura 1–51**). Las familias de genes con funciones divergentes pero parcialmente sobrepuestas constituyen una profunda característica de la biología molecular de los vertebrados. Volveremos a tratar de ellas en muchas ocasiones en esta obra.

El ratón se utiliza como modelo para los mamíferos

Respecto a *Drosophila*, los mamíferos contienen 3 o 4 veces más cantidad de genes, un genoma 20 veces mayor, y millones o miles de millones de veces más cantidad de células en el cuerpo adulto. Sin embargo, en términos de tamaño del genoma, de biología celular y de mecanismos moleculares, los mamíferos constituyen un grupo de organismos altamente homogéneo. Incluso anatómicamente, las diferencias entre los mamíferos se limitan a tamaño y proporciones; es difícil pensar en una parte del cuerpo humano que no tenga su re-

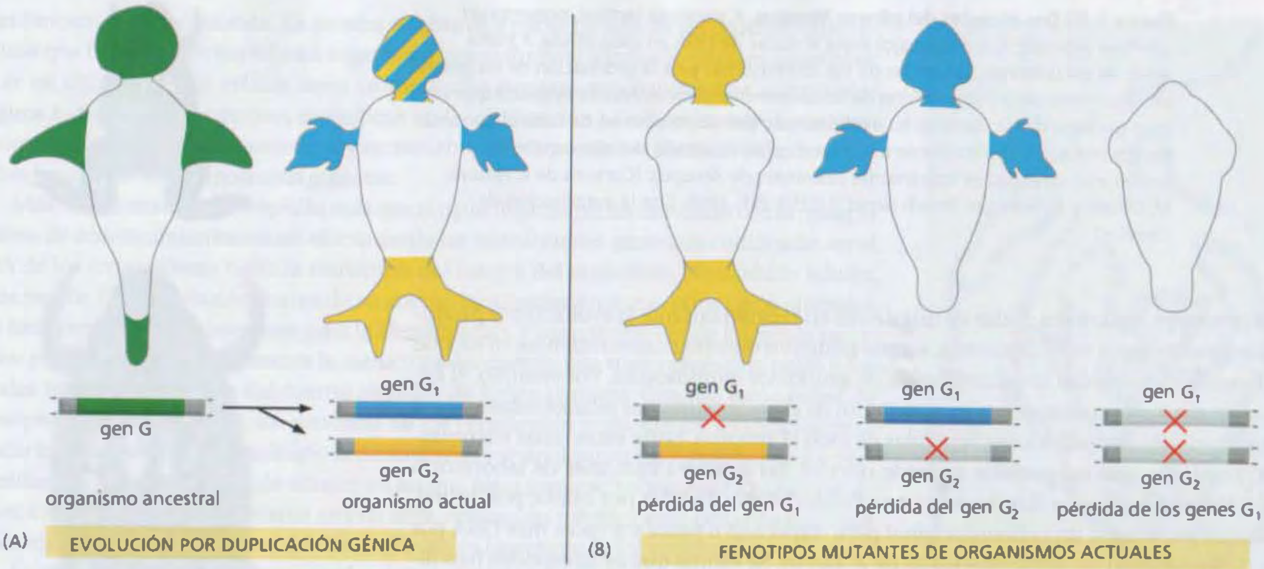


Figura 1-51 Consecuencias de la duplicación génica para el análisis mutacional de la función génica. En este ejemplo hipotético, un organismo ancestral pluricelular presenta un genoma que tiene una sola copia del gen G, que desempeña su función en diversas áreas del cuerpo (señaladas en *verde*). (A) A través de una duplicación génica, un descendiente del organismo ancestral tiene dos copias del gen G, denominadas G_1 y G_2. Estas copias han divergido de alguna forma en cuanto a sus patrones de expresión y a sus actividades en los lugares donde se expresan, pero todavía mantienen similitudes importantes. En algunos lugares, se expresan conjuntamente y cada uno de ellos realiza las mismas funciones que el gen ancestral G (*líneas* alternas *verdes y amarillas*); en otros lugares, se expresan solos y pueden desempeñar funciones nuevas. (B) Debido a que las funciones se solapan, la pérdida de uno de los dos genes por mutación (*aspa roja*) sólo indica una parte de su posible función; solamente la pérdida de ambos genes en el doble mutante indicará el espectro completo de procesos de los que son responsables estos genes. Principios análogos a éste se aplican a genes duplicados que se expresan en un mismo lugar (p. ej., en organismos unicelulares) pero que se activan juntos o individualmente en respuesta a varias circunstancias. Así, la duplicación génica complica el estudio genético de todos los organismos.

flejo en los elefantes o en el ratón, y viceversa. La evolución juega libremente con las características cuantitativas, pero no cambia la lógica de la estructura.

Para tener una medida más exacta de la similitud entre distintas especies de mamíferos desde un punto de vista genético, podemos comparar la secuencia de nucleótidos de los genes correspondientes (ortólogos) o la secuencia de aminoácidos de las proteínas que generan estos genes. El resultado para genes y proteínas individuales varía de forma notable. Si observamos la secuencia de aminoácidos de una proteína humana y la comparamos con una forma ortóloga de la misma, por ejemplo de un elefante, encontraremos que alrededor del 85% de ambas secuencias son idénticas. Una comparación similar entre el hombre y las aves muestra un parecido de alrededor de un 70%: el doble de diferencias, debido a que los linajes de las aves y de los mamíferos se separaron hace el doble de tiempo que los elefantes y el hombre (**Figura 1-52**).

El ratón, al ser pequeño, resistente y prolífico, se ha convertido en el organismo modelo más utilizado en estudios experimentales de genética molecular en vertebrados. Se conocen muchas mutaciones naturales que a menudo mimetizan los efectos de las mutaciones correspondientes en humanos (**Figura 1-53**). Además, se han desarrollado métodos para analizar la función de cualquier gen del ratón, o de cualquier porción no-codificante del genoma del ratón, generándoles mutaciones artificialmente, como explicaremos más adelante.

Un ratón mutado a la carta puede proporcionar una enorme cantidad de información a la biología celular. Revela los efectos de la mutación escogida en diferentes contextos y podemos estudiar la acción del gen de forma simultánea en los distintos tipos celulares del cuerpo que, en principio, estarán afectados.

Los seres humanos analizamos nuestras propias particularidades

Como seres humanos tenemos un especial interés en el genoma humano. Deseamos conocer todas las partes de las que estamos hechos y descubrir cómo funcionan. Pero, aunque fuéramos ratones preocupados por la biología molecular del ratón, los humanos resultarían un modelo genético muy atractivo debido a una propiedad especial: a través de exámenes clínicos y de nuestra propia exploración, hemos catalogado nuestras alteraciones genéticas. La población humana es enorme, en la actualidad formada por 6 mil millones de individuos, y esta capacidad de autoinformación significa que existe una enorme base de datos relativos a las mutaciones humanas. Se ha determinado la secuencia completa del genoma humano, de más de tres mil millones de pares de nucleótidos, haciendo aun más fácil si cabe la identificación a escala molecular de los genes responsables de cada mutación humana.

Observando conjuntamente los descubrimientos derivados del estudio del hombre, del ratón, de las moscas, de los gusanos, de las levaduras, de los vegetales y de las bacterias–utilizando similitudes de secuencias génicas para delimitar las correspondencias entre un modelo y otro– podemos enriquecer nuestro conocimiento de todos ellos.

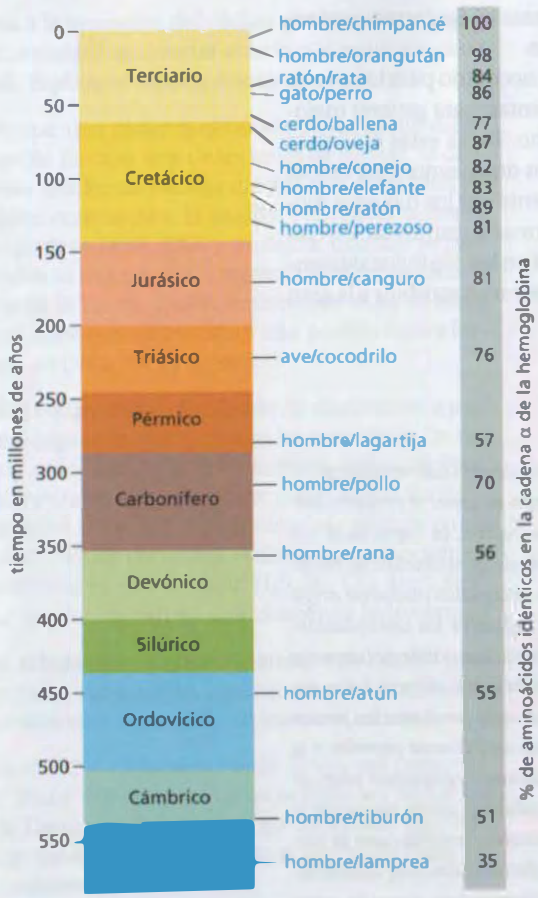


Figura 1–52 Momentos de divergencia de los diferentes vertebrados. La escala de la izquierda muestra el tiempo estimado y la era geológica del ancestro común de cada par de animales indicados. Cada estimación temporal se basa en las comparaciones de las secuencias de aminoácidos de proteínas ortólogas; cuanto menor es el porcentaje de aminoácidos que permanecen idénticos, más tiempo hace que los dos animales que se comparan evolucionan de forma independiente. Cada uno de los valores se ha obtenido a partir del estudio de varias proteínas y la escala temporal se ha calibrado para representar la evidencia fósil de la presencia de los ancestros de mamíferos y de aves que vivieron hace 310 millones de años. Los números de la derecha dan información sobre la divergencia de la secuencia de una proteína determinada (escogida al azar): la cadena alfa de la hemoglobina. Nótese que aunque existe una clara tendencia general a que la divergencia de esta proteína se incremente al aumentar el tiempo, también existen algunas irregularidades. Este dato refleja la aleatoriedad del proceso evolutivo y, posiblemente, el efecto de la selección natural dirigiendo cambios especialmente rápidos en la secuencia de la hemoglobina en algunos organismos que experimentaron demandas fisiológicas especiales. Por término medio, dentro de una linea evolutiva particular, las hemoglobinas acumulan cambios a una velocidad de 6 aminoácidos alterados de cada 100 aminoácidos cada 100 millones de años. Algunas proteínas, sujetas a estrictas restricciones funcionales, evolucionan mucho más lentamente que ésta y otras 5 veces más rápidamente. Todo ello genera incertidumbres en la estima de los tiempos de divergencia; algunos expertos creen que los principales grupos de mamíferos divergieron unos de otros como máximo 60 millones de años antes de lo que muestra esta figura. (Adaptado a partir de S. Kumar y S.B. Hedges, *Nature* 392:917-920, 1998. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

Todos tenemos detalles diferentes

¿A qué nos referimos exactamente cuando hablamos *del* genoma humano? ¿El genoma de quién? Por término medio, dos personas escogidas al azar solamente se diferencian en uno o dos pares de nucleótidos cada 1000 pares de nucleótidos de su secuencia de DNA. El proyecto del Genoma Humano ha seleccionado arbitrariamente DNA de un número reducido de individuos anónimos para secuenciarlo. El genoma humano –el genoma de la especie humana– es extraordinariamente complejo ya que abarca el conjunto completo de las variantes génicas que se encuentran en la población humana y además está cambiando de forma continua en el transcurso de la reproducción sexual. Al final, el proyecto espera documentar también estas modificaciones. El conocimiento del genoma puede ayudar a entender, por ejemplo, por qué algunas personas están predispuestas a una enfermedad y otras a otra enfermedad; por qué hay personas que responden favorablemente a fármacos y otras responden mal. También proporcionará nuevas claves de nuestra historia: los desplazamientos migratorios que efectuaron nuestros ancestros, las infecciones que sufrieron y las



Figura 1–53 Hombre y ratón: genes similares y desarrollo similar. El niño y el ratón muestran una mancha blanca en sus frentes porque ambos tienen mutado el mismo gen (*Kit*) requerido para el desarrollo y mantenimiento de las células pigmentarias. (Cortesia de R.A. Fleischman.)

dietas de las que se alimentaban. Todos estos datos han dejado trazas en las formas variantes de los genes que han sobrevivido en las comunidades humanas.

El conocimiento y la comprensión nos proporcionan el poder necesario para intervenir en los humanos, para eliminar o prevenir enfermedades; en las plantas, para generar mejores cosechas; en las bacterias, para utilizarlas en nuestro provecho. Todas estas empresas biológicas están relacionadas, ya que la información genética de los organismos está escrita en el mismo lenguaje. La nueva habilidad desarrollada recientemente por los biólogos moleculares para leer y descifrar este lenguaje, ha empezado a transformar nuestra relación con el mundo vivo. Esperamos que la biología celular que se presentará en los capítulos siguientes de este libro, sirva de preparación para entender y posiblemente para contribuir a la gran aventura científica del siglo XXI.

Resumen

Las células eucariotas, por definición, guardan su DNA en un compartimiento independiente envuelto por una membrana: el núcleo. Además tienen un citoesqueleto para su soporte y movimiento, complejos compartimientos intracelulares para la digestión y la secreción, la capacidad (en muchas especies) de engullir otras células y un metabolismo que depende de la oxidación de moléculas orgánicas por las mitocondrias. Estas propiedades sugieren que los eucariotas pudieron originarse como depredadores de otras células. Las mitocondrias –y en los vegetales los cloroplastos– contienen su propio material genético y resulta evidente que han evolucionado a partir de bacterias que fueron capturadas y confinadas en el citoplasma de la célula eucariota y que sobrevivieron como simbiontes. Típicamente las células eucariotas tienen entre 3 y 30 veces más genes que las procariotas y generalmente miles de veces más DNA no-codificante. El DNA no-codificante permite a la célula una compleja regulación de la expresión génica, necesaria para elaborar organismos pluricelulares complejos. Sin embargo, muchos organismos eucariotas son unicelulares, entre los cuales la levadura Saccharomyces cerevisiae, *que se utiliza como un organismo modelo sencillo para la biología celular eucariota, que revela las bases moleculares de procesos fundamentales muy conservados como el ciclo celular eucariota. Un pequeño número de otros organismos se han escogido como modelos primarios de plantas y animales pluricelulares y la secuenciación de sus genomas ha abierto la vía para el análisis sistemático y comprensivo de la función génica, de la regulación génica y la diversidad genética. Como resultado de la duplicación de genes durante la evolución de los vertebrados, los genomas de los vertebrados contienen una gran cantidad de genes homólogos de la mayoría de sus genes. Esta redundancia genética ha permitido la diversificación y la especialización de genes para nuevas tareas, pero ha hecho más difícil la tarea de descifrar sus funciones. Existe menos redundancia génica en el nematodo* Caenorhabditis elegans *y en la mosca* Drosophila melanogaster, *por lo cual estos organismos han desempeñado un papel clave en el descubrimiento de los mecanismos genéticos universales del desarrollo animal.*

PROBLEMAS

¿Qué afirmaciones son ciertas? Explicar por qué sí o por qué no

1–1 Los genes de la hemoglobina humana, que están organizados en dos grupos génicos localizados en dos cromosomas, constituyen un buen ejemplo de un conjunto de genes ortólogos.

1–2 La transferencia génica horizontal prevalece más en organismos unicelulares que en pluricelulares.

1–3 La mayoría de las secuencias de DNA del genoma bacteriano codifican proteínas al contrario que la mayoría de las secuencias del genoma humano.

Resolver los siguientes problemas

1–4 Desde que fue descifrado hace cuatro décadas, algunos investigadores aseguran que el código se originó por un accidente aislado mientras que otros argumentan que fue esculpido finamente durante mucho tiempo por la selección natural. Una sorprendente característica del código genético es su inherente resistencia a los efectos de la mutación. Por ejemplo, un cambio en la tercera posición de un codón a menudo codifica el mismo aminoácido o uno que tiene propiedades químicas similares. El código genético natural es más resistente a las mutaciones (menos susceptible a errores) que la mayoría de otras posibles versiones, como se ilustra en la **Figura P1-1**. Solamente uno de entre un millón de códigos generados al azar por ordenador es más resistente a sufrir errores que el código genético natural. ¿Esta extraor-

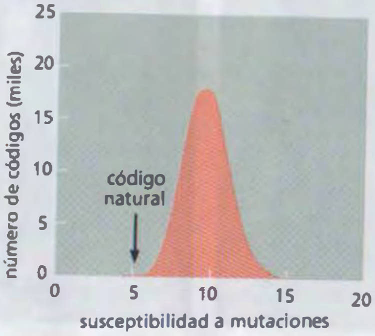


Figura P1–1 Susceptibilidad del código natural respecto a millones de códigos genéticos generados por ordenador (Problema 1-4). La susceptibilidad mide el promedio del número de aminoácidos de propiedades diferentes producido por mutaciones al azar. Un valor bajo indica que las mutaciones tienden a causar cambios pequeños. (Datos por cortesía de Steve Freeland.)

dinaria resistencia a la mutación del código genético es un argumento a favor de un origen accidental aislado o el resultado de la selección natural?. Explicar el razonamiento.

1-5 Al caracterizar una muestra obtenida de las profundidades de los océanos de Europa, una de las lunas de Júpiter, se descubre que contiene una forma extraña de vida que crece bien en un medio de cultivo enriquecido. El análisis preliminar muestra que es celular y contiene DNA, RNA y proteína. Cuando se presentan los resultados se sugiere que la muestra está contaminada por un organismo de la Tierra. ¿Qué aproximación se ha de realizar para distinguir entre contaminación y una posible nueva forma de vida basada en DNA, RNA y proteína?

1-6 No es difícil imaginarse el significado de alimentarse a partir de las moléculas orgánicas que producen los seres vivos. De hecho, y después de todo, esto es lo que hacemos nosotros. Pero, ¿qué significa "alimentarse" de la luz solar, como hacen los fototrofos? O, más extraño todavía, ¿"alimentarse" de piedras como hacen los litotrofos? ¿Dónde encuentra el alimento un litotrofo en la mezcla de elementos químicos como H_2S, H_2, CO, Mn^+, Fe^{2+}, Ni^{2+}, CH_4 y NH_4^+ que se liberan en una chimenea hidrotermal?

1-7 ¿Cuántos árboles genealógicos (patrones de ramas) pueden dibujarse para las eubacterias, las arqueas y los eucariotas, asumiendo que todos ellos derivan de un ancestro común?

1-8 Los genes del RNA ribosómico están altamente conservados (presentan pocos cambios en su secuencia) en todos los organismos de la Tierra, por lo tanto han evolucionado muy lentamente a lo largo del tiempo. ¿Es correcto deducir que estos genes "nacieron" perfectos?

1-9 Los genes que participan en procesos de información básica como la duplicación, la transcripción y la traducción se transmiten entre especies en menor grado que los genes involucrados en el metabolismo celular. Las razones de esta diferencia no están claras, pero una posible causa quizá se encuentre en la dificultad intrínseca que llevan asociados ambos tipos de procesos. Los procesos informativos se desarrollan con la participación de numerosos grupos de productos génicos. Por el contrario, las reacciones metabólicas están con frecuencia catalizadas por enzimas formadas por una sola proteína ¿De qué manera la complejidad del proceso subyacente –informacional o metabólico– puede afectar al grado de transferencia horizontal de genes?

1-10 El proceso de transferencia génica desde la mitocondria hasta el genoma nuclear puede analizarse en plantas. El gen respiratorio *Cox2*, que codifica la subunidad 2 de la citocromo oxidasa, se transfirió funcionalmente al núcleo durante la evolución de las plantas con flor. El análisis extenso de diversos géneros de vegetales ha determinado con exactitud el momento de la aparición de la forma nuclear del gen y diversas formas intermediarias del gen antes de su pérdida definitiva del genoma mitocondrial. En la **Figura P1-2** se muestra un resumen de la distribución del gen *Cox2* entre la mitocondria y el núcleo, al mismo tiempo que los datos de su transcripción dentro de un contexto filogenético.

A. Asumiendo que la transferencia del gen mitocondrial al núcleo ocurriese solamente una vez (una hipótesis apoyada por las estructuras de los genes nucleares), indicar el punto dentro del árbol filogenético donde pudo haber tenido lugar la transferencia.

B. ¿Existen ejemplos de géneros en los que el gen transferido y el gen mitocondrial son ambos funcionales? Indicar cuáles.

C. ¿Cuál es el mínimo número de veces que el gen mitocondrial ha sido inactivado o perdido? Situar estos eventos en el árbol filogenético.



	GEN mt	GEN núc	RNA mt	RNA núc
Pisum	+	–	+	–
Clitoria	+	–	+	–
Tephrosia	+	–	+	–
Galactia	+	–	+	–
Canavalia	+	–	+	–
Lespedeza	+	+	+	+
Eriosema	–	+	–	+
Atylosia	–	+	–	+
Erythrina	–	+	–	+
Ramirezella	–	+	–	+
Vigna	–	+	–	+
Phaseolus	–	+	–	+
Dumasia	+	+	+	+
Calopogonium	+	+	+	–
Pachyrhizus	+	+	+	–
Cologania	+	–	+	–
Pueraria	+	–	+	–
Pseudeminia	+	+	+	+
Pseudovigna	+	+	+	–
Ortholobium	–	+	–	+
Psoralea	–	+	–	+
Cullen	–	+	–	+
Glycine	+	+	–	+
Neonotonia	+	+	+	+
Teramnus	+	–	+	–
Amphicarpa	+	+	+	+

Figura P1-2 Resumen de la distribución del gen *Cox2* y de datos de transcripción en un contexto filogenético (Problema 1-10). La presencia del gen intacto o de un transcrito funcional se indica mediante (+); la ausencia del gen intacto o de un transcrito funcional se indica mediante (–). mt, mitocondria; núc, núcleo.

D. ¿Cuál es el mínimo número de veces que el gen nuclear ha sido inactivado o perdido? Situar estos eventos en el árbol filogenético.

E. A partir de esta información, proponer un esquema para la transferencia de genes mitocondriales al genoma nuclear.

1-11 Cuando se descubrieron las hemoglobinas de las legumbres resultó tan sorprendente encontrar un gen típico de la sangre de los animales, que se formuló la hipótesis de que el gen vegetal



Figura P1-3 Árbol filogenético de los genes de la hemoglobina de varias especies (Problema 1-11). Las legumbres están destacadas en rojo.

apareció por transferencia horizontal a partir de un animal. Se han secuenciado muchos más genes de hemoglobina y, gracias a sus secuencias, se ha podido elaborar el árbol filogenético de la **Figura P1-3.**

A. ¿Este árbol apoya o rebate la hipótesis de que las hemoglobinas de los vegetales aparecieron por transferencia génica horizontal?

B. Suponiendo que los genes de las hemoglobinas de vegetales se originaron inicialmente en un nematodo parásito, por ejemplo, ¿cómo se modificaría este árbol filogenético?

1-12 Parece que la velocidad evolutiva es variable entre diversos linajes. Por ejemplo, la velocidad de evolución en el linaje de la rata es significativamente mayor que en el linaje humano. Estas diferencias de velocidad se ponen de manifiesto si se analizan los cambios de las secuencias de las proteínas que están sujetas a presión selectiva o al estudiar los cambios en las secuencias de nucleótidos no-codificantes que no se encuentran ante una presión tan acuciante. ¿Es posible ofrecer una explicación razonada que explique por qué la velocidad evolutiva del linaje del hombre es más lenta que la del linaje de la rata?

BIBLIOGRAFÍA

General

Alberts B, Bray D, Hopkin K et al (2004) Essential Cell Biology, 2.ª ed. New York: Garland Science.

Barton NH, Briggs DEG, Eisen JA et al (2007) Evolution. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Darwin C (1859) On the Origin of Species. London: Murray.

Graur D & Li W-H (1999) Fundamentals of Molecular Evolution, 2.ª ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Madigan MT & Martinko JM (2005) Brock's Biology of Microorganisms, 11.ª ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.

Margulis L & Schwartz KV (1998) Five Kingdoms: An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth, 3.ª ed. New York: Freeman.

Watson JD, Baker TA, Bell SP et al (2007) Molecular Biology of the Gene, 6.ª ed. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings.

Las características universales de las células en la Tierra

Andersson SGE (2006) The bacterial world gets smaller. *Science* 314:259–260.

Brenner S, Jacob F & Meselson M (1961) An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190:576–581.

Fraser CM, Gocayne JD, White O et al (1995) The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270:397–403.

Harris JK, Kelley ST, Spiegelman et al (2003) The genetic core of the universal ancestor. *Genome Res* 13:407–413.

Koonin EV (2005) Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annu Rev Genet* 39:309–338.

Watson JD & Crick FHC (1953) Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737–738.

Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom A et al (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 292:883–896.

La diversidad del genoma y el árbol de la vida

Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA et al (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453–1474.

Boucher Y, Douady CJ, Papke RT et al (2003) Lateral gene transfer and the origins of prokaryotic groups. *Annu Rev Genet* 37:283–328.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J et al (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393:537–544.

Dixon B (1994) Power Unseen: How Microbes Rule the World. Oxford: Freeman.

Kerr RA (1997) Life goes to extremes in the deep earth—and elsewhere? *Science* 276:703–704.

Lee TI, Rinaldi NJ, Robert F et al (2002) Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 298:799–804.

Olsen GJ & Woese CR (1997) Archaeal genomics: an overview. *Cell* 89:991–994.

Pace NR (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276:734–740.

Woese C (1998) The universal ancestor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6854–6859.

La información genética en eucariotas

Adams MD, Celniker SE, Holt RA et al (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185–2195.

Andersson SG, Zomorodipour A, Andersson JO et al (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396:133–140.

The *Arabidopsis* Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796–815.

Carroll SB, Grenier JK & Weatherbee SD (2005) From DNA to Diversity: Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design, 2.ª ed. Maldon, MA: Blackwell Science.

de Duve C (2007) The origin of eukaryotes: a reappraisal. *Nature Rev Genet* 8:395–403.

Delsuc F, Brinkmann H & Philippe H (2005) Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nature Rev Genet* 6:361–375.

DeRisi JL, Iyer VR & Brown PO (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278:680–686.

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H et al (2002) The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296:2225–2229.

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H et al (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274:546–567.

International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860–921.

Kellis M, Birren BW & Lander ES (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 428:617–624.

Lynch M & Conery JS (2000) The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290:1151–1155.

Mulley J & Holland P (2004) Comparative genomics: Small genome, big insights. *Nature* 431:916–917.

National Center for Biotechnology Information. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Owens K & King MC (1999) Genomic views of human history. *Science* 286:451–453.

Palmer JD & Delwiche CF (1996) Second-hand chloroplasts and the case of the disappearing nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7432–7435.

Pennisi E (2004) The birth of the nucleus. *Science* 305:766–768.

Plasterk RH (1999) The year of the worm. *BioEssays* 21:105–109.

Reed FA & Tishkoff SA (2006) African human diversity, origins and migrations. *Curr Opin Genet Dev* 16:597–605.

Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR et al (2000) Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287:2204–2215.

Stillman B & Stewart D (2003) The genome of *Homo sapiens*. (Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. LXVIII). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282:2012–2018.

Tinsley RC & Kobel HR (eds) (1996) The Biology of *Xenopus*. Oxford: Clarendon Press.

Tyson JJ, Chen KC & Novak B (2003) Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Curr Opin Cell Biol* 15:221–231.

Venter JC, Adams MD, Myers EW et al (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304–1351.

Química celular y biosíntesis

2

En principio es difícil aceptar la idea de que los seres vivos descritos en el Capítulo 1 sean meros sistemas químicos. La increíble diversidad de formas vivas, su comportamiento aparentemente determinado y su habilidad para crecer y reproducirse parecen diferenciarlos del mundo de los sólidos, líquidos y gases que normalmente describe la química. De hecho, hasta el siglo diecinueve se creía que los animales contenían una fuerza vital –una "animus"– que era la responsable de sus propiedades características.

Actualmente sabemos que no existe nada en los seres vivos que vaya en contra de las leyes de la química y de la física. Sin embargo la química de la vida es especial. Primero: se basa casi completamente en compuestos de carbono, por lo que su estudio se conoce como *química orgánica*. Segundo: las células contienen un 70% de agua y la vida depende principalmente de reacciones químicas que tienen lugar en solución acuosa. Tercero, y más importante, la química celular es enormemente compleja: incluso la célula más sencilla tiene una química mucho más compleja que cualquier otro sistema químico conocido. Aunque las células presentan una cierta variedad de pequeñas moléculas que contienen carbono, la mayoría de átomos de carbono se encuentran formando parte de enormes ***moléculas poliméricas*** –cadenas de subunidades químicas unidas por sus extremos. Son las propiedades únicas de estas macromoléculas las que permiten a células y organismos crecer, reproducirse y realizar todas aquellas otras funciones que son características de la vida.

En este capítulo

LOS COMPONENTES QUÍMICOS DE LAS CÉLULAS 45

CATÁLISIS Y UTILIZACIÓN DE ENERGÍA POR LAS CÉLULAS 65

CÓMO LAS CÉLULAS OBTIENEN ENERGÍA DE LOS ALIMENTOS 88

LOS COMPONENTES QUÍMICOS DE LA CÉLULA

La materia está compuesta por combinaciones de *elementos*, es decir, sustancias como el hidrógeno o el carbono que no pueden romperse o transformarse por medios químicos en otras sustancias. La partícula más pequeña de un elemento que conserva sus propiedades químicas características es un *átomo* (**Figura 2–1**). Sin embargo las características de las sustancias que no son elementos puros –incluyendo los materiales de los que están compuestas las células– dependen de cómo estén agrupados sus átomos entre sí formando *moléculas*. Así pues, para entender cómo están construidos los organismos a partir de materia inanimada, es crucial conocer de qué manera se forman todas las uniones químicas que mantienen a los átomos unidos formando las moléculas.

Las células están formadas a partir de un número relativamente pequeño de tipos de átomos

El **peso atómico** de un átomo, o el **peso molecular** de una molécula, es la masa relativa del átomo o de la molécula respecto a la del átomo de hidrógeno. Son esencialmente iguales al número de protones más el número de neutrones que tiene el átomo o la molécula, ya que los electrones son mucho más ligeros y contribuyen de manera ínfima a la masa total. Así, el isótopo mayoritario del carbono tiene un peso atómico de 12 y se simboliza como ^{12}C, mientras que un isótopo inestable del carbono tiene un peso atómico de 14 y se simboliza como ^{14}C. Por lo general la masa de un átomo o de una molécula se da en *daltons*, que es la unidad de masa atómica, aproximadamente igual a la masa de un átomo de hidrógeno.

Los átomos son tan pequeños que es difícil imaginar su tamaño. Un átomo de carbono tiene unos 0,2 nm de diámetro, de manera que son necesarios unos 5 millones de átomos, uno detrás del otro en línea recta, para abarcar 1 milímetro. Un protón o un neutrón pesan

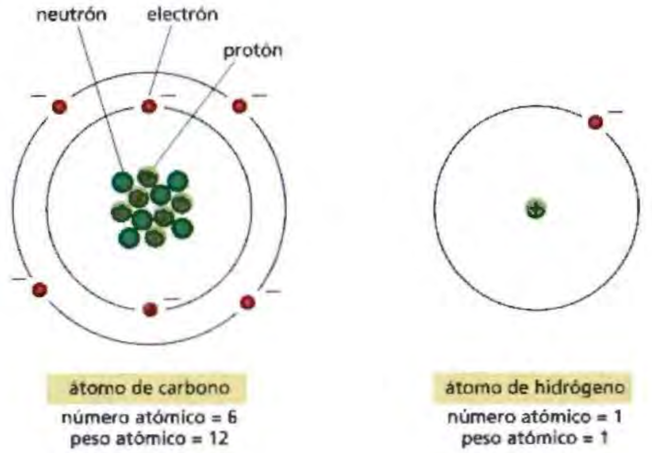


Figura 2–1 Representación esquemática de un átomo de carbono y de un átomo de hidrógeno. El *núcleo* de cada átomo, excepto el del hidrógeno, consta de *protones* –cargados positivamente– y de *neutrones* –eléctricamente neutros. En un átomo, el número de electrones es igual al número de protones (el *número atómico*), de forma que el átomo no tiene carga neta. Debido al hecho de que los electrones determinan el comportamiento químico de un átomo, todos los átomos de un elemento dado tienen el mismo número atómico.

Los neutrones son partículas subatómicas invariables de esencialmente la misma masa que los protones. Contribuyen a la estabilidad estructural del núcleo –si hay demasiados o demasiado pocos el núcleo puede desintegrarse por decaimiento radiactivo– pero no alteran las propiedades químicas del átomo. Debido al número de neutrones, un elemento puede existir en diferentes formas físicamente diferenciables pero químicamente idénticas, llamadas *isótopos*, cada uno de los cuales tiene el mismo número de protones pero diferente número de neutrones. Casi todos los elementos presentan isótopos de forma natural, incluyendo algunos inestables. Por ejemplo, mientras que la mayor parte del carbono de la Tierra existe en su isótopo estable 12, con seis protones y seis neutrones, también existen pequeñas cantidades de un isótopo inestable, el carbono 14 radiactivo, cuyos átomos tienen seis protones y ocho neutrones. El carbono 14 se desintegra radiactivamente a una velocidad lenta pero mantenida. Este hecho constituye la base de una técnica conocida como datación por carbono 14 que se utiliza en arqueología para determinar el tiempo que hace que se originó un material orgánico.

En la ilustración, se ha aumentado de forma notable el tamaño de los neutrones, protones y electrones, que en realidad son diminutos en relación con el tamaño total del átomo. Además, el diámetro del núcleo es 10^{-4} veces menor que la nube de electrones. Finalmente, a pesar de que se representan los electrones como partículas individuales, en realidad su comportamiento está gobernado por las leyes de la mecánica cuántica y no hay manera de predecir dónde se va a encontrar un electrón en un momento dado.

aproximadamente $1/(6 \times 10^{23})$ gramos, de modo que un gramo de hidrógeno tiene 6×10^{23} átomos. Este número tan enorme (6×10^{23}, llamado **número de Avogadro**) es el factor proporcional clave que describe la relación entre cantidades cotidianas y cantidades que se miden en términos de número de átomos o de moléculas. Si una sustancia tiene un peso molecular de X, 6×10^{23} moléculas de dicha sustancia tendrán una masa de X gramos. A esta cantidad se la denomina un **mol** de dicha sustancia (**Figura 2–2**).

Existen 89 elementos naturales, cada uno de los cuales se diferencia de los demás en el número de protones y de electrones de sus átomos. Sin embargo, los seres vivos están compuestos por una pequeña selección de estos elementos, cuatro de los cuales –carbono (C), hidrógeno (H), nitrógeno (N) y oxígeno (O)– constituyen el 96,5% del peso de los organismos. Esta composición se diferencia marcadamente de la del entorno inorgánico inanimado (**Figura 2–3**) y es la evidencia de que la materia orgánica tiene un tipo de química diferente.

Los electrones más externos determinan la manera en que interactúan los átomos

Para entender como se unen entre sí los átomos formando las moléculas de los seres vivos, hemos de tener en cuenta sus electrones. Los protones y los neutrones están enlazados firmemente los unos a los otros en el núcleo y sólo se separan en condiciones extremas; por ejemplo, durante la desintegración radiactiva, o en el interior del sol o de un reactor nuclear. En los tejidos vivos, sólo sufren reordenamientos los electrones de los átomos. Forman el exterior de los átomos y determinan las leyes de la química por la que los átomos se combinan entre sí formando las moléculas.

Los electrones están en continuo movimiento alrededor del núcleo del átomo, pero en esta escala submicroscópica los movimientos obedecen a unas leyes muy diferentes a las que nos son familiares en la vida cotidiana. Estas leyes determinan que los electrones de un átomo sólo pueden existir en unos estados determinados y restringidos, llamados orbitales, y que existe un límite estricto del número de electrones que pueden ocupar cada tipo de orbital, los llamados *orbitales electrónicos*. Los electrones en promedio más cercanos al núcleo positivo son atraídos con más fuerza hacia él y ocupan el orbital más interno y más fuertemente unido. Este orbital puede estar ocupado por un máximo de dos electrones. El segundo orbital está más alejado del núcleo y sus electrones están menos fuertemente unidos a él. Este segundo orbital puede acoger hasta ocho electrones. El tercer orbital contiene electrones que están aún menos unidos al núcleo; también puede tener hasta ocho electrones. El cuarto y quinto orbitales pueden estar ocupados por 18 electrones cada uno. Los átomos con más de cuatro orbitales son muy raros en las moléculas biológicas.

La disposición de los electrones de un átomo es estable cuando todos los electrones se encuentran en las posiciones permitidas que les mantienen más fuertemente unidos al núcleo, es decir, ocupando los orbitales más internos. Por este motivo, con ciertas excepciones en los átomos más grandes, los electrones de cada átomo llenan los orbitales por orden, esto es, el primero antes que el segundo, el segundo antes que el tercero, etc. Un átomo cuyo orbital más externo esté completamente lleno de electrones, es especialmente estable y, por lo tanto, químicamente poco reactivo. Como ejemplos tenemos el helio con 2 electrones, el neón con 2 + 8 y al argón con 2 + 8 + 8; todos ellos son gases inertes. El hidrógeno, por el con-

trario, con un solo electrón y con un orbital a medio llenar, es altamente reactivo. De la misma manera, los demás átomos que se encuentran en los tejidos vivos tienen incompletos sus orbitales electrónicos externos, por lo que pueden ceder, aceptar o compartir electrones con otros átomos formando tanto moléculas como iones (**Figura 2–4**).

Debido a que un orbital electrónico incompleto es menos estable que un orbital completo, los átomos cuyos orbitales externos están incompletos tienden a reaccionar con otros átomos de forma que pueden perder o ganar el número adecuado de electrones para que su orbital más externo esté completo. Este intercambio de electrones se lleva a cabo transfiriendo electrones de un átomo a otro o compartiendo los electrones entre dos átomos. Estas dos estrategias dan lugar a dos tipos de **enlaces químicos** entre los átomos: un *enlace iónico* se forma cuando un átomo cede electrones a otro átomo, mientras que un *enlace covalente* se origina cuando dos átomos comparten un par de electrones (**Figura 2–5**). A menudo, el par de electrones se comparte de manera desigual, con una transferencia parcial entre dos átomos que tiene una capacidad diferente de atraer los electrones –uno es más *electronegativo* que el otro; esta estrategia intermedia da lugar a un *enlace covalente polar*, como describiremos más adelante.

Un átomo de H, que sólo necesita un electrón para completar su orbital externo, generalmente adquiere este electrón compartiéndolo –formando un enlace covalente– con otro átomo; a menudo este enlace es polar, lo que significa que los electrones se comparten de forma desigual. Los restantes elementos comunes de las células vivas –C, N y O, que tienen el segundo orbital incompleto, y P y S, que tienen el tercer orbital incompleto (véase Figura 2–4)– generalmente comparten electrones y completan su orbital externo con ocho electrones, formando varios enlaces covalentes. El número de electrones que un átomo debe ganar o perder (compartiéndolos o transfiriéndolos) para completar el orbital externo se conoce como su *valencia*.

El orbital electrónico más externo desempeña un papel crucial en la determinación de las propiedades químicas de los elementos, por lo que cuando los elementos se ordenan en función de su número atómico existe una recurrencia periódica de elementos con propiedades similares: un elemento que, por ejemplo, tenga su segundo orbital incompleto, sólo

Un mol es X gramos de una sustancia y X es su masa molecular relativa (peso molecular). Contiene 6×10^{23} moléculas de la sustancia.

1 mol de carbono pesa 12 g
1 mol de glucosa pesa 180 g
1 mol de cloruro de sodio pesa 58 g

Las soluciones molares tienen una concentración de 1 mol de sustancia en 1 litro de solución. Por ejemplo, una solución molar representada como (1 M) de glucosa, tiene 180 g/L, mientras que una solución milimolar (1 mM) tiene 180 mg/L.

La abreviatura convencional para gramo es g; la abreviación para litro es L.

Figura 2–2 Moles y soluciones molares.

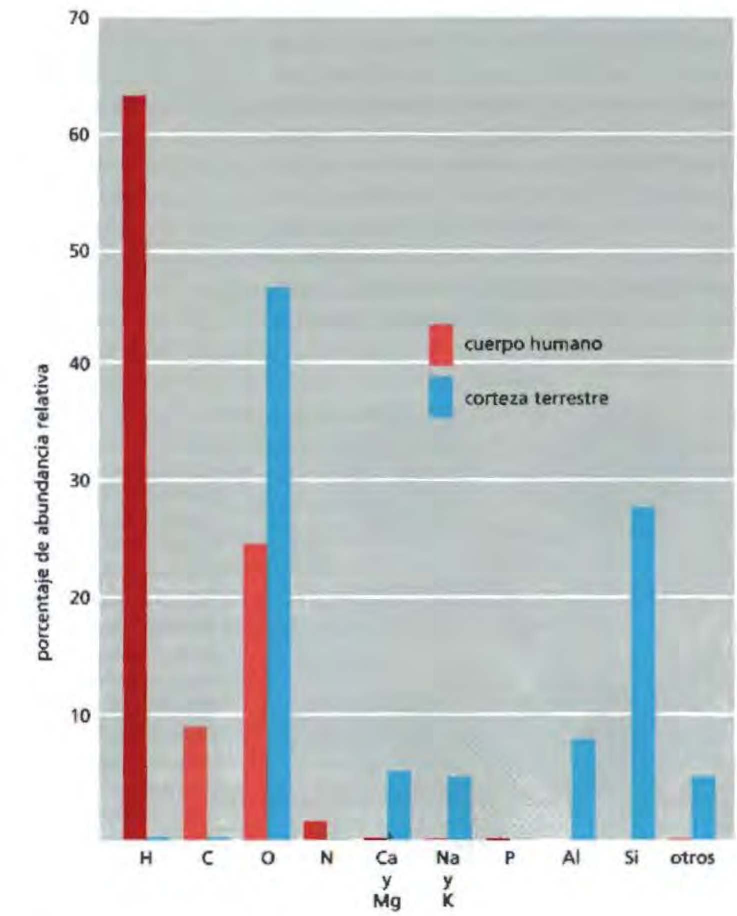


Figura 2–3 Abundancia de algunos de los elementos químicos del mundo inanimado (la corteza terrestre) comparada con su abundancia en los tejidos animales. La abundancia de cada elemento se expresa como porcentaje del número total de átomos presentes incluida el agua. Así, debido a la abundancia del agua, más del 60% de los átomos de un ser vivo son átomos de hidrógeno. La abundancia relativa de los elementos es similar en todos los seres vivos.

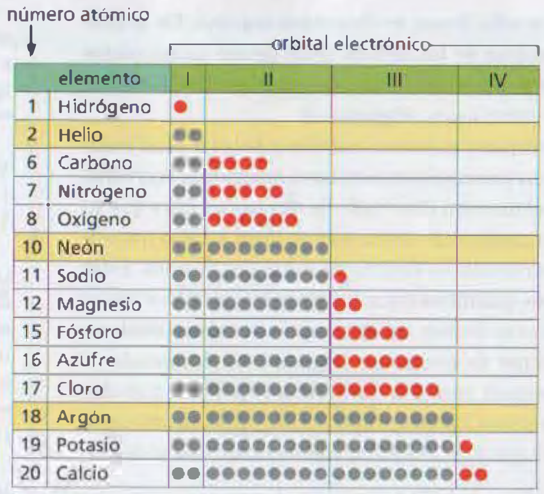


Figura 2–4 Orbitales electrónicos completos e incompletos, en algunos elementos comunes. Todos los elementos que se encuentran habitualmente en los seres vivos tienen orbitales electrónicos externos incompletos (en *rojo*), por lo que pueden participar en reacciones químicas con otros átomos. A manera de comparación se muestran algunos elementos que sólo presentan orbitales completos (en *amarillo*); estos elementos no reaccionan químicamente.

ocupado por un electrón, se comportará de manera muy similar a la de un elemento que tenga completo su segundo orbital, pero el tercero incompleto, sólo ocupado por un electrón. Los metales, por ejemplo, tienen orbitales externos incompletos ocupados por uno o unos cuantos electrones, mientras que, como acabamos de ver, los gases inertes tienen sus orbitales externos completos. Este patrón da lugar a la famosa tabla periódica de los elementos, que presentamos en la **Figura 2–6**, en la que se destacan los elementos que se encuentran en los organismos vivos.

Los enlaces covalentes se forman al compartir electrones

Todas las características esenciales de una célula dependen de las moléculas que contiene. Una **molécula** se define como un grupo de átomos unidos entre sí por **enlaces covalentes**; en este caso los átomos comparten electrones completando sus orbitales externos, no transfiriéndolos. En la molécula más sencilla posible –una molécula de hidrógeno (H_2)– dos átomos de H, cada uno de los cuales tiene un solo electrón, comparten ambos electrones, el número necesario para completar el primer orbital de cada átomo. Los electrones compartidos forman una nube de carga negativa más densa entre los dos núcleos cargados positivamente. Esta nube ayuda a mantener los átomos unidos entre sí, oponiéndose a la repulsión mutua que se genera entre cargas iguales y que, de no ser así, forzaría a los átomos a separarse uno del otro. Las fuerzas de atracción y de repulsión están equilibradas cuando los núcleos están situados a una cierta distancia característica uno de otro, denominada *distancia de enlace*.

Otra propiedad de cualquier enlace -covalente o no covalente– es su *fuerza de enlace*, que se mide por la cantidad de energía que se tiene que proporcionar para romperlo. Habitualmente se expresa en unidades de kilocalorías por mol (kcal/mol). Una kilocaloría es la

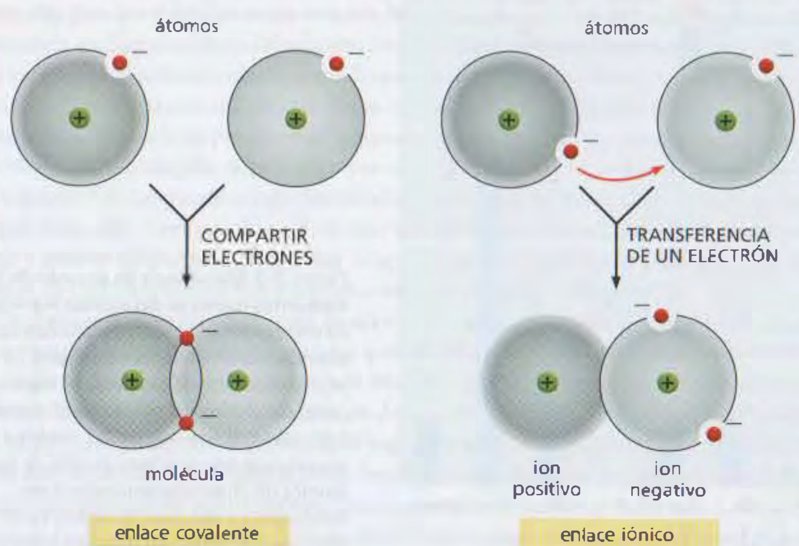


Figura 2–5 Comparación entre enlaces covalentes y enlaces iónicos. Los átomos pueden, interactuando unos con otros, alcanzar un estado de organización más estable de los electrones de sus orbitales más externos. Un enlace iónico se forma cuando los electrones son transferidos de un átomo a otro. Un enlace covalente se forma cuando los electrones son compartidos entre los átomos. Los dos casos que se presentan en la figura representan situaciones extremas; a menudo los enlaces covalentes se forman con una transferencia parcial (los electrones se comparten de manera desigual), lo que da lugar a un enlace covalente polar (véase la Figura 2-43).

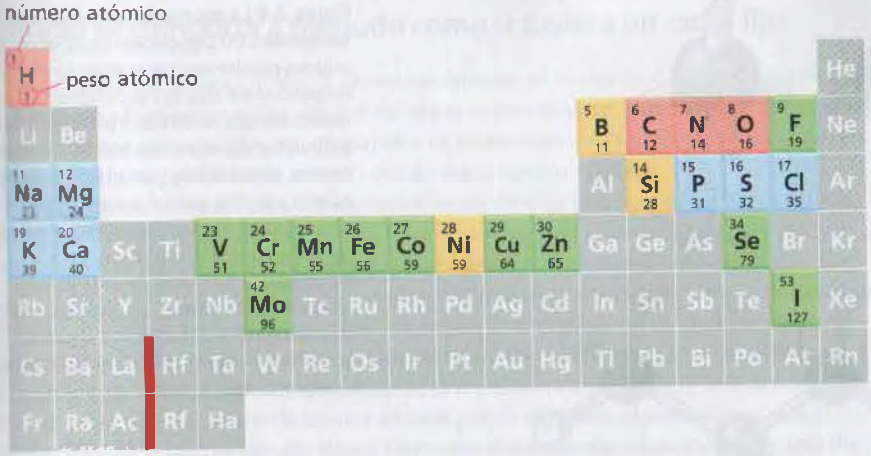


Figura 2–6 Los elementos ordenados por su número atómico forman la tabla periódica. Los elementos pueden clasificarse en grupos en función de sus propiedades similares, las cuales dependen del número de electrones que cada elemento presenta en su orbital externo. Por ejemplo, el Mg y el Ca tienden a eliminar los dos electrones que presentan en sus orbitales externos; el C, el N y el O tienden a completar sus orbitales externos compartiendo electrones. Los cuatro elementos sombreados en *rojo* constituyen el 99% del número total de átomos presentes en el cuerpo humano. Siete elementos más, sombreados en *azul*, representan en conjunto alrededor del 0,9% del total. Otros elementos destacados en *verde* son necesarios en cantidades traza para los humanos. No queda claro si los elementos sombreados en *amarillo* son o no esenciales. Por tanto, parece que para los procesos químicos de la vida son fundamentales elementos poco pesados.

Los pesos atómicos, dados por la suma del número de protones y de neutrones del núcleo atómico, variarán en cada isótopo de cada elemento. Los pesos atómicos mostrados son los de los isótopos más comunes de cada elemento.

cantidad de energía necesaria para elevar la temperatura de un litro de agua, un grado Celsius (centígrado). Así, si para romper 6×10^{23} enlaces de un determinado tipo se tiene que invertir una kilocaloría (es decir, un mol de estos enlaces), la fuerza de este enlace es de 1 kcal/mol. Como equivalente a estas unidades, está ampliamente extendida la utilización del kilojoule, que equivale a 0,239 kilocalorías.

Para entender lo que significa la fuerza de unión de un enlace, resulta útil compararla con la energía media de los impactos que dichas moléculas sufren al colisionar con otras moléculas de su entorno (su energía térmica o energía calorífica), y también con otras fuentes de energía biológica como la luz y la oxidación de la glucosa (**Figura 2–7**). Los enlaces covalentes típicos son 100 veces más fuertes que estas energías térmicas, de modo que los enlaces resisten el empuje de los movimientos térmicos que tienden a separar los átomos que une el enlace y normalmente sólo se rompen durante reacciones químicas específicas con otros átomos y moléculas. La formación y la rotura de los enlaces covalentes son sucesos violentos; en las células están controlados por catalizadores altamente específicos llamados *enzimas*. Los enlaces no-covalentes, por lo general, son mucho más débiles que los covalentes; más adelante veremos que son importantes en la célula en muchas situaciones en las que las moléculas tienen que formarse y disociarse con rapidez para llevar a cabo sus funciones.

Mientras que un átomo de H sólo puede formar un enlace covalente, los otros átomos que forman enlaces covalentes en las células –O, N, S y P, así como el imprescindible átomo de C– pueden formar más de uno. El orbital más externo de estos átomos, como hemos visto, puede tener hasta ocho electrones, de manera que estos átomos forman tantos enlaces covalentes como sea necesario para poder completar este número de electrones. El oxígeno, con seis electrones en su orbital más externo, es completamente estable cuando adquiere dos electrones extra al compartirlos con otros átomos, formando así dos enlaces covalentes. El nitrógeno, con cinco electrones externos, forma un máximo de tres enlaces covalentes, mientras que el carbono con cuatro electrones externos, forma hasta cuatro enlaces covalentes –compartiendo así cuatro pares de electrones (véase Figura 2–4).

Cuando un átomo forma varios enlaces covalentes con otros átomos, estos enlaces se distribuyen en el espacio de una manera definida, unos respecto a otros, reflejando la orientación de las órbitas de los electrones compartidos. Por lo tanto, los enlaces covalentes de un átomo se caracterizan, además de por las longitudes y las energías de cada uno de los enlaces, por tener ángulos de enlace específicos (**Figura 2–8**). Por ejemplo, los cuatro enlaces covalentes que se pueden formar alrededor de un átomo de carbono se ordenan como apuntando a los cuatro ángulos de un tetraedro regular. La orientación precisa de los enlaces covalentes es la base de la geometría tridimensional de las moléculas orgánicas.

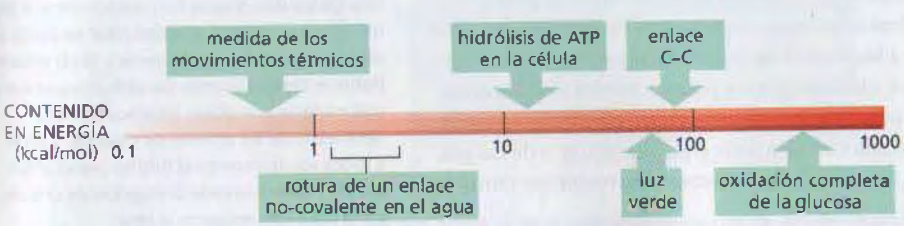


Figura 2–7 Algunas energías importantes para las células. Estas energías se comparan en una escala logarítmica.

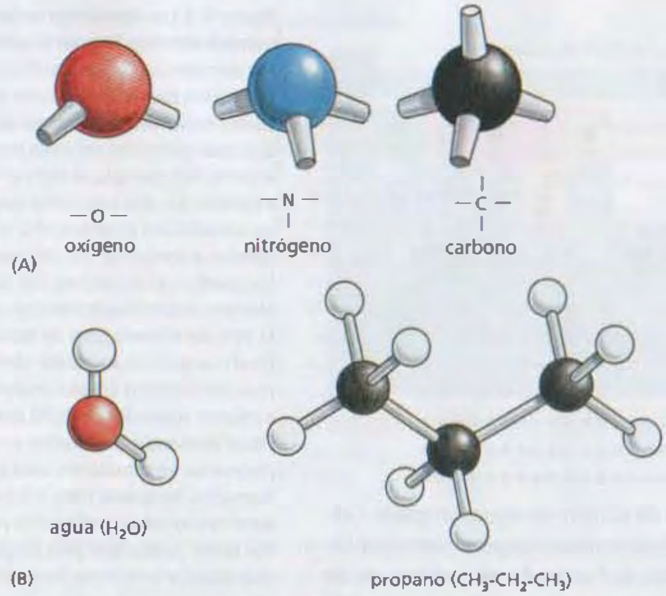


Figura 2–8 La geometría de los enlaces covalentes. (A) Disposición espacial de los enlaces covalentes que pueden formar el oxígeno, el nitrógeno y el carbono. (B) Las moléculas que se forman a partir de estos átomos tienen una estructura tridimensional precisa, como se muestra en los modelos de esferas y varillas, para el agua y para el propano. Una estructura puede ser definida por los ángulos de los enlaces y por la longitud de los enlaces de cada una de las uniones covalentes. Los átomos están coloreados de acuerdo con la siguiente convención usada generalmente: H, *blanco;* C, *negro;* O, *rojo;* N, *azul.*

Existen diferentes tipos de enlaces covalentes

La mayoría de los enlaces covalentes suponen compartir dos electrones, uno cedido por cada uno de los átomos que participan en el enlace; se trata de los denominados *enlaces sencillos.* Sin embargo, algunos enlaces covalentes implican compartir más de un par de electrones. Por ejemplo, se pueden compartir cuatro electrones, dos de cada uno de los átomos participantes; este tipo de enlace recibe el nombre de *enlace doble.* Los enlaces dobles son más cortos y más fuertes que los enlaces sencillos y tienen efectos particulares en la geometría tridimensional de las moléculas que los presentan. Generalmente, un solo enlace covalente entre dos átomos permite la rotación relativa de una parte de la molécula respecto a la otra, alrededor del eje del enlace. Un enlace doble impide dicha rotación, al producirse una disposición más rígida y menos flexible de los átomos (**Figura 2–9** y Panel 2–1, pp. 106-107).

En algunas moléculas, los electrones son compartidos entre tres o más átomos y se originan enlaces que tienen un carácter híbrido, intermedio entre enlaces sencillos y enlaces dobles. Por ejemplo, la molécula de benceno -bastante estable- consta de un anillo de seis átomos de carbono en el que los electrones que conforman los enlaces se distribuyen de manera equitativa entre todos los átomos del anillo (aunque por lo general se representan como una secuencia alterna de enlaces sencillos y dobles, como se muestra en el Panel 2–1).

Cuando los átomos unidos por un solo enlace covalente pertenecen a elementos distintos, generalmente los dos átomos atraen con diferente intensidad a los electrones que comparten. Por ejemplo, respecto a un átomo de carbono, los átomos de O y de N atraen a los electrones con mayor fuerza mientras que un átomo de H atrae a los electrones con una fuerza menor.

Por definición una estructura polar (en el sentido eléctrico) es aquella que presenta una carga positiva concentrada en uno de sus extremos (el polo positivo) y una carga negativa concentrada en el otro extremo (el polo negativo). Por lo tanto, los enlaces covalentes en los que los electrones se comparten de una manera no equitativa, se conocen como *enlaces polares covalentes* (**Figura 2–10**). Por ejemplo, los enlaces covalentes entre un oxígeno y un hidrógeno, –O–H, o entre un nitrógeno y un hidrógeno, –N–H, son polares, mientras que en el enlace entre un carbono y un hidrógeno, –C–H, los electrones son atraídos de manera más equitativa por ambos átomos, por lo que el enlace se considera relativamente no polar.

Los enlaces covalentes polares son extremadamente importantes en biología, ya que originan *dipolos permanentes* que permiten a las moléculas interactuar por medio de fuerzas eléctricas. Cualquier molécula grande con muchos grupos polares tendrá una determinada configuración de cargas parcialmente positivas y negativas en su superficie. Cuando dicha molécula encuentre una segunda molécula con una serie complementaria de cargas, ambas moléculas se atraerán mutuamente a través de interacciones electrostáticas comparables (pero más débiles) a las indicadas.

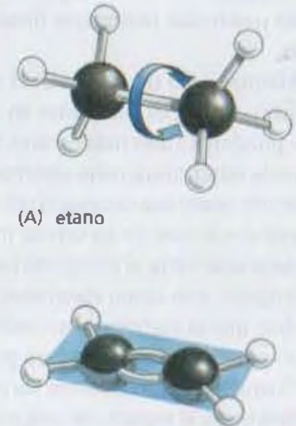


Figura 2–9 Comparación entre enlaces carbono - carbono dobles y sencillos. (A) La molécula de etano, con un solo enlace covalente entre los dos átomos de carbono, ilustra la disposición tetraédrica de los enlaces covalentes sencillos formados por el carbono. Uno de los dos grupos CH_3 unidos entre sí por un enlace covalente, pueden rotar respecto al otro alrededor del eje del enlace. (B) El enlace doble entre dos átomos de carbono que tiene una molécula de eteno (etileno) altera la geometría de los átomos de carbono y sitúa a todos los átomos en el mismo plano (*azul*); el doble enlace impide la rotación de uno de los grupos CH_2 respecto al otro.

Un átomo se comporta a menudo como si tuviera un radio fijo

Cuando se forma un enlace covalente entre dos átomos, el hecho de compartir electrones hace que sus núcleos se acerquen entre sí de forma extraordinaria. Sin embargo, la mayoría de los átomos que en las células son empujados rápidamente uno contra otro se localizan en moléculas distintas. ¿Qué sucede cuando dos de estos átomos chocan?

Para facilitar la comprensión, los átomos y las moléculas se representan de forma muy esquemática y se dibuja de forma lineal su fórmula estructural o en forma de esferas y varillas. Sin embargo, los *modelos de espacio lleno* proporcionan una representación más fidedigna de la estructura molecular. En ellos una envoltura sólida representa el radio de la nube electrónica donde fuertes fuerzas de repulsión evitan el acercamiento de cualquier otro átomo no enlazado: el denominado *radio de Van der Waals* de un átomo. Esto es posible porque cuando dos átomos se acercan mucho entre sí, la repulsión aumenta muy intensamente. A distancias superiores, cada uno de los dos átomos puede experimentar una ligera atracción, conocida como *atracción de van der Waals*. Como resultado de esta situación, existe una distancia en la que las fuerzas de atracción y de repulsión se equilibran, produciendo un mínimo de energía en cada interacción entre átomos de elementos que no están enlazados (Figura 2–11).

En función de las circunstancias, representaremos las pequeñas moléculas como dibujos lineales, como modelos de esferas y varillas, o como modelos espaciales. Para poder comparar estos modelos, se representa la molécula de agua de las tres formas distintas en la Figura 2–12. Cuando representemos moléculas muy grandes como las proteínas, a menudo necesitaremos simplificar más el modelo (véase, p. ej., Panel 3-2, pp. 132–133).

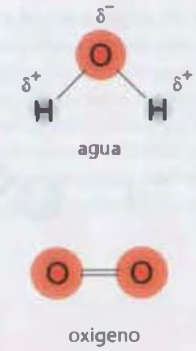


Figura 2–10 Enlaces covalentes polares y apolares. Se compara la distribución electrónica de la molécula de agua (H_2O), que es polar, y de la molécula de oxigeno (O_2), que es apolar (δ^+, carga parcialmente positiva; δ^-, carga parcialmente negativa).

El agua es la sustancia más abundante de las células

El agua supone cerca del 70% del peso de una célula; la mayoría de las reacciones intracelulares se producen en un medio acuoso. La vida en la Tierra se originó en el océano y las condiciones de ese entorno primigenio quedaron grabadas permanentemente en la química de los seres vivos. La vida, por lo tanto, depende de las propiedades del agua.

En cada molécula de agua (H_2O) los dos átomos de H se unen al átomo de O mediante enlaces covalentes (véase Figura 2–12). Los dos enlaces son muy polares debido a que el O atrae fuertemente a los electrones, mientras que el H los atrae muy poco. En consecuencia, en cada molécula de agua los electrones se distribuyen de forma desigual, con un exceso de carga positiva en ambos átomos de H y de carga negativa en el O (véase Figura 2–10). Cuando una región cargada positivamente de una molécula de agua (es decir, uno de los átomos de H) se acerca a una región cargada negativamente (es decir, el O) de una segunda molécula de agua, la atracción eléctrica entre ellas puede generar un enlace débil llamado *enlace de hidrógeno* (véase la Figura 2–15). Estos enlaces son mucho más débiles que los enlaces covalentes y se rompen fácilmente por los movimientos generados por la energía térmica de las moléculas, de modo que cada enlace sólo persiste durante un tiempo muy corto. Sin embargo, el efecto combinado de muchos enlaces débiles puede ser notable. Gracias a sus dos átomos de H, cada molécula de agua puede formar enlaces de hidrógeno con otras dos moléculas de agua, produciendo una trama en la cual los enlaces de hidrógeno se rompen y se

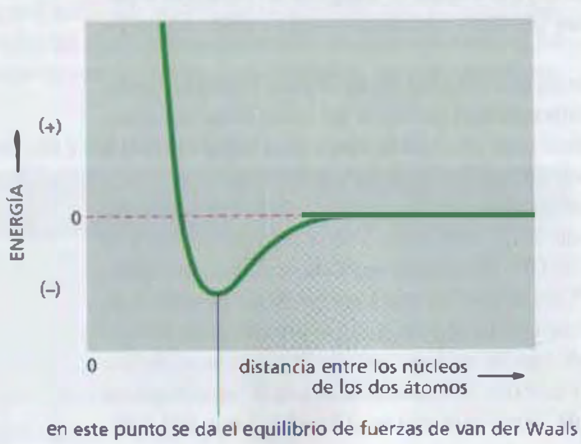


Figura 2–11 Equilibrio de las fuerzas de van der Waals entre dos átomos. A medida que los núcleos de ambos átomos se acercan uno al otro, muestran al principio una interacción de enlace débil debido a sus cargas eléctricas fluctuantes. Sin embargo, los mismos átomos se repelerán fuertemente si se acercan demasiado. El equilibrio entre estas fuerzas de atracción y de repulsión de van der Waals tiene lugar a la energía mínima indicada. Este mínimo determina la distancia de contacto entre dos átomos no unidos entre sí de forma covalente; esta distancia es la suma de sus radios de van der Waals. Por definición, la energía cero (indicada por la línea *roja* a trazos) es la energía cuando los dos núcleos están separados una distancia infinita.

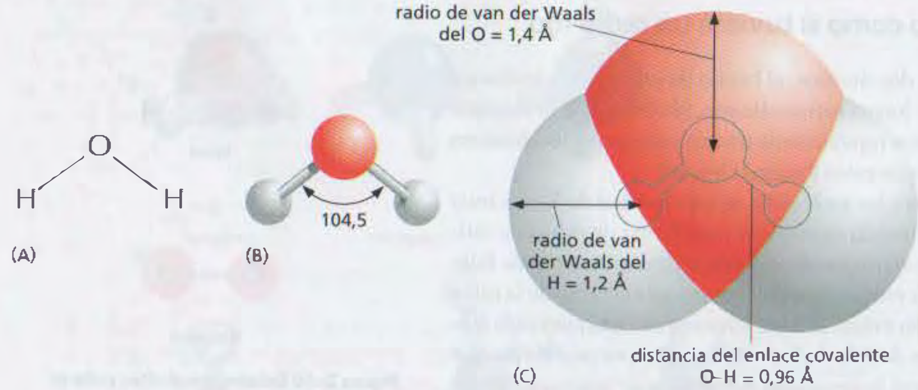


Figura 2-12 Tres representaciones de una molécula de agua. (A) La representación típica de la fórmula estructural, en la que cada átomo se indica por su símbolo convencional y cada línea representa un enlace covalente que une dos átomos. (B) Modelo de esferas y varillas en el que los átomos se representan por esferas de diámetro arbitrario conectadas por varillas que representan los enlaces covalentes. En este modelo, a diferencia de (A), los ángulos de los enlaces se representan con exactitud (véase también la Figura 2-8). (C) Modelo espacial en el que tanto la geometría de los enlaces como el radio de van der Waals se representan con exactitud.

forman continuamente (Panel 2-2, pp. 108-109). A temperatura ambiente, el agua no es un gas sino un líquido, con un elevado punto de ebullición y una elevada tensión superficial, debido a los enlaces de hidrógeno que unen a las moléculas de agua entre sí.

Las moléculas, como los alcoholes, que contienen enlaces polares y que pueden formar enlaces de hidrógeno con el agua, se disuelven con rapidez en agua. Las moléculas que tienen cargas positivas o negativas (iones) interactúan favorablemente con el agua. Estas moléculas se denominan **hidrofílicas**, lo cual significa que tienen afinidad por el agua. Una gran proporción de las moléculas del entorno acuoso de una célula pertenecen necesariamente a esta categoría, que incluye los azúcares, el DNA, el RNA y la mayoría de proteínas. Por el contrario, las moléculas **hidrofóbicas** (que repelen el agua) permanecen sin carga y forman pocos enlaces de hidrógeno o ninguno, por lo que no se disuelven en agua. Los hidrocarburos son un buen ejemplo de moléculas hidrofóbicas (véase Panel 2-1, pp. 106-107). En estas moléculas, los átomos de H están unidos de forma covalente a átomos de C mediante enlaces no polares. Debido a que los átomos de H casi no tienen carga neta positiva, no pueden formar enlaces de hidrógeno con otras moléculas. Esta característica hace que los hidrocarburos sean hidrofóbicos –una propiedad que se aprovecha en las células, cuyas membranas se construyen a partir de moléculas que tienen largas colas de hidrocarburos, como se describe en el Capítulo 10.

Algunas moléculas polares son ácidos o bases

Uno de los tipos más sencillos de reacción química, y que además tiene un profundo sentido en las células, tiene lugar cuando se disuelve en agua una molécula que tiene un enlace covalente considerablemente polar entre un hidrógeno y otro átomo. El átomo de hidrógeno de dicha molécula ha cedido su electrón al átomo que le acompaña, de manera que parece que está en forma de un núcleo de hidrógeno cargado positivamente, casi "desnudo", es decir, un **protón (H^+)**. Cuando las moléculas de agua rodean a la molécula polar, el protón es atraído hacia la carga parcialmente negativa del átomo de O de una molécula de agua adyacente, y puede disociarse del átomo al que estaba unido y asociarse con el átomo de oxígeno de la molécula de agua, generando un **ion hidronio (H_3O^+)** (**Figura 2-13A**). La reacción inversa también se produce con facilidad de modo que hemos de imaginar un estado de equilibrio en el que miles de millones de protones cambian constantemente su unión a una y a otra molécula de la solución.

Este mismo tipo de reacción se produce en una solución de agua pura. Como se ilustra en la Figura 2-13B, las moléculas de agua intercambian protones sin cesar unas con otras. Como resultado de ello, el agua pura contiene unas concentraciones muy bajas (10^{-7}M) e iguales de iones $H_3{}^+O$ y OH^- (la concentración de H_2O del agua pura es 55,5 M).

Los **ácidos** son sustancias que cuando se disuelven en agua liberan protones formando H_3O^+. Cuanto mayor sea la concentración de H_3O^+, más ácida será la solución. A medida que aumenta la concentración de H_3O^+, la de OH^- disminuye seg n la ecuación de equilibrio para el agua $[H_3O^+][OH^-] = 1{,}0 \times 10^{-14}$, en la que los corchetes indican producto de concentraciones molares. Por convenio, la concentración de H_3O^+ se indica como la concentración de H^+, aunque casi todos los H^+ de una solución acuosa se encuentran en forma de H_3O^+. Para evitar el uso de números muy grandes, la concentración de H^+ se expresa en escala logarítmica y se denomina **escala de pH**, como se ilustra en el Panel 2-2 (pp. 108-109).

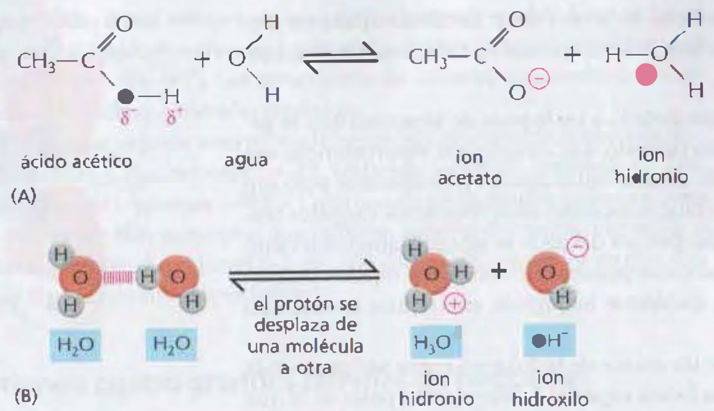


Figura 2–13 Ácidos en agua. (A) Reacción que se desencadena cuando una molécula de ácido acético se disuelve en el agua. (B) Las moléculas de agua continuamente intercambian protones entre sí y forman iones hidronio e iones hidroxilo. Estos iones vuelven a recombinarse rápidamente y originar de nuevo moléculas de agua.

El agua pura tiene un pH de 7,0 y, por lo tanto, es neutra, es decir, no es ni ácida (pH < 7,0) ni básica (pH > 7,0).

En las células, el protón de los iones hidronio puede pasar fácilmente a muchos tipos diferentes de moléculas y altera sus características, por lo que la concentración de H_3O^+ en una célula (la acidez) debe estar muy bien regulada. El interior de una célula está muy cerca de la neutralidad y está tamponado debido a la presencia de muchos grupos químicos que pueden aceptar y liberar protones cerca del pH 7,0.

Lo opuesto a un ácido es una **base**. Así como la propiedad característica de un ácido es la de dar protones a las moléculas de agua de modo que aumenta la concentración de iones H_3O^+, la propiedad característica de una base es la de aceptar protones mediante la reducción de la concentración de iones H_3O^+ que incrementa, por lo tanto, la concentración de iones hidroxilo (OH^-). Una base puede tanto combinarse directamente con protones como formar iones hidroxilo que de inmediato se combinan con protones produciendo H_2O. Así, el hidróxido de sodio (NaOH) es básico (o *alcalino*) debido a que en solución acuosa se disocia y forma iones Na^+ e iones OH^-. Otras bases, importantes en las células vivas, contienen grupos NH_2. Estos grupos se combinan directamente con un protón del agua: $-NH_2 + H_2O \rightarrow -NH_3^+ + OH^-$.

Todas las moléculas que aceptan protones del agua lo harán más fácilmente cuando la concentración de H_3O^+ sea alta (soluciones ácidas). De la misma forma, las moléculas que pueden liberar protones lo harán más fácilmente cuando la concentración de H_3O^+ sea baja (soluciones básicas) y tenderán a captarlos cuando esta concentración sea alta.

En las células, cuatro tipos de atracciones no-covalentes facilitan la unión de las moléculas entre sí

En las soluciones acuosas, los enlaces covalentes son unas 10-100 veces más fuertes que el resto de fuerzas de atracción entre átomos y sus conexiones permiten definir los límites entre moléculas distintas. Sin embargo, la mayor parte de la biología depende del enlace específico entre distintas moléculas. Este enlace está mediado por un conjunto de atracciones no-covalentes que individualmente son bastante débiles, pero cuyas energías pueden sumarse dando lugar a una fuerza efectiva entre dos moléculas independientes. Ya hemos descrito tres de estas fuerzas de atracción: las atracciones electrostáticas (enlaces iónicos), los enlaces de hidrógeno y las atracciones de van der Waals. En la **Tabla 2–1**, se compara la fuer-

Tabla 2–1 Enlaces químicos covalentes y no-covalentes

TIPO DE ENLACE		LONGITUD (nm)	FUERZA (kcal/mol) EN EL VACÍO	FUERZA (kcal/mol) EN AGUA
Covalente		0,15	90	90
No-covalente:	iónico*	0,25	80	3
	hidrógeno	0,30	4	1
	atracción de van der Waals (por átomo)	0,35	0,1	0,1

*El enlace iónico es una atracción electrostática entre dos átomos cargados.

za de estos tres tipos de *enlaces no-covalentes* con la de un enlace covalente típico, en presencia y ausencia de agua. Debido a su importancia fundamental en todos los sistemas biológicos, resumiremos sus propiedades:

- **Atracciones electrostáticas.** Se producen debido a las fuerzas de atracción que se generan entre átomos con cargas de signo opuesto. Las atracciones electrostáticas son bastante fuertes en ausencia de agua. Se forman entre dipolos permanentes pero son más intensas cuando los dos átomos involucrados están completamente cargados (*enlaces iónicos*). Sin embargo, las moléculas polares del agua se agrupan alrededor tanto de los iones con carga como de las moléculas polares que contienen dipolos permanentes (**Figura 2–14**). En la mayoría de ambientes biológicos, esto reduce la atracción mutua de los dos tipos de iones.
- **Enlaces de hidrógeno.** La estructura de un enlace de hidrógeno típico se ilustra en la **Figura 2–15**. Este enlace representa una forma especial de interacción polar en la que un átomo de hidrógeno electropositivo es compartido parcialmente por dos átomos electronegativos. Este hidrógeno puede considerarse como un protón que ha sido disociado en parte de un átomo donante, permitiéndole ser compartido por un segundo átomo receptor. A diferencia de una interacción electrostática típica, este enlace es muy direccional y es más fuerte cuando se puede dibujar una línea recta entre los tres átomos implicados. Como ya hemos comentado, el agua debilita estas uniones al formar enlaces de hidrógeno que compiten con las moléculas implicadas.
- **Atracciones de van der Waals.** La nube de electrones que rodea un átomo apolar fluctúa y produce un dipolo oscilante. Tales dipolos inducirán de manera pasajera un dipolo opuesto oscilante polarizado en un átomo vecino. Esta interacción genera una atracción muy débil entre átomos. Pero cuando dos superficies encajan estrechamente muchos de sus átomos pueden estar en contacto de forma simultánea, por lo que el resultado global es, a menudo, significativo. El agua no debilita estas atracciones, denominadas de van der Waals.

El cuarto efecto que a menudo une las moléculas entre sí en el agua, estrictamente hablando no es ningún enlace. Sin embargo, es una **fuerza hidrofóbica** muy importante que se origina porque las superficies no polares se excluyen de la red de moléculas de agua unidas por enlaces de hidrógeno, ya que interferirían físicamente con las interacciones muy favorables que se establecen entre estas moléculas de agua. Si dos superficies apolares se acercan entre sí, se reduce su contacto con el agua. En este sentido, la fuerza es bastante inespecífica. Sin embargo veremos en el Capítulo 3 que las fuerzas hidrofóbicas son fundamentales para el plegamiento adecuado de las moléculas de las proteínas.

En el Panel 2–3 se presenta una visión general de los cuatro tipos de atracciones descritas y en la **Figura 2–16** se ilustra esquemáticamente de qué manera pueden sumarse muchas de estas interacciones para mantener unidas las superficies complementarias de dos macromoléculas, aunque cada interacción por sí misma sería demasiado débil para ser efectiva en términos de movimientos térmicos.

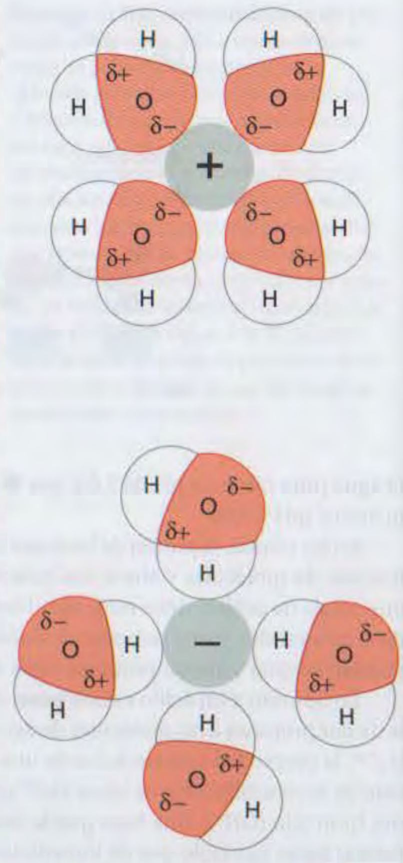


Figura 2–14 Cómo se orientan los dipolos de las moléculas de agua y reducen la afinidad de los iones con carga opuesta o de grupos polares.

Las células están formadas por compuestos de carbono

Hemos visto como se combinan los átomos formando pequeñas moléculas y como se comportan estas moléculas en un entorno acuoso. Ahora podemos examinar los principales tipos de pequeñas moléculas que se encuentran en las células y su papel biológico. Comprobaremos que unos cuantos tipos básicos de moléculas, formados por un conjunto de elementos diversos, dan lugar a la extraordinaria riqueza de formas y comportamientos que muestran los seres vivos.

Si descartamos el agua y los iones inorgánicos como el potasio, casi todas las demás moléculas de una célula están compuestas de carbono. El carbono destaca entre todos los demás elementos por su capacidad de formar grandes moléculas; el silicio le sigue de lejos. Debido a su pequeño tamaño y a sus cuatro electrones y cuatro espacios vacantes en su orbital externo, un átomo de carbono puede formar cuatro enlaces covalentes con otros átomos. Pero lo más importante es el hecho de que el átomo de carbono puede unirse a otros

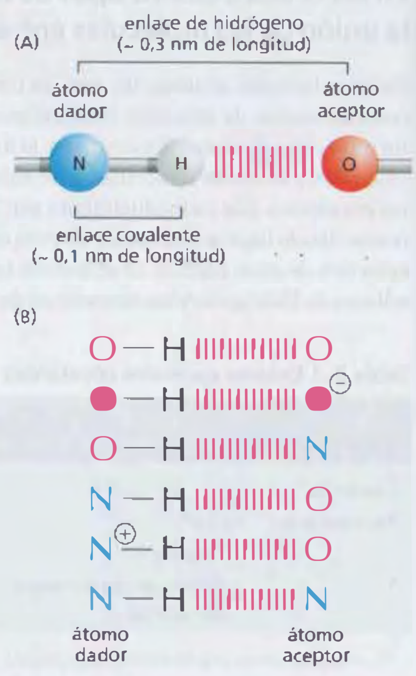


Figura 2–15 Enlaces de hidrógeno. (A) Modelo de esferas y varillas de un enlace de hidrógeno típico. La distancia entre los átomos de hidrógeno y oxigeno es menor que la suma de sus radios de van der Waals, lo que indica que algunos electrones se comparten parcialmente. (B) Los enlaces de hidrógeno más comunes en las células.

átomos de carbono por medio de un enlace covalente C–C altamente estable, formando cadenas y anillos, y dan lugar a moléculas grandes y complejas sin límite superior aparente de tamaño (véase el Panel 2–1, pp. 106–107). Los compuestos de carbono que produce una célula, grandes y pequeños, se llaman *moléculas orgánicas*.

En las moléculas orgánicas se presentan repetidamente algunas combinaciones de átomos, como los grupos metilo (–CH_3), hidroxilo (–OH), carboxilo (–COOH), carbonilo (–C=O), fosfato (–PO_3^{2-}), sulfhidrilo (–SH) y amino (–NH_2). Cada uno de estos **grupos químicos** tiene unas características químicas y físicas propias que influyen sobre el comportamiento de la molécula en la que se encuentran. En el Panel 2–1, pp. 106-107, se presentan los grupos químicos más comunes y algunas de sus propiedades.

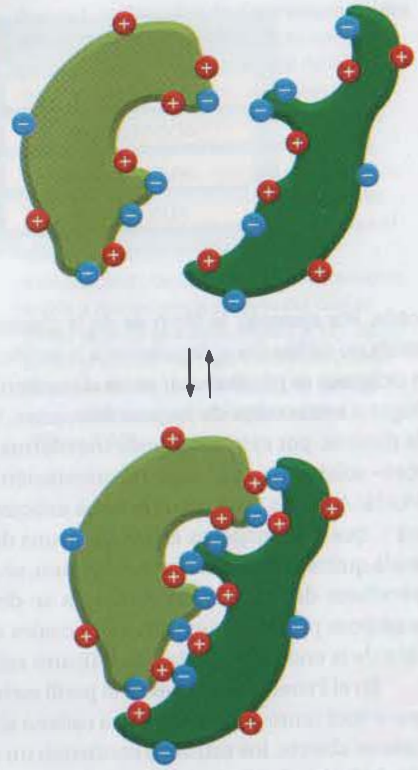


Figura 2–16 Esquema que indica cómo encajan dos macromoléculas con superficies complementarias, a través de interacciones no-covalentes.

Las células contienen cuatro grandes familias de pequeñas moléculas orgánicas

Las pequeñas moléculas orgánicas de la célula son compuestos de carbono cuyos pesos moleculares oscilan entre 100 y 1000, y contienen aproximadamente hasta 30 átomos de carbono. Por lo general se encuentran disueltas y participan en funciones muy diversas. Algunas de estas pequeñas moléculas orgánicas se utilizan como unidades *monoméricas* en la construcción de gigantescas *macromoléculas* poliméricas –las proteínas, los ácidos nucleicos y los grandes polisacáridos– de la célula. Otras actúan como fuente de energía y se rompen y se transforman formando otras moléculas pequeñas a través de un laberinto de rutas metabólicas intracelulares. Muchas de estas pequeñas moléculas tienen más de una función en la célula, por ejemplo, pueden actuar como subunidad para la formación de una macromolécula o como fuente de energía. Las pequeñas moléculas orgánicas son mucho menos abundantes que las macromoléculas orgánicas y constituyen tan sólo una décima parte de la masa total de la materia orgánica de una célula (**Tabla 2–2**). En una célula típica deben existir aproximadamente un millar de tipos diferentes de estas pequeñas moléculas.

Todas las moléculas orgánicas se sintetizan a partir de (y se degradan a) el mismo conjunto de compuestos sencillos. Tanto la síntesis como la degradación se producen a través de cambios químicos secuenciales limitados y siguiendo unas reglas definidas. Por lo tanto, los compuestos de una célula están relacionados químicamente entre sí por lo que la mayoría de ellos se pueden clasificar en algunas familias diferentes. De manera general, en las células existen cuatro familias principales de pequeñas moléculas orgánicas: los *azúcares*, los *ácidos grasos*, los *aminoácidos* y los *nucleótidos* (**Figura 2–17**). A pesar de que muchos de los compuestos celulares no entren en estas categorías, estas cuatro familias de pequeñas moléculas orgánicas, junto con las macromoléculas que forman al unirse entre sí, originan largas cadenas y constituyen una gran parte de la masa celular (véase Tabla 2–2).

Los azúcares son fuente de energía para las células y son las subunidades de los polisacáridos

Los **azúcares** más sencillos –los *monosacáridos*– son compuestos que tienen la fórmula general $(CH_2O)_n$, donde *n* habitualmente es 3, 4, 5, 6 o 7. Los azúcares, y las moléculas que se forman a partir de ellos, también se denominan *carbohidratos* debido a su fórmula simplifi-

Tabla 2–2 Tipos de moléculas en las células bacterianas

	PORCENTAJE DEL PESO TOTAL DE LA CÉLULA	NÚMERO DE TIPOS DE CADA CÉLULA
Agua	70	1
Iones inorgánicos	1	20
Azúcares y precursores	1	250
Aminoácidos y precursores	0,4	100
Nucleótidos y precursores	0,4	100
Ácidos grasos y precursores	1	50
Otras moléculas pequeñas	0,2	~300
Macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos)	26	~3000

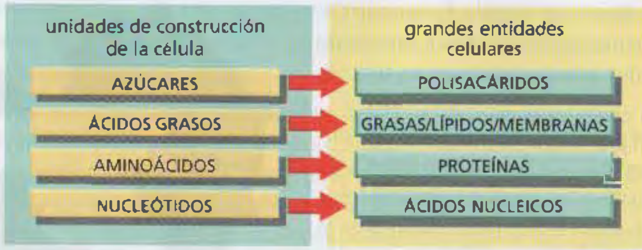


Figura 2–17 Las cuatro familias principales de pequeñas moléculas orgánicas de las células. Estas pequeñas moléculas forman las unidades monoméricas, o subunidades, a partir de las cuales se construyen la mayoría de macromoléculas y otros compuestos de la célula. Algunos, como los azúcares o los ácidos grasos, son, además, fuentes de energía.

cada. Por ejemplo, la fórmula de la glucosa es $C_6H_{12}O_6$ (**Figura 2–18**). Sin embargo, la fórmula no define completamente a la molécula; un mismo conjunto de carbonos, hidrógenos y oxígenos se pueden unir entre sí mediante enlaces covalentes, de diversas maneras, y dan lugar a estructuras de formas diferentes. Como se muestra en el Panel 2–4 (pp. 112–113), la glucosa, por ejemplo, puede transformarse en un azúcar diferente –la manosa o la galactosa– solamente cambiando la orientación de algunos grupos OH respecto al resto de la molécula. Además, cada uno de estos azúcares puede existir en dos formas, llamadas formas D y L, que son imágenes especulares una de la otra. Las moléculas que tienen la misma fórmula química pero diferente estructura, se denominan *isómeros*; las parejas de imágenes especulares de una misma molécula se denominan *isómeros ópticos*. Muchas moléculas orgánicas presentan isómeros, los cuales desempeñan un papel importante en la generación de la enorme variedad de azúcares existentes en la célula.

En el Panel 2–4 se muestra el perfil estructural y químico de los azúcares. Los azucares se presentan tanto en forma de una cadena abierta como de un anillo cerrado. En su forma de cadena abierta, los azúcares contienen un número variable de grupos hidroxilo y un grupo aldehído (>C=O) u otro cetona (H>C=O). El grupo aldehído o cetona desempeña una función especial. En primer lugar, puede reaccionar con un grupo hidroxilo de la misma molécula convirtiéndola en un anillo; en esta forma cíclica, el carbono del grupo aldehído o cetona original se reconoce porque es el único que se encuentra enlazado a dos oxígenos. En segundo lugar, una vez se ha formado la estructura cíclica, este mismo carbono puede unirse a su vez, a través del oxígeno, con uno de los carbonos portadores de un grupo hidroxilo de otra molécula de azúcar. Este proceso genera un *disacárido*, como la sacarosa, que está formada por una unidad de glucosa y otra de fructosa. Los azúcares poliméricos más grandes van desde los *oligosacáridos* (trisacáridos, tetrasacáridos, etc.) hasta los enormes *polisacáridos*, que pueden estar formados por miles de unidades de monosacáridos.

La manera en que los azúcares se unen entre sí y forman un polímero ilustra algunas de las características comunes de la formación de enlaces bioquímicos. Un enlace se forma entre un grupo –OH de un azúcar y un grupo –OH de otro azúcar, mediante una **reacción de condensación**, en la que la formación del enlace supone la liberación de una molécula de agua (**Figura 2–19**). En otros polímeros biológicos como los ácidos nucleicos y las proteínas, las subunidades también se unen entre sí mediante reacciones de condensación en las que se libera agua. Los enlaces generados por todas estas reacciones de condensación pueden

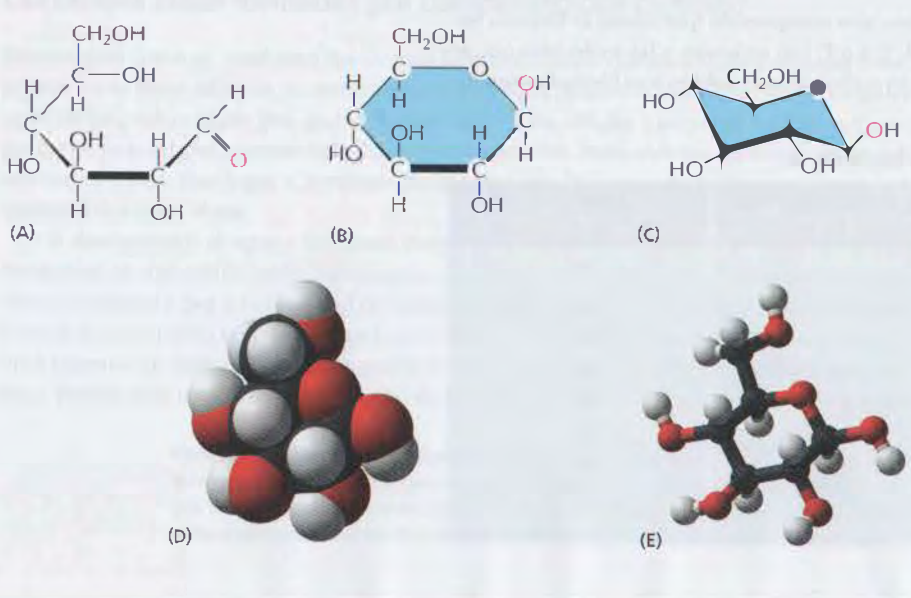


Figura 2–18 La estructura de la glucosa, un azúcar sencillo. Como se ha ilustrado para el agua (véase Figura 2-12), cualquier molécula se puede representar de diferentes maneras. En las fórmulas estructurales que se muestran en (A), (B) y (C), los átomos se representan por sus símbolos químicos, unidos entres sí por líneas que representan enlaces covalentes. Las *líneas gruesas* se utilizan para indicar el plano del anillo glucídico, y destacar así que los grupos –H y –OH no se encuentran en el mismo plano. (A) La forma en cadena abierta de este azúcar, que está en equilibrio con la forma en anillo o estructura cíclica más estable que se observa en (B). (C) La forma de silla es una manera alternativa de dibujar la molécula cíclica y refleja la geometría de forma más exacta que la fórmula estructural de (B). (D) Modelo espacial lleno que, además de representar la disposición tridimensional de los átomos, también utiliza los radios de van der Waals para representar la silueta de la superficie de la molécula. (E) Modelo de bolas y varillas en el que se indica la disposición tridimensional de los átomos. (H, *blanco;* C, *negro;* O, *rojo;* N, *azul*).

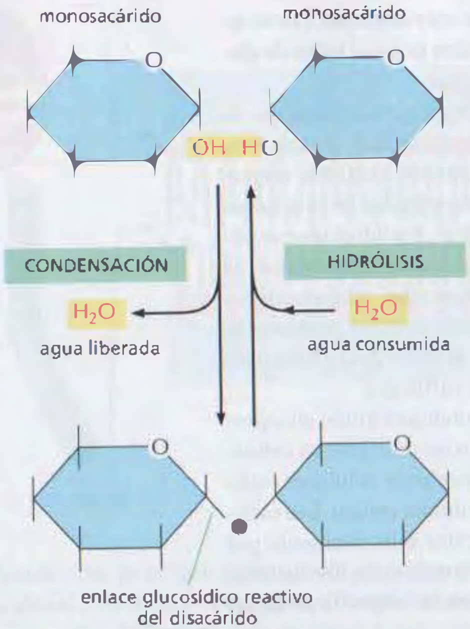


Figura 2-19 Reacción de dos monosacáridos que generan un disacárido. Esta reacción pertenece a la categoría general de las reacciones denominadas *reacciones de condensación*, en las que dos moléculas se unen entre sí mediante la pérdida de una molécula de agua. La reacción inversa (en la que se añade agua) se denomina *hidrólisis*. El carbono reactivo sobre el que se forma el nuevo enlace (en este caso sobre el monosacárido de la *izquierda*) es el carbono unido a dos oxígenos a través del cual se forma el anillo glucídico (Figura 2-18). Tal como se indica, este tipo común de enlace covalente entre dos moléculas de azúcar es conocido como *enlace glucosídico* (Figura 2-20).

romperse a través del proceso inverso de la **hidrólisis**, en el que se consume una molécula de agua (véase Figura 2-19).

Cada monosacárido tiene muchos grupos hidroxilo libres que pueden formar uniones con otros monosacáridos (o con algún otro compuesto), por lo que los polímeros de azúcares pueden ser ramificados y el número de estructuras posibles de polisacárido es extremadamente grande. Incluso un disacárido sencillo formado por dos unidades de glucosa, se puede presentar en once variedades distintas (**Figura 2-20**), mientras que tres hexosas diferentes ($C_6H_{12}O_6$) pueden unirse entre sí formando miles de trisacáridos. Por esta razón, determinar la disposición de los azúcares en un polisacárido es una tarea mucho más compleja que determinar la secuencia de nucleótidos de una molécula de DNA, en la que todas las unidades se unen a sus vecinas de la misma forma.

El monosacárido *glucosa* es una fuente de energía clave para las células. Mediante una serie de reacciones, la glucosa se rompe en moléculas más pequeñas y libera energía dispo-

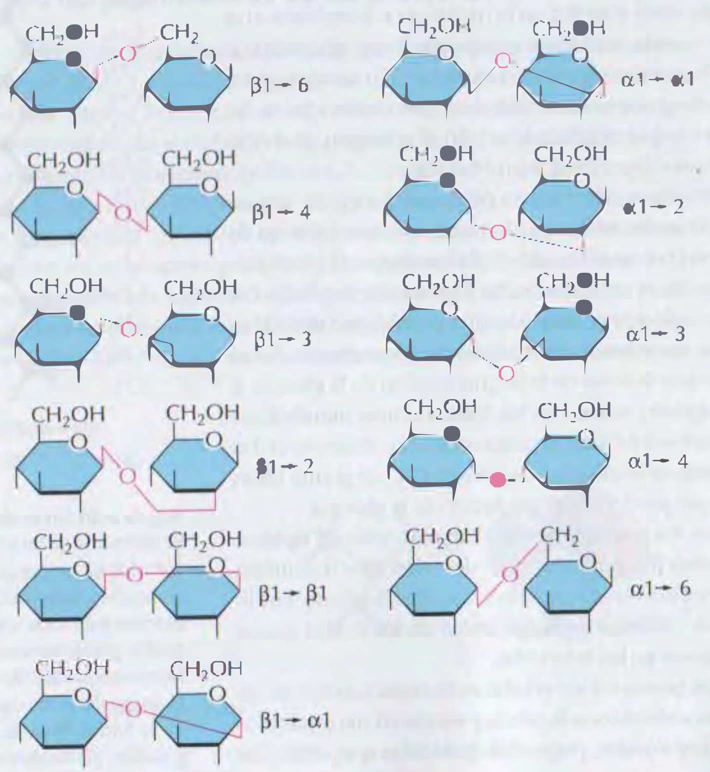


Figura 2-20 Once disacáridos formados por la unión de dos unidades de D-glucosa. Aunque se diferencian únicamente en el tipo de enlace entre las dos unidades de glucosa, son químicamente diferentes. Puesto que los oligosacáridos asociados a las proteínas y a los lípidos pueden tener seis o más tipos diferentes de azúcares unidos a través de enlaces glucosídicos como los ilustrados, en disposiciones lineales y ramificadas, el número de tipos distintos posibles de oligosacáridos que pueden ser utilizados en las células es muy elevado. Para una explicación de los enlaces α y β véase el Panel 2-4 (pp. 112-113). Los guiones *negros* indican posiciones OH (las líneas *rojas* indican las orientaciones del enlace del disacárido y sus ángulos no indican átomos extra).

nible para la célula a fin de realizar trabajo útil, como explicaremos más adelante. Como reservas de energía, las células utilizan polisacáridos sencillos formados por unidades de glucosa, principalmente el *glucógeno* en animales y el *almidón* en plantas.

Sin embargo, los azúcares no sólo se utilizan para la producción y el almacenamiento de energía. Por ejemplo, también se pueden utilizar como soporte mecánico. Así, el compuesto químico orgánico más abundante en la tierra –la *celulosa* de las paredes celulares vegetales– es un polisacárido de glucosa. Debido a que las uniones glucosa–glucosa de la celulosa son diferentes a las que se presentan en el almidón y en el glucógeno, los humanos no podemos digerir la celulosa y utilizar su glucosa. Otra sustancia orgánica extraordinariamente abundante, la *quitina* de los exoesqueletos de los insectos y de las paredes celulares de los hongos, también es un polisacárido que no podemos digerir –en este caso un polímero lineal de un derivado glucídico llamado *N*-acetilglucosamina (véase el Panel 2–4). Otros polisacáridos son los componentes principales del limo, el mucus y los cartílagos.

Los oligosacáridos más pequeños unidos covalentemente a proteínas forman glicoproteínas y si se unen a lípidos, *glicolípidos*, los cuales se encuentran en las membranas celulares. Como describiremos en el Capítulo 10, la mayoría de las superficies celulares están recubiertas y decoradas con glicoproteínas y glicolípidos de la membrana celular. Las cadenas laterales de azúcar de estas moléculas a menudo son reconocidas selectivamente por otras células. Por ejemplo, la base molecular de las principales diferencias entre los distintos tipos sanguíneos humanos, denominados A, B, AB y O, son diferencias específicas en los azúcares de la superficie de las células.

Los ácidos grasos son componentes de las membranas celulares y también fuentes de energía

Una molécula de ácido graso, como el *ácido palmítico*, tiene dos regiones químicamente diferentes (**Figura 2–21**). Una es una larga cadena hidrocarbonada, que es hidrofóbica y no muy reactiva químicamente. La otra es un grupo carboxilo (–COOH), que se comporta como un ácido (ácido carboxílico); en solución se ioniza (–COO⁻) y es muy hidrofílico y químicamente reactivo. Casi la totalidad de los ácidos grasos de una célula están unidos de forma covalente a otras moléculas por medio de su grupo ácido carboxílico.

La cola de hidrocarburo del ácido palmítico está *saturada*: no tiene dobles enlaces entre los átomos de carbono y contiene el máximo número posible de átomos de hidrógeno. El ácido esteárico, otro ácido graso común en la grasa animal, también está saturado. Algunos otros ácidos grasos, como el ácido oleico, tienen colas *insaturadas*, con uno o más dobles enlaces en su cadena. Los dobles enlaces generan ángulos en la molécula e interfieren con su capacidad de empaquetarse entre sí formando una masa compacta. Esta característica es la causa de la diferencia que existe entre la margarina sólida (saturada) y un aceite vegetal líquido (poliinsaturado). Los diferentes ácidos grasos encontrados en las células sólo se diferencian entre sí en la longitud de sus cadenas hidrocarbonadas y en el número y posición de los dobles enlaces carbono–carbono (véase el Panel 2–5, pp. 114–115).

Los ácidos grasos se almacenan en el citoplasma de muchas células en forma de pequeñas gotas formadas por moléculas de *triacilgliceroles*, moléculas formadas por tres cadenas de ácidos grasos unidas a una molécula de glicerol (véase el Panel 2–5) y constituyen la grasa animal que se encuentra en la carne, la mantequilla, la crema de leche y los aceites vegetales como el aceite de maíz y el aceite de oliva. Cuando se necesita energía, las cadenas de ácidos grasos son liberadas de los triacilgliceroles y se fragmentan en unidades de dos carbonos. Estas unidades de dos carbonos son idénticas a las que derivan de la fragmentación de la glucosa y, como se describe posteriormente en este capítulo, entran en las mismas rutas metabólicas productoras de energía. Los triacilgliceroles actúan de reserva concentrada de alimento en las células, ya que se pueden degradar produciendo una cantidad de energía útil por gramo hasta seis veces mayor que la cantidad de energía que produce la degradación de la glucosa.

Los ácidos grasos y sus derivados, como los triacilgliceroles, son ejemplos de **lípidos**. Este tipo de moléculas biológicas es una colección poco definida de moléculas insolubles en agua, mientras que son solubles en grasa y disolventes orgánicos como el benceno. Los lípidos se caracterizan por tener largas cadenas hidrocarbonadas, como en los ácidos grasos e *isoprenos*, o varios anillos unidos entre sí como en los *esteroides*.

La función más importante de los ácidos grasos en las células es la construcción de las membranas celulares. Estas delgadas láminas rodean toda la célula y recubren sus orgánulos internos. Están formadas en gran parte por *fosfolípidos*, pequeñas moléculas que, como los

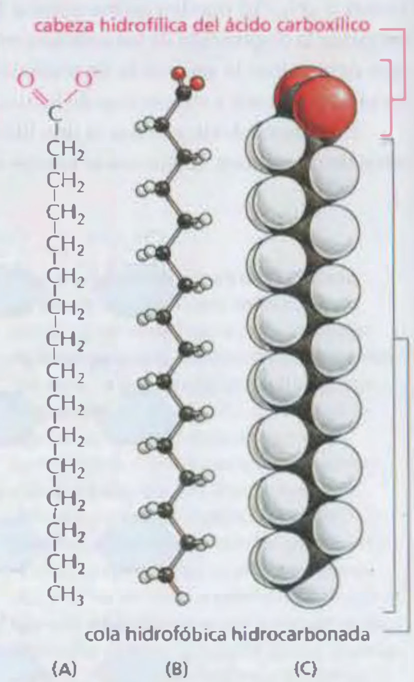


Figura 2–21 Un ácido graso. Un ácido graso se compone de una cadena hidrocarbonada hidrofóbica que se une a un grupo ácido carboxílico hidrofílico. En la figura se muestra el ácido palmítico. Los diferentes tipos de ácidos grasos tienen diferentes colas hidrocarbonadas. (A) Fórmula estructural. El grupo del ácido carboxílico se representa en su forma ionizada. (B) Modelo de bolas y varillas. (C) Modelo de espacio lleno.

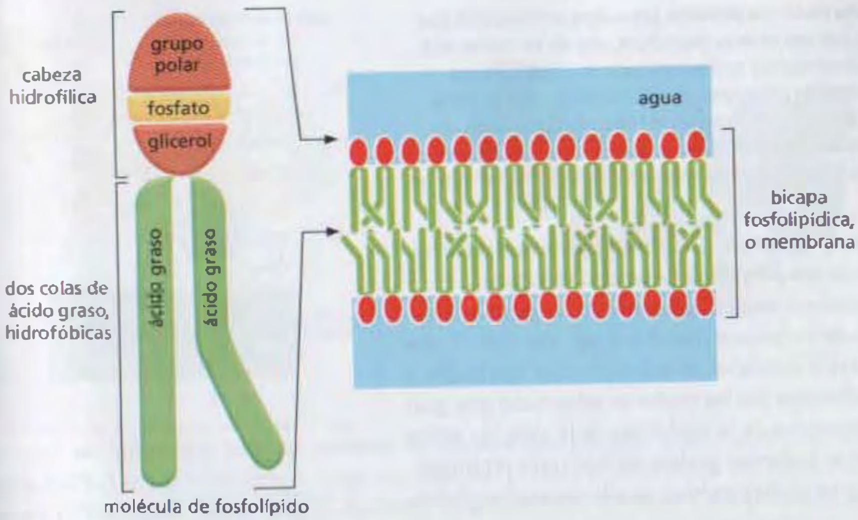


Figura 2–22 Estructura fosfolipídica y orientación de los fosfolípidos en las membranas. Situadas en un entorno acuoso las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos se empaquetan entre sí excluyendo el agua. En este caso han formado una bicapa con las cabezas hidrofílicas de los fosfolípidos orientadas hacia el agua. Las bicapas lipídicas son la base de las membranas celulares, como se describe en detalle en el Capítulo 10.

triacilgliceroles, están construidas principalmente a partir de ácidos grasos y de glicerol. Sin embargo, en los fosfolípidos el glicerol no está unido a tres cadenas de ácidos grasos –como en los triacilgliceroles– sino a dos. El "tercer" sitio del glicerol está unido a un grupo fosfato hidrofílico, que a su vez se une a un pequeño compuesto hidrofílico, como la colina (véase Panel 2–5). Por lo tanto, cada molécula de fosfolípido tiene una cola hidrofóbica compuesta por las dos cadenas de ácidos grasos, y una cabeza hidrofílica, en la que se localiza el fosfato. Esto les confiere unas propiedades físicas y químicas diferentes a las de los triacilgliceroles, que son predominantemente hidrofóbicos. Las moléculas como los fosfolípidos, con regiones hidrofóbicas e hidrofílicas, se denominan *anfifílicas*.

La facultad de los fosfolípidos de formar membranas es el resultado de su naturaleza anfifílica. Los fosfolípidos se extienden sobre la superficie del agua, formando una monocapa de moléculas de fosfolípidos, con las colas hidrofóbicas orientadas hacia el aire y las cabezas hidrofílicas en contacto con el agua. En el agua, dos de dichas capas pueden combinarse entre sí enfrentando sus colas, formando un sándwich de fosfolípidos o **bicapa lipídica**. Dicha bicapa es la base estructural de las membranas celulares (**Figura 2–22**).

Los aminoácidos son las subunidades de las proteínas

Los aminoácidos son una clase heterogénea de moléculas que tienen una propiedad característica: presentan un grupo ácido carboxilo y un grupo amino, ambos unidos a un mismo carbono llamado carbono α (**Figura 2–23**). Los aminoácidos se diferencian entre sí por su cadena lateral, que también está unida al carbono α. La importancia de los aminoácidos para la célula se debe a que forman las **proteínas**, polímeros formados por aminoácidos que se unen cabeza-cola, dando lugar a largas cadenas que luego se pliegan en una estructura tridimensional característica para cada uno de los tipos de proteína. La unión covalente entre dos aminoácidos adyacentes en una cadena proteica forman una amida (véase el Panel 2–1) y se conoce como enlace **peptídico**; la cadena de aminoácidos también se denomina *polipéptido* (**Figura 2–24**). Independientemente de los aminoácidos que lo componen, el polipéptido tiene un grupo amino (NH_2) en uno de sus extremos (su extremo *N-terminal*) y un

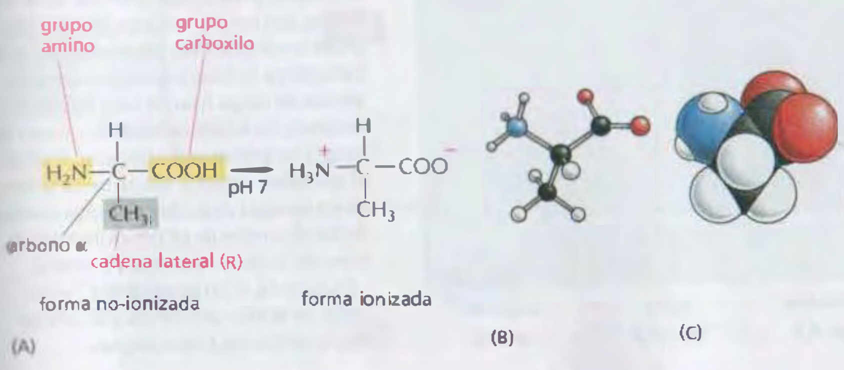
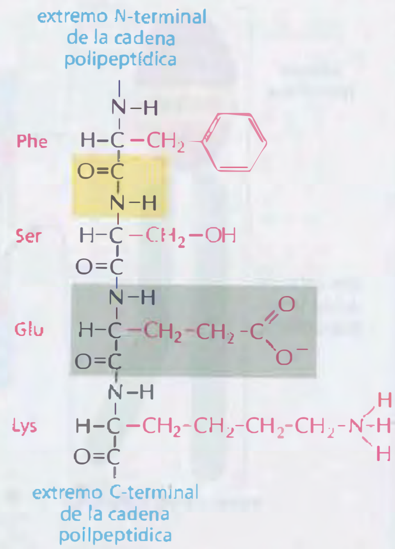


Figura 2–23 El aminoácido alanina. (A) En la célula, donde el pH es cercano a 7, el aminoácido libre está en su forma ionizada; pero cuando se incorpora a una cadena polipeptídica, las cargas en los grupos amino y carboxilo desaparecen. (B) Un modelo de bolas y varillas; (C) un modelo de espacio lleno (H, *blanco;* C, *negro;* O, *rojo;* N, *azul*).

Figura 2–24 Parte pequeña de una molécula proteica. Los cuatro aminoácidos que se muestran están unidos entre sí por tres enlaces peptídicos, uno de los cuales está marcado en *amarillo*. Uno de los aminoácidos está sombreado en *gris*. La cadena lateral de los aminoácidos se muestra en color *rojo*. Los dos extremos de la cadena polipeptídica son químicamente distintos. Un extremo, el N-terminal, acaba en un grupo amino, mientras que el otro, el C-terminal, es un grupo carboxilo. La secuencia se lee siempre a partir del extremo N-terminal; aquí esta secuencia es Phe-Ser-Glu-Lys.



grupo carboxilo (COOH) en el otro (su extremo *C-terminal*). Este hecho le da una direccionalidad definida o polaridad estructural (en contraposición a la polaridad eléctrica).

Cada uno de los 20 aminoácidos que se encuentran generalmente en las proteínas tiene una cadena lateral diferente unida al átomo del carbono α (Panel 3-1, pp. 128–129). Todos los organismos, sean bacterias, arqueas, plantas o animales, tienen proteínas fabricadas a partir de los mismos 20 aminoácidos. Las condiciones por las cuales se seleccionó este grupo de 20 aminoácidos constituye uno de los misterios de la evolución de la vida; no existe ninguna razón química evidente por la cual no se hubieran podido utilizar otros aminoácidos. Pero una vez la decisión estuvo tomada, no se podía cambiar; de ella dependían demasiadas cosas.

Como ocurre con los azúcares, los aminoácidos, excepto la glicina, existen como isómeros ópticos, con formas D y L (véase Panel 3–1). En las proteínas sólo se encuentran las formas L (sin embargo, en las paredes celulares bacterianas y en algunos antibióticos existen aminoácidos D). El origen de este uso exclusivo de aminoácidos L en la síntesis de proteínas es otro misterio evolutivo.

La versatilidad química que proporcionan los 20 aminoácidos es esencial para la función de las proteínas. Cinco de los 20 aminoácidos tienen cadenas laterales que pueden for-

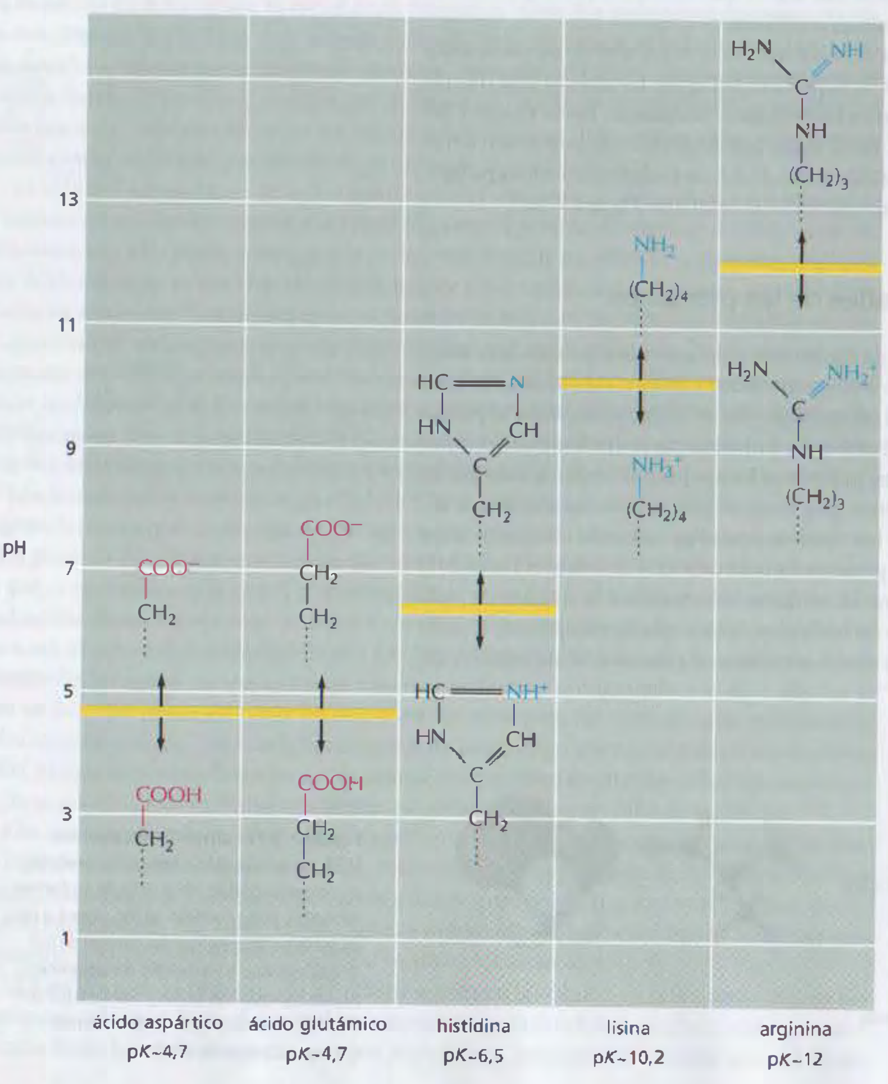


Figura 2-25 La carga de las cadenas laterales de los aminoácidos depende del pH. Se muestran las cinco cadenas laterales que pueden presentar carga. Los ácidos carboxílicos pierden fácilmente H^+ en solución acuosa y forman un ion de carga negativa que se indica mediante el sufijo "-ato", como por ejemplo aspart*ato* y glutam*ato*. Se produce una situación parecida en las aminas, que en solución acuosa absorben H^+ formando un ion de carga positiva (que no tiene un nombre especial). Estas reacciones son rápidamente reversibles, y la cantidad presente de las dos formas, con carga y sin carga, depende del pH de la solución. A un pH elevado, los ácidos carboxílicos tienden a estar cargados y las aminas sin carga. A un pH bajo sucede lo contrario, los ácidos carboxílicos carecen de carga y las aminas están cargadas. El pH en el que están cargados exactamente la *mitad* de los residuos de ácido carboxílico o amina, recibe el nombre de p*K* del aminoácido en cuestión (indicado por la raya *amarilla*).

En la célula, el pH es próximo a 7 y casi todos los ácidos carboxílicos y las aminas se encuentran en forma cargada.

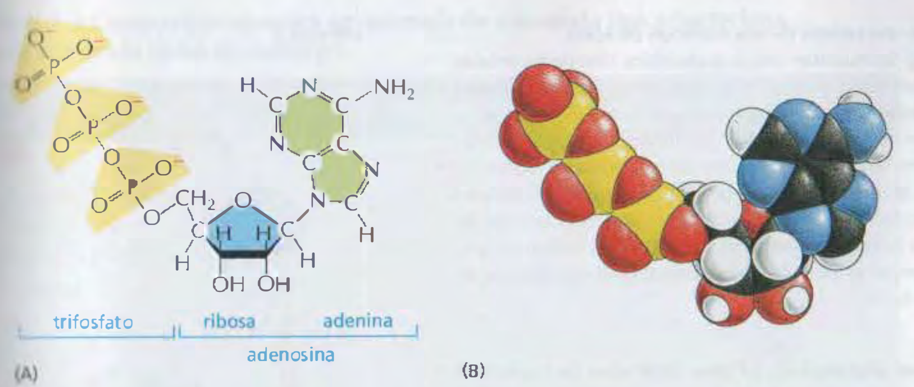


Figura 2–26 Estructura química del adenosina trifosfato (ATP). (A) Fórmula estructural. (B) Modelo espacial lleno. En (B) los colores que tienen los átomos son los siguientes: C, *negro*; N, *azul*; H, *blanco*; O, *rojo* y P, *amarillo*.

mar iones en soluciones acuosas neutras, de manera que pueden tener carga eléctrica (**Figura 2–25**). Los otros no tienen carga; algunos son polares e hidrofílicos y otros son no polares e hidrofóbicos (véase Panel 2–5). Como se analiza en el Capítulo 3, las propiedades de las cadenas laterales de los aminoácidos son el fundamento de las múltiples y sofisticadas funciones de las proteínas.

Los nucleótidos son las subunidades del DNA y del RNA

Un **nucleótido** es una molécula formada a partir de un compuesto cíclico nitrogenado unido a un azúcar de 5 carbonos, el cual se une a uno o más grupos fosfato (Panel 2–6, pp. 116–117). Los azúcares de cinco carbonos pueden ser la ribosa o la desoxirribosa. Los nucleótidos que contienen ribosa se denominan ribonucleótidos y los que contienen desoxirribosa se denominan desoxirribonucleótidos. Los anillos nitrogenados se llaman *bases* por razones históricas: bajo condiciones ácidas pueden unir un H^+ (protón) e incrementar así la concentración de iones OH^- en la solución acuosa. El parentesco familiar entre las diferentes bases es muy grande. La *citosina (C)*, la *timina (T)* y el *uracilo (U)* se llaman *pirimidinas* debido a que son compuestos derivados de un anillo pirimidínico hexagonal; la *guanina (G)* y la *adenina (A)* son *purinas* con un segundo anillo pentagonal unido al anillo hexagonal. Cada nucleótido lleva el nombre de la base que contiene (véase el Panel 2–6).

Los nucleótidos pueden actuar como transportadores a corto plazo de energía química. De entre todos ellos, el ribonucleótido **adenosina trifosfato** o **ATP** (**Figura 2–26**), transfiere energía en centenares de reacciones celulares. El ATP se forma a través de reacciones conducidas por la energía liberada en la disgregación oxidativa del alimento. Sus tres fosfatos están unidos en serie mediante dos *enlaces fosfoanhidro*, cuya rotura libera grandes cantidades de energía útil. En particular, el grupo fosfato terminal es separado con frecuencia de la molécula por hidrólisis, a menudo transfiriendo un fosfato a otras moléculas, y liberando

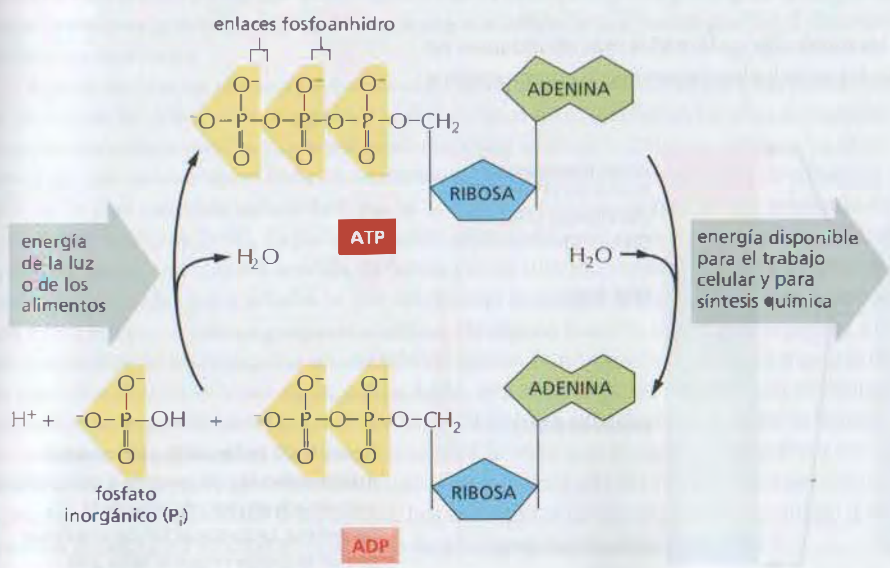
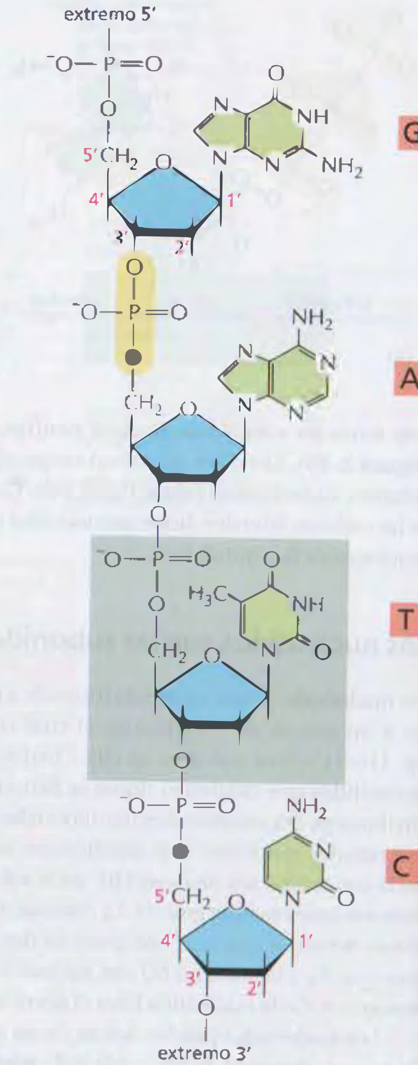


Figura 2–27 La molécula de ATP actúa como transportador de energía en las células. La formación de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico, que necesita energía, se acopla a las reacciones de oxidación de los alimentos productoras de energía (en las células animales, hongos y algunas bacterias) o de captación de energía luminosa (en las células vegetales y algunas bacterias). La hidrólisis de este ATP hasta ADP y fosfato inorgánico suministra la energía necesaria para impulsar muchas reacciones celulares.

Figura 2–28 Fragmento de una cadena de una molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA). Se muestran cuatro nucleótidos. Uno de los enlaces fosfodiéster, que une dos residuos de nucleótidos adyacentes, está sombreado en *amarillo*, y otro de los nucleótidos está sombreado en *gris*. Los nucleótidos se unen entre sí por una unión fosfodiéster entre determinados átomos de carbono de la ribosa, conocidos como átomos 5′ y 3′. Por esta razón, uno de los extremos de la cadena polinucleotídica, el *extremo 5′*, tendrá un grupo fosfato libre y el otro, el *extremo 3′*, tendrá un grupo hidroxilo libre. Generalmente, la secuencia lineal de nucleótidos de una cadena de polinucleótidos se abrevia por un código de una sola letra y la secuencia siempre se lee desde el extremo 5′. En el ejemplo que se muestra la secuencia es G–A–T–C.



energía que impulsa reacciones biosintéticas (**Figura 2–27**). Otros derivados de nucleótidos son transportadores de otros grupos químicos, como se describe más adelante.

Sin embargo, la función más fundamental de los nucleótidos en la célula es el almacenamiento y recuperación de la información biológica. Los nucleótidos son los elementos fundamentales para la construcción de los *ácidos nucleicos* –largos polímeros en los que las subunidades de nucleótidos están unidas covalentemente entre sí mediante **enlaces fosfodiéster** entre el grupo fosfato unido al azúcar de un nucleótido y un grupo hidroxilo del azúcar del siguiente nucleótido (**Figura 2–28**). Las cadenas de ácidos nucleicos se sintetizan a partir de nucleósidos trifosfato ricos en energía mediante una reacción de condensación que libera fosfato inorgánico durante la formación del enlace fosfodiéster.

Existen dos tipos principales de ácidos nucleicos, en función del tipo de azúcar de su esqueleto azúcar-fosfato. Los que tienen el azúcar *ribosa* se conocen como **ácidos ribonucleicos**, o **RNA**, y normalmente contienen las bases A, G, C y U. Los que tienen el azúcar *desoxirribosa* (en la que el hidroxilo de la posición 2′ del anillo carbonado de la ribosa está reemplazado por un hidrógeno) se conocen como **ácidos desoxirribonucleicos**, o **DNA**, y contienen las bases A, G, C y T (la T es químicamente similar al U del RNA, aunque contiene un grupo metil en su anillo pirimidínico; véase el Panel 2-6). Habitualmente el RNA se encuentra en las células en forma de una sola hebra polinucleotídica, mientras que el DNA se presenta casi siempre en forma de una molécula de doble hebra –una doble hélice de DNA compuesta por dos cadenas polinucleotídicas que corren en sentido antiparalelo una respecto a la otra y que se mantienen unidas entre sí por enlaces de hidrógeno entre las bases de las dos cadenas.

La secuencia lineal de los nucleótidos en el DNA y en el RNA codifica la información genética de la célula. La capacidad de las bases de las distintas moléculas de ácidos nucleicos para reconocerse y aparearse entre sí por medio de enlaces de hidrógeno (lo cual se denomina *apareamiento de bases*: G con C; A con T o U) es la base de la herencia y de la evolución; se explicará más adelante en el Capítulo 4.

La química celular está determinada por macromoléculas con propiedades sorprendentes

Por unidad de peso, las macromoléculas son las moléculas carbonadas más abundantes en las células vivas (**Figura 2–29** y **Tabla 2–3**). Son los principales elementos de construcción a

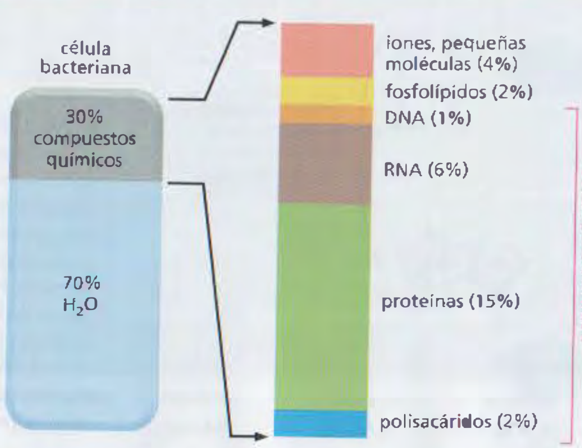


Figura 2–29 En las células hay muchas macromoléculas. Se muestra la composición aproximada en peso de una célula bacteriana. La composición de una célula animal es similar (véase la Tabla 2-3).

Tabla 2–3 Composición química aproximada de una célula típica bacteriana y de una célula típica de mamífero

COMPONENTE	PORCENTAJE DEL PESO TOTAL DE LA CÉLULA BACTERIA *E. COLI*	CÉLULA DE MAMÍFERO
H_2O	70	70
Iones inorgánicos (Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Cl^-, etc.)	1	1
Mezcla de pequeños metabolitos	3	3
Proteínas	15	18
RNA	6	1,1
DNA	1	0,25
Fosfolípidos	2	3
Otros lípidos	–	2
Polisacáridos	2	2
Volumen celular total	2×10^{-12} cm^3	4×10^{-9} cm^3
Volumen celular relativo	1	2000

Las proteínas, polisacáridos, DNA y RNA son macromoléculas. Los lípidos no se clasifican, en general, como macromoléculas aunque muestran algunas de sus características. Por ejemplo, la mayoría se sintetizan como polímeros lineales de pequeñas moléculas (el grupo acetilo del acetil CoA) y se asocian por sí mismas formando estructuras mayores (membranas). Obsérvese que el agua y las proteínas comprenden la mayor parte de la masa, tanto de la célula de mamífero como de la bacteriana.

partir de los cuales se edifica una célula y además son los componentes que confieren las propiedades más características de los seres vivos. En las células, las macromoléculas son polímeros construidos por la unión covalente de pequeñas moléculas orgánicas (llamadas *monómeros*) formando largas cadenas (**Figura 2–30**). No obstante, presentan propiedades sorprendentes que no se podrían predecir a partir de sus constituyentes básicos.

Las proteínas son especialmente abundantes y versátiles. Desempeñan miles de funciones distintas en las células. Muchas proteínas actúan como *enzimas*, los catalizadores que dirigen la mayor parte de reacciones que forman y destruyen los enlaces químicos que la célula necesita. Las enzimas catalizan todas las reacciones en las que las células obtienen energía a partir de las moléculas del alimento en los organismos fotosintéticos, por ejemplo, una enzima denominada ribulosa bisfosfato carboxilasa colabora en la transformación del CO_2 en azúcar y produce la mayor parte de la materia orgánica que necesita la vida en la Tierra. Otras proteínas se utilizan para construir componentes estructurales, como la tubulina, una proteína que se autoensambla formando los largos microtúbulos celulares, o las histonas, proteínas que compactan el DNA en cromosomas. Otras proteínas actúan incluso como motores moleculares produciendo fuerza y movimiento, como es el caso de la miosina del músculo. Las proteínas también desempeñan otras muchas funciones; más adelante, analizaremos la base molecular de muchas de ellas. Por el momento identifiquemos algunos de los principios generales de la química de macromoléculas que hacen posible el desarrollo de estas funciones.

A pesar de que las reacciones químicas de adición de subunidades para los polímeros de proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos difieren en el detalle, todas ellas comparten importantes características. Cada polímero crece por la adición de un monómero en el extremo de una cadena polimérica en crecimiento, por medio de una *reacción de condensación*, en la cual por cada subunidad que se agrega a la cadena, se pierde una molécula de agua (véase la Figura 2–19). La polimerización de monómeros, paso a paso, formando una larga cadena, es una manera sencilla de confeccionar una molécula compleja y de gran tamaño, dado que las subunidades se van añadiendo mediante la misma reacción, repetida una y otra vez por el mismo grupo de enzimas. De alguna manera, el proceso se parece a la labor repetitiva de una máquina en una fábrica menos en un aspecto crucial. La mayoría de las macromoléculas, excepto algún polisacárido, se forman a partir de un grupo de monómeros ligeramente diferentes entre sí, como los 20 aminoácidos distintos a partir de los cuales se forman las proteínas. Resulta crítico para la vida que la cadena polimérica no se ensamble al azar a partir de estas subunidades; por el contrario, las subunidades se unen siguiendo un orden particular o *secuencia*. Los elaborados mecanismos que permiten a las enzimas realizar esta función se describen detalladamente en los Capítulos 5 y 6.

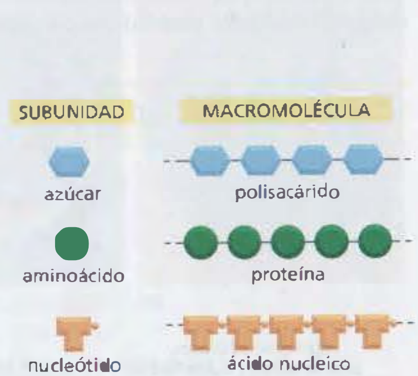


Figura 2–30 Las tres familias de macromoléculas. Cada una de ellas es un polímero formado a partir de pequeñas moléculas (llamadas monómeros) unidas entre sí por enlaces covalentes.



Figura 2–31 La mayoría de las proteínas y de muchas moléculas de RNA se pliegan en una sola conformación estable. Si los enlaces no-covalentes que mantienen esta conformación estable se rompen, la molécula se convierte en una cadena flexible que generalmente no tiene ningún valor biológico.

Los enlaces no-covalentes determinan la forma precisa de una macromolécula y su unión con otras moléculas

La mayoría de los enlaces covalentes de una macromolécula permiten la rotación de los átomos que unen, de manera que la cadena polimérica tiene una gran flexibilidad. En principio ello permite a una macromolécula adoptar un número casi ilimitado de formas o *conformaciones*, a medida que la energía térmica aleatoria hace que la cadena polimérica se retuerza y gire. Sin embargo, la forma de la mayoría de las macromoléculas biológicas está muy condicionada por múltiples *enlaces no-covalentes* más débiles, que se forman entre diferentes partes de la propia molécula. Si se forma un número suficiente de enlaces no-covalentes, la cadena polimérica adoptará una conformación particular, determinada por la secuencia lineal de los monómeros de su cadena. Así, la mayoría de las moléculas proteicas y muchas de las pequeñas moléculas de RNA que se encuentran en las células se pliegan apretadamente adoptando una conformación preferente (**Figura 2–31**).

Los cuatro tipos de interacciones no-covalentes importantes para las moléculas biológicas se han descrito con anterioridad en este mismo capítulo y se revisan en el Panel 2–3 (pp. 110–111). Aunque individualmente son muy débiles, estas interacciones cooperan plegando las macromoléculas biológicas en formas específicas únicas. Además, pueden sumarse dando lugar a una fuerte atracción entre dos moléculas distintas, cuando estas moléculas encajan estrechamente una con otra como una mano y un guante. Esta forma de interacción molecular es la causante de la gran especificidad en la unión de unas macromoléculas a otras moléculas: para que una unión sea fuerte, hace falta que se produzcan muchos contactos entre las dos moléculas que se unen, lo cual hace posible que una macromolécula seleccione –uniéndose a ellas– sólo una de entre los muchos miles de moléculas diferentes presentes en el interior de una célula. Más aún, debido a que la fuerza de la unión depende del número de enlaces no-covalentes que se formen, son posibles interacciones de cualquier afinidad que permite una rápida disociación si es necesario.

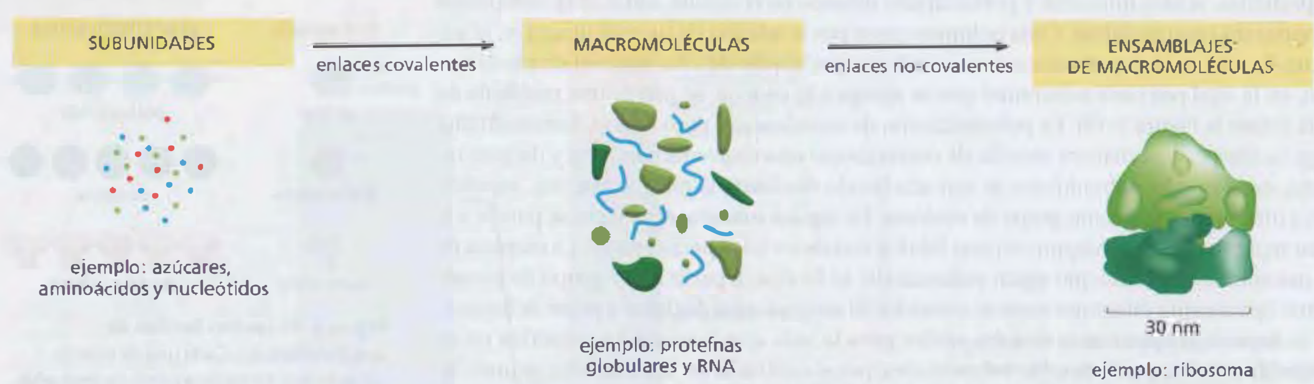


Figura 2–32 Pequeñas moléculas, proteínas y ribosomas dibujadas aproximadamente a escala. Los ribosomas son una parte importante de la maquinaria que la célula utiliza para sintetizar proteínas; cada ribosoma está formado por un complejo de cerca de 90 macromoléculas (proteínas y moléculas de RNA).

Este tipo de unión es la base de todas las catálisis biológicas, haciendo posible la función de las proteínas como enzimas. Las interacciones no-covalentes también permiten que las macromoléculas actúen como elementos fundamentales para la formación de estructuras mayores. En las células, las macromoléculas se unen entre sí formando complejos mayores, dando lugar a intrincadas maquinarias con múltiples partes móviles que llevan a cabo tareas tan importantes como la replicación del DNA y la síntesis proteica (**Figura 2-32**).

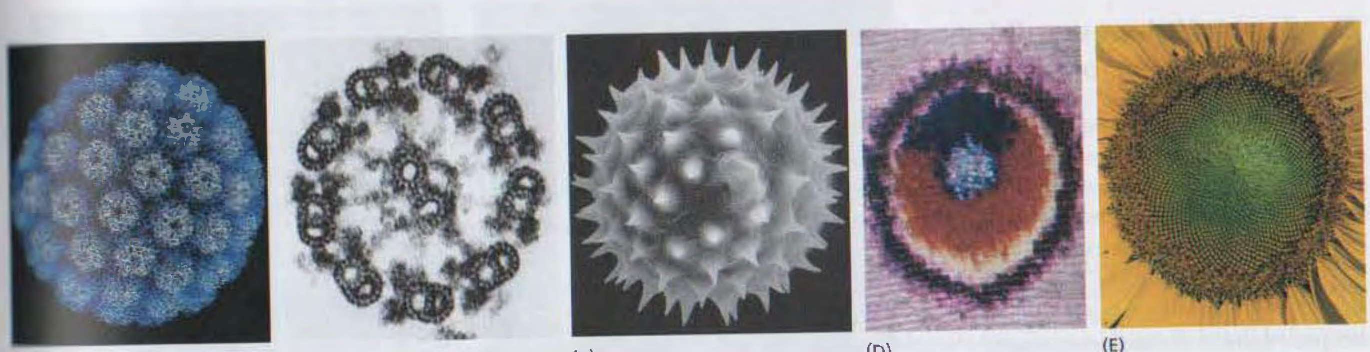
Resumen

Los organismos vivos son sistemas químicos autónomos que se autopropagan. Están compuestos por un conjunto característico y restringido de pequeñas moléculas basadas en el carbono, que son esencialmente las mismas para todas las especies vivientes. Cada una de estas moléculas está compuesta por una serie de átomos unidos unos a otros con una configuración precisa mediante enlaces covalentes. Las principales categorías son los azúcares, los ácidos grasos, los aminoácidos y los nucleótidos. Los azúcares constituyen la principal fuente de energía química para las células y son incorporados a polisacáridos para el almacenamiento de energía. Los ácidos grasos también son importantes para el almacenamiento de energía, pero su función primordial es la formación de membranas celulares. Los polímeros formados por aminoácidos constituyen las extraordinariamente diversas y versátiles macromoléculas conocidas como proteínas. Los nucleótidos tienen un papel principal en la transferencia de energía. También constituyen las subunidades de las macromoléculas de la información, el RNA y el DNA.

La mayor parte del peso seco de una célula está formado por macromoléculas que han sido producidas como polímeros lineales de aminoácidos (proteínas) o nucleótidos (DNA y RNA), unidos de manera covalente los unos a los otros siguiendo un orden exacto. La mayoría de las moléculas de las proteínas y muchos de los RNA se pliegan en una conformación específica que depende de la secuencia de sus subunidades. Este proceso de plegamiento genera superficies características y depende de un conjunto de atracciones débiles entre átomos producidas por fuerzas no-covalentes. Estas fuerzas son de cuatro tipos: atracciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, atracción de van der Waals e interacciones entre grupos apolares causadas por expulsión hidrofóbica del agua. El mismo conjunto de fuerzas débiles rige la unión específica de otras moléculas con macromoléculas, originando miles de asociaciones entre moléculas biológicas responsables de la estructura y de la química celular.

CATÁLISIS Y UTILIZACIÓN DE ENERGÍA POR LAS CÉLULAS

Por encima de todas las demás, una de las características de los seres vivos los hace casi milagrosamente diferentes de la materia inerte: son capaces de generar y mantener orden en un universo que siempre tiende a generar un desorden creciente (**Figura 2-33**). Para generar



(A) (B) (C) (D) (E)

Figura 2-33 Orden en las estructuras biológicas. En cada uno de los niveles de organización de los seres vivos se pueden encontrar bellas formas espaciales, vistosas y bien definidas. En orden de tamaño creciente: (A) moléculas de proteína de una cápsula vírica; (B) el ordenamiento regular de los microtúbulos de la cola de un espermatozoide, vistos en sección transversal; (C) ornamentaciones de la superficie de un grano de polen (una sola célula); (D) visión aumentada de un ala de mariposa mostrando la forma generada por las escamas, cada escama es el producto de una sola célula; (E) ordenamiento en espiral de semillas, formadas por millones de células en una flor de girasol. (A, cortesía de R.A. Grant y J.M. Hogle; B, cortesía de Lewis Tilney; C, cortesía de Colin MacFarlane y Chris Jeffree; D y E, cortesía de Kjell B. Sandved.)

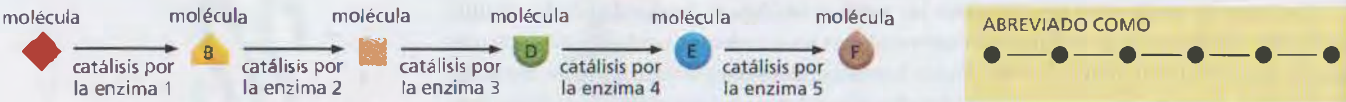


Figura 2–34 De qué forma un conjunto de reacciones catalizadas por enzimas da lugar a una vía metabólica. Cada enzima cataliza una reacción química particular que deja intacta la enzima. En este ejemplo, un conjunto de enzimas actuando en serie transforma la molécula A en la molécula F, formando una vía metabólica.

este orden, las células de un organismo vivo deben generar una corriente sin fin de reacciones químicas. En alguna de estas reacciones, pequeñas moléculas –aminoácidos, azúcares, nucleótidos y lípidos– son captadas o modificadas para suministrar la gran variedad de pequeñas moléculas que necesita la célula. En otras reacciones, estas pequeñas moléculas son utilizadas para construir una gama enormemente diversa de proteínas, ácidos nucleicos y otras macromoléculas, que dotan a los sistemas vivos de todas sus propiedades más características. Podemos imaginar que cada célula es una minúscula factoría química, que realiza varios millones de reacciones cada segundo.

Las enzimas organizan el metabolismo celular

Las reacciones químicas que llevan a cabo las células normalmente sólo se darían a temperaturas mucho más elevadas que las del interior de las células. Por esta razón, cada reacción necesita un estímulo específico de su reactividad química. Este requerimiento es crucial, puesto que permite que la célula controle cada una de las reacciones. El control se ejerce a través de proteínas especializadas denominadas *enzimas*, cada una de las cuales acelera, o *cataliza*, una de entre los diferentes tipos de reacciones que puede sufrir cada molécula. Normalmente, las reacciones catalizadas por enzimas están conectadas en serie, de modo que el producto de una reacción se convierte en material de partida, o *sustrato*, de la siguiente (**Figura 2–34**). Estas largas series de reacciones también están unidas a otras y forman un laberinto de reacciones interconectadas que permiten que la célula sobreviva, crezca y se reproduzca (**Figura 2–35**).

En la célula se dan dos corrientes opuestas de reacciones químicas. (1) Las vías *catabólicas* fragmentan las moléculas de alimentos en moléculas más pequeñas, generando así tanto una forma de energía utilizable por la célula como alguna de las pequeñas moléculas que la célula necesita como elementos de construcción. (2) Las vías *anabólicas*, o *biosintéticas*, utilizan la energía generada por el catabolismo para impulsar la síntesis de muchas otras moléculas que forman la célula. Estos dos tipos de reacciones constituyen el **metabolismo** de la célula (**Figura 2–36**).

Muchos de los detalles del metabolismo celular constituyen la materia tradicional de la *bioquímica* y se alejan del tema en cuestión. Sin embargo, los principios generales por los que las células obtienen energía a partir de su entorno y la utilizan para generar orden son básicos para la biología celular. Empezaremos con la explicación de por qué es necesario un aporte continuo de energía para sostener a los organismos vivos.

El orden biológico es posible gracias a que las células liberan energía en forma de calor

La tendencia universal de las cosas a generar desorden es una ley fundamental de la física –la *segunda ley de la termodinámica*– que plantea que en el universo, o en cualquier sistema aislado (un conjunto de materia que esté completamente aislada del resto del universo), el grado de desorden sólo aumenta. Esta ley tiene unas implicaciones para todos los seres vivos tan profundas, que es necesario considerarla desde diversos puntos de vista.

Por ejemplo, podemos presentar la segunda ley en términos de probabilidad y asumir que el sistema cambiará espontáneamente hacia aquellas modificaciones que tengan la mayor probabilidad. Si consideramos, por ejemplo, una caja con 100 monedas todas colocadas

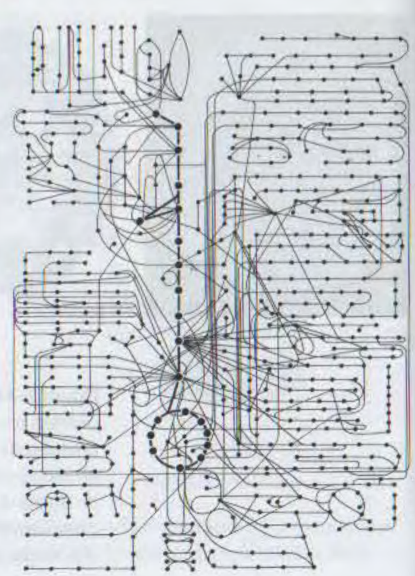


Figura 2–35 Algunas vías metabólicas y sus interconversiones en una célula típica. En el esquema se presentan cerca de 500 reacciones metabólicas comunes, de modo que cada molécula de una vía metabólica se representa por un círculo negro, como en el *recuadro amarillo* de la Figura 2-34. La vía que está destacada en este diagrama con círculos mayores y líneas de conexión más gruesas es la vía central del metabolismo de los azúcares, que describiremos más adelante.

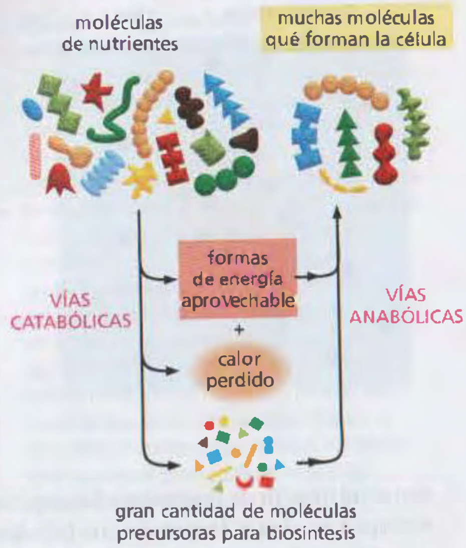


Figura 2–36 Representación esquemática de las relaciones entre las vías anabólicas y catabólicas en el metabolismo. La mayor parte de la energía almacenada en enlaces químicos de las moléculas de nutrientes se disipa en forma de calor, por lo que, como se sugiere aquí, la masa de nutrientes que necesita cualquier organismo que obtenga toda su energía del catabolismo, es mucho mayor que la masa de moléculas que se pueden producir por el anabolismo.

con la cara hacia arriba, una serie de accidentes que afecten a la caja tenderán a cambiar el orden hacia una mezcla de 50 caras y 50 cruces. La razón es simple: hay una enorme cantidad de combinaciones posibles de las monedas en la mezcla, que producirían el resultado 50-50, pero sólo existe una combinación posible que mantenga todas las monedas orientadas cara arriba. Por lo tanto, la combinación 50-50 es más probable, por lo que diremos que es más "desordenada". Por la misma razón, la experiencia diaria de cada uno de nosotros nos indica que el espacio en el que vivimos se desordena sin ningún esfuerzo intencionado: el desplazamiento hacia el desorden es un *proceso espontáneo*, que requiere un esfuerzo periódico para revertirlo (**Figura 2–37**).

La cantidad de desorden de un sistema se puede cuantificar y expresar como la **entropía** del sistema: cuanto mayor sea el desorden, mayor será la entropía. Así, otra vía para expresar la segunda ley de la termodinámica es decir que los sistemas cambiarán espontáneamente hacia distribuciones con mayor nivel de entropía.

Las células vivas –al sobrevivir, crecer y formar organismos complejos– generan orden, por lo que podría parecer que desafían la segunda ley de la termodinámica. ¿Cómo es posible? La respuesta es que una célula no es un sistema aislado: la célula toma la energía del medio en forma de alimento o en forma de fotones procedentes del sol (o incluso, en el caso de algunas bacterias quimiosintéticas, simplemente en forma de moléculas inorgánicas) y la utiliza para generar orden en su interior. En el curso de las reacciones químicas que generan orden, la célula transforma en calor parte de la energía que utiliza. El calor se libera al entorno celular, el cual se desordena, de modo que la entropía total–de la célula y del entorno que la rodea– aumenta, de acuerdo con las leyes de la termodinámica.

Para entender los principios que rigen estas transformaciones de energía, hay que imaginar una célula rodeada por un mar de materia que representa el resto del universo. La célula vive y crece, por lo que genera orden interno. Sin embargo, constantemente libera calor a medida que va sintetizando moléculas y las ensambla formando las estructuras celulares. El calor es energía en su forma más desordenada –la colisión aleatoria de moléculas. Cuando una célula libera energía al mar, incrementa en él la intensidad de los movimientos moleculares (movimientos térmicos) y, por tanto, la aleatoriedad, o desorden, del mar. La segunda ley de la termodinámica se cumple puesto que el incremento de la cantidad de or-



Figura 2–37 Una ilustración cotidiana de la tendencia espontánea hacia el desorden. El revertir esta tendencia hacia el desorden requiere un esfuerzo intencionado y un gasto de energía: no es un proceso espontáneo. En efecto, a partir de la segunda ley de la termodinámica, podemos estar seguros de que la intervención humana necesaria liberará una cantidad de calor hacia el ambiente suficiente para compensar de manera sobrada la reordenación de los objetos de la habitación.

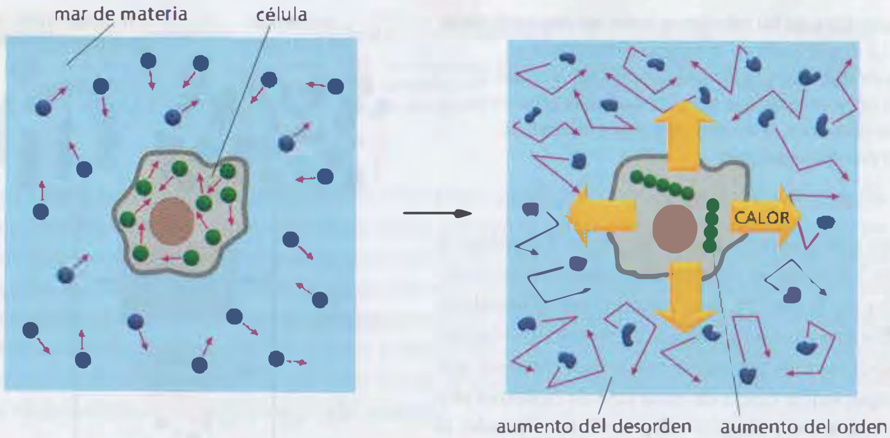


Figura 2–38 Un análisis termodinámico sencillo de una célula viva. En el esquema de la izquierda tanto las moléculas de la célula como las del universo (el mar de materia) están representadas en un estado relativamente desordenado. En el esquema de la derecha la célula ha tomado energía de las moléculas del alimento y ha liberado calor por una reacción que ordena las moléculas del interior de la célula. El calor incrementa el desorden en el medio que rodea la célula (representado por las *flechas sesgadas* y las moléculas deformadas, que indican aumentos de los movimientos moleculares causador por el calor), por lo que cuando la célula crece y se divide se cumple la segunda ley de la termodinámica, según la cual la cantidad de desorden en el universo siempre aumenta. Para un análisis más detallado véase Panel 2-7 (pp. 118-119).

den en el interior de la célula está compensado por un descenso del orden (incremento de entropía) en el mar de materia que la rodea, todavía mayor (**Figura 2–38**).

¿De dónde procede el calor que libera la célula? Aquí hemos de tener en cuenta otra importante ley de la termodinámica. La *primera ley de la termodinámica* afirma que la energía puede ser transformada de una forma a otra, pero que no puede ser ni creada ni destruida. En la **Figura 2–39** se ilustran algunas interconversiones entre formas de energía. La cantidad de energía en formas diferentes cambia como resultado de las reacciones químicas del interior celular, pero la primera ley nos dice que la cantidad total de energía tiene que ser siempre la misma. Por ejemplo, una célula animal capta alimentos y transforma parte de la energía presente en los enlaces químicos que hay entre los átomos de estas moléculas de alimentos (energía de unión química) en movimiento térmico aleatorio de moléculas (energía calorífica). Como describimos más adelante, esta transformación de energía química en energía calorífica es esencial para que las reacciones que generan orden dentro de la célula sean la causa de que el universo en su conjunto sea más desordenado.

La célula no puede obtener ningún beneficio de la energía calorífica que libera, a menos que las reacciones generadoras de calor de la célula estén acopladas directamente con procesos que generan orden molecular. Esta fuerte *vinculación* entre la producción de calor y el incremento del orden es lo que distingue el metabolismo de una célula del derroche que representa quemar un combustible en una llama. Más adelante ilustraremos cómo tiene lugar este acoplamiento. Por ahora es suficiente reconocer que para que las células generen y mantengan un orden interno en un universo que tiende al caos, se requiere la unión directa de la "combustión" de moléculas de alimento con la generación de orden biológico.

Los organismos fotosintéticos utilizan la luz del sol para sintetizar moléculas orgánicas

Todos los animales viven de la energía almacenada en los enlaces químicos de las moléculas orgánicas elaboradas por otros organismos que ingieren como alimento. Las moléculas de los alimentos también contienen los átomos que los animales necesitan para construir nueva materia viva. Algunos animales obtienen su alimento devorando a otros animales. Pero en la base de la cadena trófica están los animales que ingieren plantas. Las plantas, a su vez, captan la energía directamente de la luz solar. Como resultado de ello, el sol es la fuente última de toda la energía utilizada por las células animales.

La energía solar entra en el mundo vivo a través de la **fotosíntesis** de las plantas y de las bacterias fotosintéticas. La fotosíntesis transforma la energía electromagnética del sol en energía de enlace químico dentro de la célula. Las plantas obtienen todos los átomos que necesitan a partir de fuentes inorgánicas: el carbono del dióxido de carbono atmosférico, el hidrógeno y el oxígeno del agua, el nitrógeno del amoniaco, los nitratos del suelo y los demás elementos necesarios en menores cantidades, de las sales minerales del suelo. Las plantas utilizan la energía que obtienen de la luz solar para transformar estos átomos en azúcares, aminoácidos, nucleótidos y ácidos grasos. Estas pequeñas moléculas son transformadas, a su vez, en las proteínas, los ácidos nucleicos, los polisacáridos y los lípidos que forman la planta. Si posteriormente las plantas son devoradas, todas estas sustancias se utilizan como moléculas alimenticias para los animales.

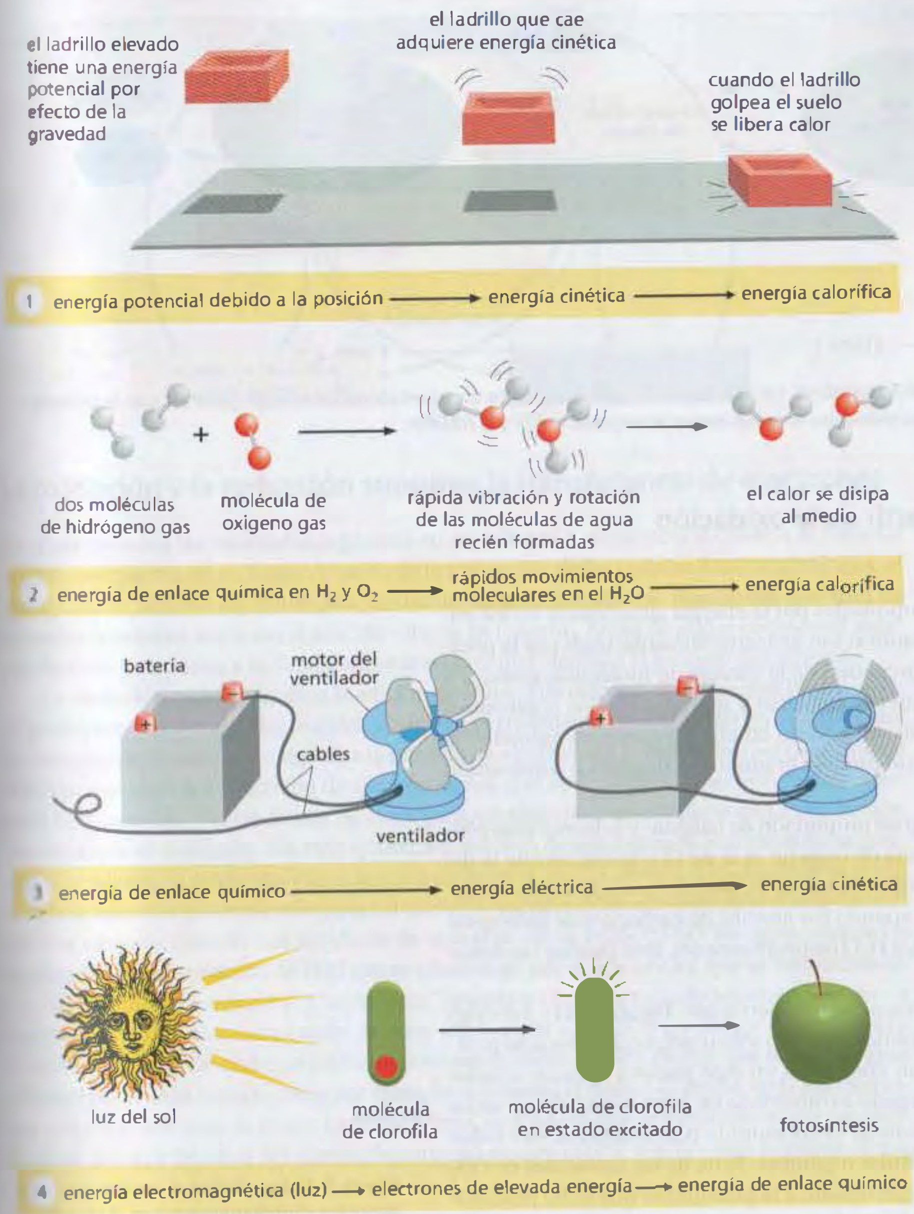


Figura 2-39 Algunas interconversiones entre las diferentes formas de energía. Todas las formas de energía son, en principio, interconvertibles. En todos estos procesos la cantidad total de energía se conserva; así, por ejemplo, a partir de la altura y peso del ladrillo de (1) podemos predecir exactamente qué cantidad de calor será liberada cuando el ladrillo golpee en el suelo. En (2) hay que destacar que cuando se forma agua, una gran cantidad de la energía química de enlace liberada se transforma inicialmente en movimientos térmicos muy rápidos en las dos nuevas moléculas de agua; pero las colisiones con otras moléculas disipan casi instantáneamente esta energía cinética al ambiente (transferencia de calor), haciendo que las nuevas moléculas no se puedan diferenciar de las otras.

Las reacciones de la fotosíntesis se producen en dos etapas (**Figura 2-40**). En la primera etapa, la energía procedente de la luz solar es captada y almacenada transitoriamente como energía de enlace químico en unas pequeñas moléculas especializadas que actúan como transportadores de energía y como grupos químicos reactivos. (Más adelante describiremos estas moléculas transportadoras activadas.) El oxígeno molecular (O_2 gas), derivado de la escisión del agua por la luz, es liberado como producto de desecho de esta primera etapa.

En la segunda etapa, las moléculas que actúan como transportadoras de energía se utilizan para dirigir el proceso de *fijación del carbono*, en el cual se sintetizan azúcares a partir de dióxido de carbono gaseoso (CO_2) y de agua (H_2O), generando así una fuente útil de energía de enlace químico y de materiales, tanto para la planta como para los animales que la ingieran. En el Capítulo 14 se describe el elegante mecanismo por el que se producen las dos etapas de la fotosíntesis.

El resultado neto del proceso completo de la fotosíntesis, al menos en lo que se refiere a plantas verdes, puede resumirse sencillamente en la ecuación

$$\text{energía luminosa} + CO_2 + H_2O \rightarrow \text{azúcares} + O_2 + \text{energía calorífica}$$

Los azúcares producidos son utilizados como fuente de energía de enlace químico y como fuente de materiales para formar muchas moléculas, pequeñas y grandes, que son esenciales para la célula de la planta.

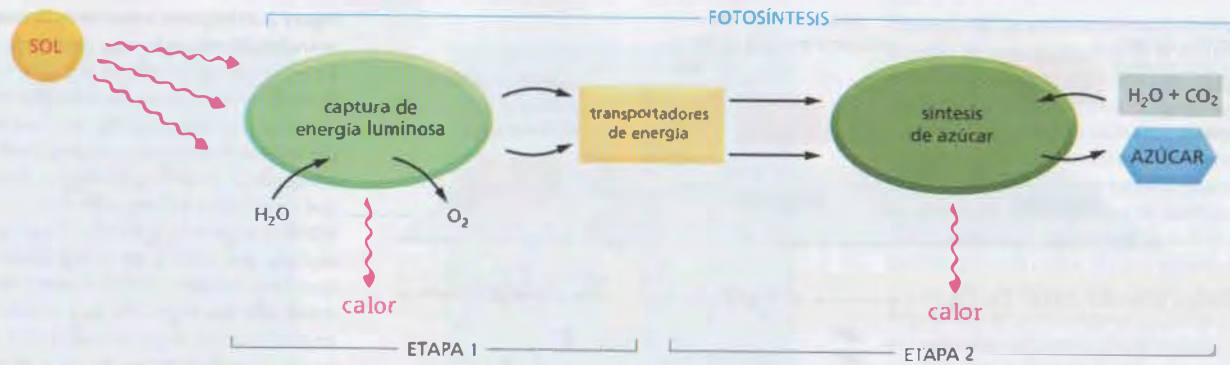


Figura 2–40 Fotosíntesis. Las dos fases de la fotosíntesis. Los transportadores de energía generados en la primera fase son dos moléculas que trataremos enseguida: el ATP y el NADPH.

Las células obtienen energía a partir de la oxidación de las moléculas orgánicas

Todas las células animales y vegetales son impulsadas por la energía almacenada en los enlaces químicos de las moléculas orgánicas, tanto si son azúcares fotosintetizads por la planta como alimento para sí misma, como si proceden de la mezcla de moléculas grandes y pequeñas ingeridas por un animal. Para poder vivir, crecer y reproducirse los organismos deben extraer esta energía de una forma utilizable. Tanto en plantas como en animales, la energía se extrae de las moléculas mediante un proceso gradual de oxidación o combustión controlada.

La atmósfera de la Tierra contiene una gran proporción de oxígeno y la forma energéticamente más estable del carbono en presencia de oxígeno es la de CO_2 mientras que la del hidrógeno es la de H_2O. Por lo tanto, una célula será capaz de obtener energía de los azúcares y de otras moléculas orgánicas siempre y cuando sus átomos de carbono y de hidrógeno se combinen con el oxígeno y produzcan CO_2 y H_2O respectivamente. Este proceso se denomina **respiración**.

La fotosíntesis y la respiración son procesos complementarios (**Figura 2-41**). Esto significa que las transacciones entre plantas y animales no son sólo unidireccionales. Las plantas, los animales y los microorganismos han coexistido en este planeta durante mucho tiempo, de modo que muchos de ellos han llegado a convertirse en parte esencial del medio de los otros. El oxígeno liberado por la fotosíntesis es consumido prácticamente por todos los organismos en la combustión de las moléculas orgánicas. Parte de las moléculas de CO_2 que hoy están fijadas en las moléculas orgánicas debido a la fotosíntesis que se ha producido en una hoja verde, fueron liberadas ayer a la atmósfera por la respiración de un animal o por la descomposición de materia orgánica realizada por hongos o bacterias. Por lo tanto, podemos ver que la utilización del carbono genera un importante ciclo que implica a la *biosfera* (todos los organismos vivos de la tierra) en su conjunto y que traspasa las fronteras entre los organismos individuales (**Figura 2-42**). De modo similar, los átomos de nitrógeno, fósforo y azufre se desplazan entre el mundo vivo y el mundo inerte a través de ciclos que implican a las plantas, los animales, los hongos y las bacterias.

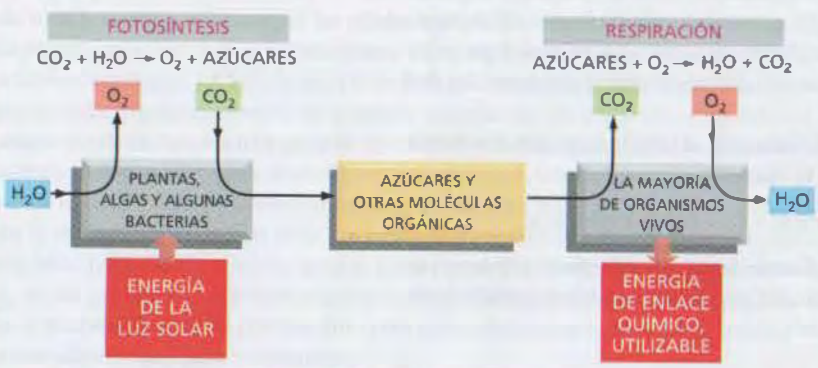


Figura 2–41 Fotosíntesis y respiración como procesos complementarios en el mundo vivo. La fotosíntesis utiliza la energía de la luz solar para producir azúcares y otros tipos de moléculas orgánicas. A su vez, estas moléculas se utilizan como alimento por otros organismos. Muchos de estos organismos realizan el proceso de la respiración, que utiliza O_2 para formar CO_2 a partir de los mismos átomos de carbono que habían sido captados como CO_2 y transformados en azúcares por la fotosíntesis. En el proceso, los organismos que respiran obtienen la energía química de enlace que necesitan para sobrevivir. Parece ser que las células más primitivas de la Tierra no tuvieron la capacidad de realizar ni la fotosíntesis ni la respiración (véase Capítulo 14). Sin embargo, en la Tierra la fotosíntesis tiene que haber precedido a la respiración puesto que hay evidencias de que fueron necesarios miles de millones de años de fotosíntesis para que se liberase una cantidad de O_2 suficiente para generar una atmósfera rica en este gas. (Ahora la atmósfera de la Tierra contiene un 20% de O_2.)

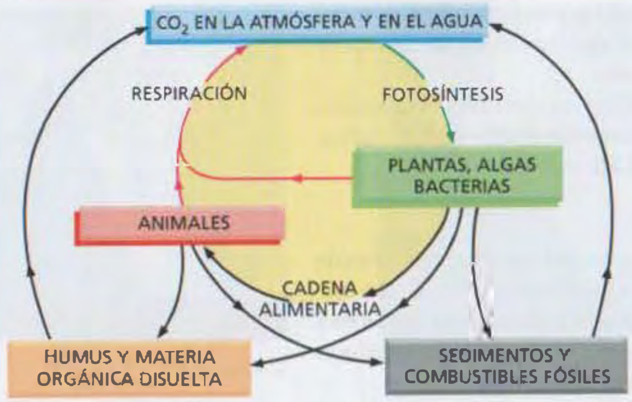


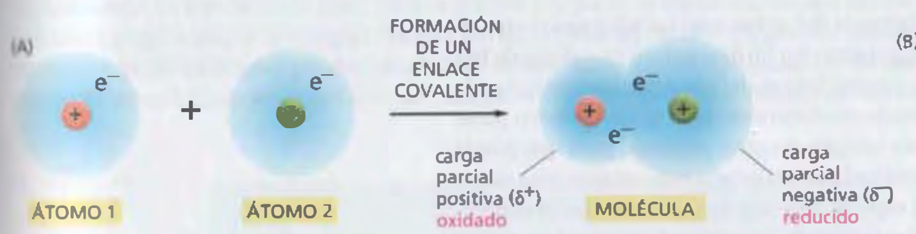
Figura 2-42 El ciclo del carbono. Cada átomo de carbono se incorpora a las moléculas orgánicas del mundo vivo gracias a la actividad fotosintética de las bacterias y de las plantas (incluidas las algas). Luego pasan a los animales, a los microorganismos y al material orgánico del suelo y de los océanos, a través de vías cíclicas. Cuando las moléculas orgánicas son oxidadas por las células o quemadas por el hombre en forma de combustibles fósiles, el CO_2 vuelve a la atmósfera.

La oxidación y la reducción suponen la transferencia de electrones

La célula no oxida las moléculas orgánicas en un solo paso, como ocurre cuando el material orgánico se quema en un fuego. A través de la utilización de los catalizadores enzimáticos, el metabolismo procesa las moléculas mediante un gran número de reacciones que sólo en contadas ocasiones suponen la adición directa de oxígeno. Antes de poder considerar algunas de estas reacciones y su finalidad, se analizará qué significa el proceso de oxidación.

La **oxidación** no sólo significa la adición de átomos de oxígeno, sino que más bien se aplica genéricamente a cualquier reacción en la que se transfieren electrones de un átomo a otro. En este sentido, la oxidación significa la pérdida de electrones y la **reducción** -el contrario de la oxidación- significa la adición de electrones. Así, si el Fe^{2+} pierde un electrón y se convierte en Fe^{3+}, se oxida, y si un átomo de cloro gana un electrón y se convierte en Cl^-, se reduce. Debido a que en cualquier reacción química el número de electrones se mantiene (ni se pierden ni se ganan), la oxidación y la reducción siempre se producen simultáneamente: es decir, si en una reacción una molécula gana un electrón (se reduce), otra molécula lo pierde (se oxida). Por ejemplo, cuando una molécula de azúcar se oxida a CO_2 y H_2O, las moléculas de O_2 implicadas en la formación de H_2O ganan electrones, por lo que se dice que se han reducido.

Los términos "oxidación" y "reducción" se aplican incluso cuando solamente se da un cambio parcial de electrones entre átomos unidos por un enlace covalente (**Figura 2-43**). Cuando un átomo de carbono está unido covalentemente a otro átomo que tiene una gran afinidad por los electrones, como por ejemplo el oxígeno, el cloro o el azufre, cede los electrones que comparte más de lo que correspondería, de manera que se forma un enlace covalente *polar*: la carga positiva del núcleo de carbono es algo mayor que la carga negativa de sus



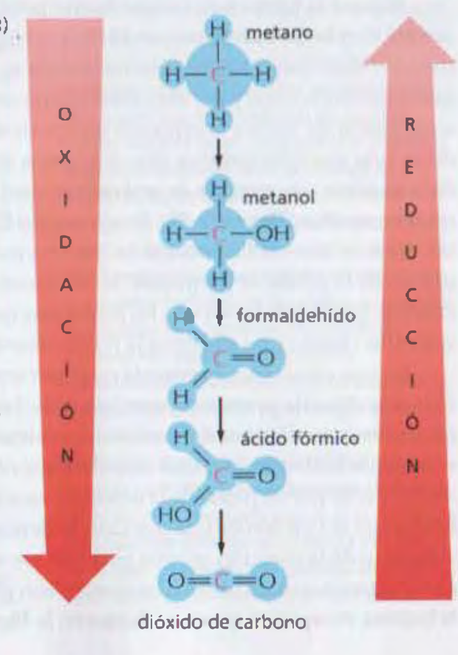


Figura 2-43 Oxidación y reducción. (A) Cuando dos átomos forman un enlace covalente *polar* (véase página 50), se dice que el átomo que acaba con una mayor cantidad de electrones compartidos se ha reducido, mientras que el otro átomo que ha adquirido una menor cantidad de electrones compartidos se ha oxidado. El átomo reducido adquiere una carga parcial negativa (δ^-), ya que la carga positiva del núcleo atómico está más que compensada por la carga total de los electrones que lo envuelven. En contraposición, el átomo oxidado adquiere una carga parcial positiva (δ^+). (B) El único átomo de carbono del metano se puede transformar en el carbono del dióxido de carbono a través de reemplazamientos sucesivos de los hidrógenos a los que está unido covalentemente por átomos de oxígeno. En cada etapa, los electrones se van alejando del carbono (como se indica con el sombreado *azul*) de forma que el carbono se oxida progresivamente. Cada una de las etapas es favorable energéticamente en las condiciones presentes en el interior de la célula.

electrones, por lo que el átomo adquiere una carga parcial positiva y está oxidado. Contrariamente, un átomo de carbono que forme una unión C–H capta algo más de lo que correspondería los electrones que comparte y está reducido (Figura 2–43).

Generalmente, cuando una molécula de una célula capta un electrón (e^-) al mismo tiempo capta un protón (H^+) (los protones son fácilmente asequibles en un medio acuoso). El efecto neto en este caso es añadir un átomo de hidrógeno a la molécula

$$A + e^- + H^+ \rightarrow AH$$

Aunque no sólo esté implicado un electrón, sino un electrón y un protón, estas reacciones de *hidrogenación* son reducciones, y a la inversa, las reacciones de *deshidrogenación*, son oxidaciones. Por lo tanto, resulta especialmente sencillo decir si una molécula orgánica se está oxidando o reduciendo: cuando aumenta el número de enlaces C–H, la molécula se reduce; cuando disminuye el número de enlaces C–H, se oxida (véase Figura 2–43B).

Las células utilizan las enzimas para catalizar la oxidación de las moléculas orgánicas en etapas breves, a través de una secuencia de reacciones que permita aprovechar la energía utilizable. Por tanto, ahora explicaremos cómo actúan las enzimas y algunas de las restricciones bajo las que actúan.

Las enzimas disminuyen las barreras que bloquean las reacciones químicas

Consideremos la reacción

$$\text{papel} + O_2 \rightarrow \text{humo} + \text{cenizas} + \text{calor} + CO_2 + H_2O$$

El papel arde fácilmente, liberando a la atmósfera energía en forma de calor, y agua y dióxido de carbono como gases, pero el humo y las cenizas nunca recobrarán espontáneamente aquella entidad a partir de la atmósfera calentada y se reconstituirán formando papel. Cuando el papel arde, su energía química se disipa en forma de calor, aunque no desaparece del universo, puesto que la energía ni se crea ni se destruye, sino que se dispersa de forma irrecuperable en los movimientos caóticos y desordenados de las moléculas. Al mismo tiempo, los átomos de las moléculas de papel quedan dispersos y desordenados. En el lenguaje de la termodinámica, se ha producido una pérdida de *energía libre*, es decir, la energía que puede ser aprovechada para realizar trabajo o reacciones químicas. Esta pérdida refleja una pérdida del orden en el que la energía y las moléculas estaban dispuestas en el papel. Deberíamos tratar con más detalle el tema de la energía libre brevemente, pero el principio general es claro e intuitivo: las reacciones químicas sólo se dan en la dirección que permite una pérdida de energía libre; en otras palabras, cualquier reacción se produce de forma espontánea en la dirección que transcurre "cuesta abajo". En este sentido, una reacción "cuesta abajo" se conoce como *energéticamente favorable*.

Aunque la forma más favorable energéticamente del carbono en condiciones normales sea el CO_2 y la del hidrógeno sea el H_2O, un organismo vivo no desaparece en volutas de humo ni el libro que tienes en las manos arde en llamas. Esto es debido a que las moléculas de los organismos vivos y del libro están en un estado relativamente estable y no pueden pasar a un estado de menor energía sin un aporte de energía: en otras palabras, para que pueda darse una reacción química que deje a una molécula en un estado más estable, esta molécula requiere una **energía de activación** –una especie de "empujón" por encima de una barrera energética (**Figura 2–44**). En el caso del libro ardiendo, la energía de activación procede del calor de una cerilla encendida. Para las moléculas que se hallan en solución acuosa, como las de la célula, el "empujón" lo suministran las colisiones aleatorias inusuales ricas en energía, que se producen con las moléculas que las rodean; estas colisiones llegan a ser más violentas cuanto más aumenta la temperatura.

En una célula viva, la energía extra por encima de la barrera la proporciona en gran medida una clase de proteínas especializadas: las **enzimas.** Cada enzima se une fuertemente a una o varias moléculas, denominadas **sustratos**, y las mantiene en una situación tal que la energía de activación de una reacción química determinada se reduce notablemente, de modo que se puede producir la unión de los sustratos. Una sustancia que puede disminuir la energía de activación de una reacción se denomina **catalizador**; el catalizador incrementa la velocidad de la reacción porque permite que se produzca una mayor proporción de colisiones aleatorias con las moléculas que rodean al sustrato, las cuales hacen que éste sobrepase la barrera energética, como se ilustra en la **Figura 2–45**. Las enzimas son unos de los catali-

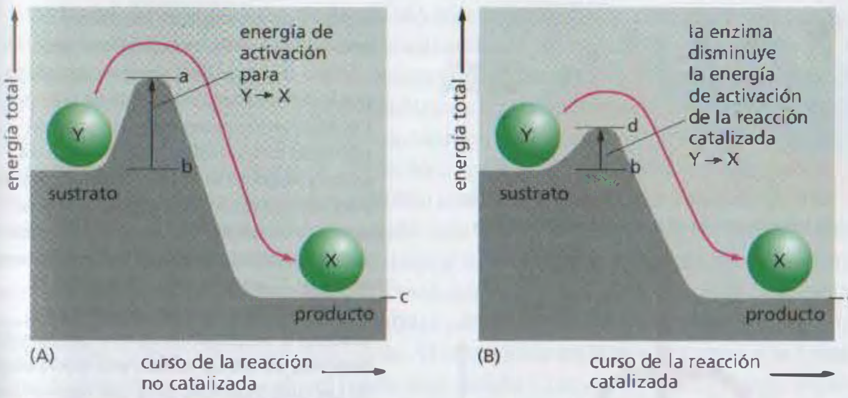


Figura 2–44 El importante principio de la energía de activación. (A) El compuesto Y (un sustrato) está en un estado relativamente estable; se necesita energía para que se transforme en el compuesto X (un producto), a pesar de que X tiene un nivel de energía menor que Y. Por lo tanto, esta transformación no tendrá lugar a menos que el compuesto Y pueda adquirir suficiente cantidad de energía de activación (*energía a menos energía b*) de su entorno para cursar la reacción que lo transforme en el compuesto X. Esta energía puede proceder de una colisión extraordinariamente energética con otras moléculas. Para la reacción inversa, X → Y, la energía de activación será mucho mayor (*energía a menos energía c*); por lo tanto, esta reacción se dará con mucha menos frecuencia. Las energías de activación siempre son positivas; sin embargo, la variación total de energía de la reacción energéticamente favorable Y → X es *energía c menos energía b*, un número negativo. (B) Las energías de activación para determinadas reacciones pueden disminuir por el efecto de catalizadores, como indica la línea *d*. Las enzimas son catalizadores especialmente efectivos porque disminuyen notablemente la energía de activación de las reacciones que catalizan.

zadores más eficientes que se conocen, capaces de acelerar las reacciones por un factor de 10^{14}, o más. De esta forma, permiten que se produzcan reacciones que normalmente no se darían rápidamente a temperaturas normales.

Las enzimas también son muy selectivas. Habitualmente cada enzima cataliza una sola reacción particular: en otras palabras, disminuye selectivamente la energía de activación de una sola de las reacciones posibles que puede sufrir la molécula de sustrato que se ha unido a la enzima. De esta forma, las enzimas dirigen a cada una de las muchas moléculas de la célula a través de vías específicas (**Figura 2–46**).

El éxito de los organismos vivos se puede atribuir a la capacidad de la célula para fabricar enzimas de diversos tipos, cada una de las cuales tiene unas propiedades específicas. Cada enzima tiene una forma característica, que contiene un *lugar activo*, un bolsillo o ranura de la enzima dentro del cual sólo encajan los sustratos específicos (**Figura 2–47**). Como en el caso de otros catalizadores, las moléculas de la enzima permanecen inalteradas después de participar en la reacción y, por lo tanto, pueden continuar actuando indefinidamente. En el Capítulo 3 describiremos con más detalle cómo funcionan las enzimas.

De qué forma las enzimas encuentran a sus sustratos: la enorme velocidad de los movimientos moleculares

Una enzima a menudo cataliza la transformación de alrededor de un millar de moléculas de sustrato por segundo. Esto significa que tiene que ser capaz de unirse a una nueva molécula de sustrato en nna fracción de milisegundo. Pero en la célula, tanto las enzimas como sus sustratos están presentes en un número relativamente pequeño. ¿Cómo se encuentran tan rápidamente? La rápida unión entre ellos es posible porque en el ámbito molecular los movimientos originados por la energía calorífica son enormemente rápidos. En general, los movimientos de las moléculas pueden clasificarse en tres tipos: (1) el desplazamiento de una molécula de un lugar a otro (*movimiento traslacional*), (2) el rápido movimiento de vaivén

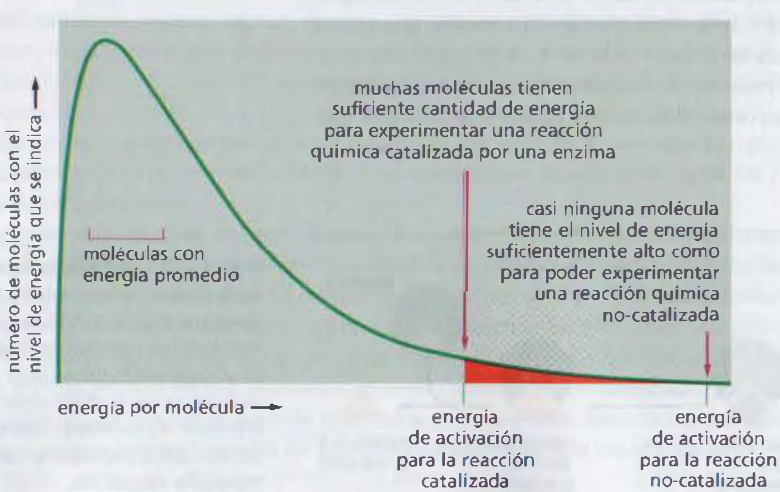


Figura 2–45 Al disminuir la energía de activación, aumenta enormemente la probabilidad de reacción. En un momento dado una población de moléculas idénticas de sustrato tienen un rango de energías que se distribuyen como se muestra en el gráfico. Las variaciones de energía proceden de colisiones con las moléculas del ambiente, que hacen que las moléculas de sustrato salten, vibren y giren. Para que una molécula reaccione químicamente, la energía de la molécula ha de exceder la barrera de la energía de activación para dicha reacción; para la mayor parte de las reacciones biológicas, esto nunca sucede sin la catálisis enzimática. Incluso con la catálisis enzimática, para poder reaccionar las moléculas de sustrato han de sufrir una colisión particularmente energética (*área sombreada en rojo*). El incremento de la temperatura también puede aumentar el número de moléculas que tienen una cantidad de energía suficiente para sobrepasar la energía de activación necesaria para que se produzca una reacción determinada; pero a diferencia de lo que ocurre con una catálisis enzimática, este efecto es no-selectivo, ya que activa todas las reacciones.

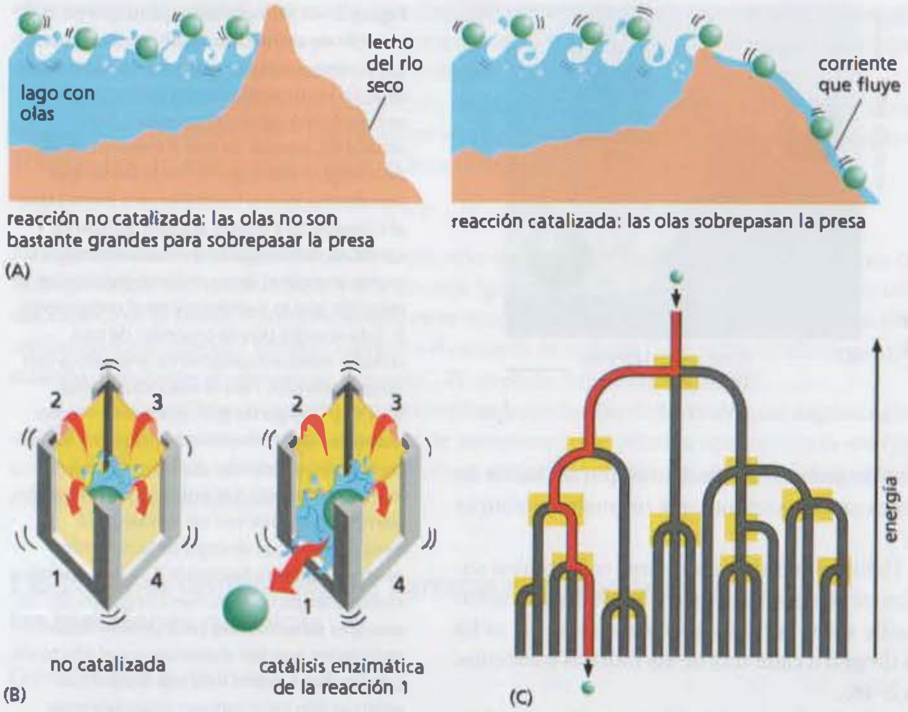


Figura 2-46 Analogía de la catálisis enzimática mediante bolas flotantes. <TAAA> (A) La catálisis viene representada por la disminución de la altura de la presa. Las *bolas verdes* representan un sustrato potencial (compuesto Y) que se desplaza arriba y abajo en su nivel energético debido a los constantes impulsos de las olas (una analogía de los bombardeos térmicos que sufre el sustrato por las moléculas adyacentes de agua). Cuando la presa (la energía de activación) disminuye lo suficiente, se produce el desplazamiento energéticamente favorable de la bola (el sustrato) ladera abajo. (B) Las cuatro paredes de la caja representan las barreras de energía de activación de cuatro reacciones químicas, todas ellas energéticamente favorables, ya que los productos tienen un nivel energético menor que los sustratos. En la caja de la *izquierda*, no se produce ninguna de las reacciones, ya que ni las olas más altas llegan a sobrepasar ninguna de las barreras energéticas. En la caja de la *derecha*, la catálisis enzimática disminuye la energía de activación únicamente de la reacción 1; ahora los empujones de las olas permiten el paso de la molécula por encima de esta barrera energética induciendo que la reacción 1 se lleve a cabo. (C) Un río con afluentes con un juego de presas (*rectángulos amarillos*) ilustra como una serie de reacciones catalizadas por enzimas determinan la vía exacta que sigue cada molécula en la célula.

de los átomos unidos de manera covalente respecto el uno del otro (vibraciones) y (3) rotaciones. Todos estos movimientos ayudan a que las superficies de moléculas que interactúan se acerquen unas a otras.

Las velocidades de los movimientos moleculares pueden medirse por distintas técnicas de espectroscopia. Una proteína globular grande está en movimiento constante y gira alrededor de su eje cerca de un millón de veces por segundo. Las moléculas están también en continuo movimiento traslacional, lo que las lleva a explorar el espacio intracelular de manera muy eficiente. Este proceso se denomina **difusión**. De esta forma, cada molécula de una célula colisiona con una enorme cantidad de moléculas cada segundo. Las moléculas de una solución colisionan y son rechazadas las unas de las otras, por lo que cada molécula se desplaza primero en una dirección y luego en otra; el desplazamiento describe una *trayectoria aleatoria* (**Figura 2–48**). En un desplazamiento de este tipo la distancia neta promedio que recorre cada molécula (como el vuelo de un pájaro) desde el punto de inicio es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo empleado: es decir, si una molécula se desplaza 1 μm en 1 segundo, para desplazarse 2 μn invertirá 4 segundos, 9 segundos para desplazarse 3 μm, 100 segundos para desplazarse 10 μm, y así sucesivamente.

El interior de una célula tiene una densidad muy elevada (**Figura 2–49**). Sin embargo, en experimentos en que se han inyectado colorantes fluorescentes u otras moléculas marcadas dentro de las células, se ha comprobado que las moléculas orgánicas pequeñas difunden a través del gel acuoso del citoplasma casi tan rápidamente como lo hacen a través del agua. Por ejemplo, una pequeña molécula orgánica sólo invierte, por término medio, una quinta parte de segundo para difundir a una distancia de 10 μm. Por lo tanto, la difusión es una ruta eficiente para que las moléculas pequeñas recorran las limitadas distancias intracelulares necesarias para el desarrollo de las reacciolnes (una célula animal típica mide 15 μm de diámetro).

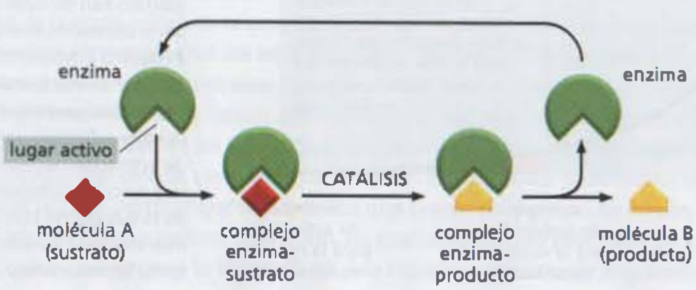


Figura 2-47 Cómo funcionan las enzimas. Cada enzima tiene un lugar activo al que se unen una o varias moléculas de *sustrato*, formando un complejo enzima-sustrato. En el lugar activo tienen lugar una reacción y se produce un complejo enzima-producto. Entonces, el *producto* es liberado y hace posible que la enzima una más moléculas de sustrato.

En las células, las enzimas se desplazan más lentamente que los sustratos, por lo que podemos imaginar como si estuviesen tranquilamente "sentadas". La velocidad de encuentro de cada molécula de enzima con su sustrato dependerá de la concentración de la molécula de sustrato. Por ejemplo, algunos sustratos abundantes están a concentraciones de 0,5 mM. Puesto que el agua pura tiene una concentración de 5,5 M, en la célula sólo hay una molécula de este sustrato por cada 10^5 moléculas de agua. Sin embargo, el lugar activo de una molécula de enzima que une su sustrato será bombardeado por cerca de 500.000 colisiones aleatorias con la molécula de sustrato cada segundo (para una concentración diez veces menor, el número de colisiones disminuye a 50.000 por segundo, y así sucesivamente en todos los casos). Generalmente, un encuentro aleatorio entre la superficie de la enzima y la superficie análoga de su molécula de sustrato permite la formación inmediata de un complejo enzima-sustrato listo para reaccionar. Una reacción en la que se rompa o se forme un enlace covalente puede darse de un modo muy rápido. Cuando se aprecia la gran velocidad a la que se desplazan y reaccionan las moléculas, las velocidades que se observan de catálisis enzimática no parecen tan asombrosas.

Cuando la enzima y el sustrato han colisionado y éste se ha unido adecuadamente en el centro activo, entre ambos se forman muchos enlaces débiles, que persisten hasta que el movimiento térmico aleatorio hace que las moléculas se disocien otra vez. En general, cuanto más fuerte es la unión entre el sustrato y la enzima, más lenta es su velocidad de disociación. Sin embargo, cuando dos moléculas que colisionan presentan poca analogía en sus superficies, forman pocos enlaces no-covalentes y su energía total es despreciable comparada con la del movimiento térmico. En este caso, las dos moléculas se disocian tan rápidamente como se han unido impidiendo que se formen asociaciones incorrectas entre moléculas no análogas, tales como entre una enzima y un sustrato equivocado.

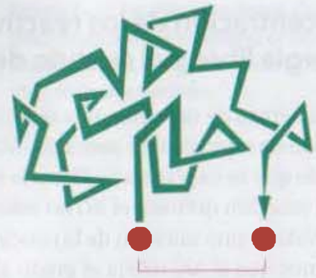


Figura 2–48 Una ruta aleatoria. <GGTA> En solución, las moléculas se desplazan de forma aleatoria debido a los golpes que reciben en las continuas colisiones con otras moléculas. Este desplazamiento singular permite a las moléculas pequeñas difundir rápidamente de una parte a otra de la célula, como se describe en el texto.

La variación de energía libre de una reacción determina si esta reacción puede tener lugar

Ahora hemos de desviarnos brevemente del tema e introducir algunos fundamentos de química. Las células son sistemas químicos que deben obedecer las leyes físicas y químicas. Las enzimas aceleran las reacciones pero no pueden forzar que se produzcan reacciones energéticamente desfavorables. En términos de la analogía con el agua, las enzimas no pueden hacer que el agua fluya cuesta arriba. Las células, sin embargo, tienen que hacer lo que sea necesario para crecer y dividirse: deben construir moléculas complejas, ordenadas y ricas en energía, a partir de otras más pequeñas y sencillas. Veremos que esto se lleva a cabo por medio de enzimas que *acoplan* directamente reacciones energéticamente favorables, que liberan energía y producen calor, a reacciones energéticamente desfavorables, que producen orden biológico.

Antes de examinar cómo tiene lugar este acoplamiento, hemos de considerar con más cuidado el término "energéticamente favorable". De acuerdo con la segunda ley de la termodinámica, una reacción química puede producirse espontáneamente sólo si de ella se deriva un incremento neto del desorden del universo (véase Figura 2–38). El criterio para indicar un incremento del desorden del universo se puede expresar de una forma más conveniente en términos de una cantidad denominada la **energía libre**, *G*, de un sistema. El valor de *G* sólo tiene interés cuando un sistema sufre un *cambio*, y el cambio de *G*, denominado Δ*G* (delta *G*), es decisivo. Supongamos que el sistema a considerar es una colección de moléculas. Como se explica en el Panel 2–7 (pp. 118–119) al definir la energía libre, Δ*G* mide la cantidad de desorden que se genera en el universo cuando tiene lugar una reacción que implica a dichas moléculas. Las *reacciones energéticamente favorables*, por definición, son aquellas que disminuyen la energía libre del sistema, o dicho de otro modo, que tienen un *ΔG negativo* y generan desorden (**Figura 2–50**).

Un ejemplo de una reacción energéticamente favorable a escala macroscópica es la "reacción" por la que un muelle comprimido se relaja a un estado expandido y libera la energía elástica almacenada en forma de calor al ambiente; un ejemplo a escala microscópica sería la disolución de sal común en agua. Contrariamente, las *reacciones energéticamente desfavorables*, que tienen un *ΔG positivo* –como la unión de dos aminoácidos formando un enlace peptídico– por sí mismas generan orden en el universo. Por tanto, estas reacciones sólo pueden darse si están acopladas a una segunda reacción que tenga un Δ*G* tan negativo que provoque que el Δ*G* total del proceso completo sea al final negativo (**Figura 2–51**).



Figura 2–49 La estructura del citoplasma. El esquema aproximadamente a escala destaca el abigarramiento del citoplasma. Sólo se muestran las macromoléculas: los RNA se muestran en *azul*, los ribosomas en *verde* y las proteínas en *rojo*. Las enzimas y otras macromoléculas difunden de modo relativamente lento por el citoplasma, en parte debido a que interaccionan con otras muchas macromoléculas; por el contrario, las moléculas pequeñas difunden casi tan rápidamente como lo hacen en el agua. (Adaptado de D.S. Goodsell, *Trends Biochem. Sci.* 16: 203-206, 1991. Con la autorización de Elsevier.)

La concentración de los reactivos influye sobre la variación de energía libre y el sentido de la reacción

Como acabamos de describir, una reacción $Y \rightleftharpoons X$ se producirá en el sentido $Y \rightarrow X$ cuando la variación de energía libre asociada, ΔG, sea negativa, como ocurre en el caso de un muelle tensado que se deja relajar y libera la energía almacenada hacia el entorno. Sin embargo, para una reacción química el ΔG no sólo depende de la energía almacenada en cada molécula individual, sino también de la concentración de las moléculas en la mezcla de reacción. Recordemos que el ΔG refleja el grado al cual una reacción genera un estado del universo más desordenado, es decir, más probable. En nuestra analogía de las monedas, es muy probable que el número de caras disminuya si en la caja hay 90 caras y 10 cruces, pero es menos probable si la caja contiene 10 caras y 90 cruces.

Esto mismo es cierto para una reacción química. En el caso de una reacción química $Y \rightleftharpoons X$, un gran exceso de Y respecto a X tiende a dirigir la reacción en el sentido $Y \rightarrow X$, es decir, habrá una tendencia a que haya más cantidad de moléculas que sufren la transformación $Y \rightarrow X$ que de moléculas que sufren la transformación $X \rightarrow Y$. Si la relación entre Y y X aumenta, el valor de ΔG se vuelve más negativo para la transición $Y \rightarrow X$ (y más positivo para la transición $X \rightarrow Y$).

¿Qué diferencia de concentración es necesaria para compensar un descenso dado de la energía de enlace químico (y de la consiguiente liberación de calor)? La respuesta no es intuitivamente obvia, pero se puede determinar a partir de un análisis termodinámico que haga posible separar la parte de la variación de energía libre que es dependiente de concentración de la que es independiente de concentración. El ΔG para una reacción determinada puede describirse como la suma de dos partes: la primera, denominada ***variación de energía libre estándar*, $\Delta G°$**, depende de las características intrínsecas de las moléculas reaccionantes; la segunda depende de sus concentraciones. Para la reacción $Y \rightarrow X$ a 37 °C,

$$\Delta G = \Delta G° + 0{,}616 \ln \frac{[X]}{[Y]} = \Delta G° + 1{,}42 \log \frac{[X]}{[Y]}$$

donde ΔG se expresa en kilocalorías por mol, [Y] y [X] representan las concentraciones de Y y de X, ln es el logaritmo neperiano y la constante 0,616 es igual a RT (el producto de la constante de los gases R y la temperatura absoluta, T).

Nótese que ΔG es igual a $\Delta G°$ cuando las concentraciones molares de Y y de X son iguales ($\log 1 = 0$). Como era de esperar, ΔG se hace más negativo cuanto menor es la relación entre X e Y (el log de un número <1 es negativo).

El análisis de la reacción anterior revela que el ΔG se hace igual a $\Delta G°$ cuando las concentraciones de Y y de X son iguales. Pero a medida que se va produciendo la reacción favorable $Y \rightarrow X$, la concentración del producto X aumentará y la concentración del sustrato Y disminuirá. Estas variaciones de las concentraciones relativas hará que la relación [X]/[Y] aumente claramente, haciendo que el ΔG, inicialmente favorable, se haga cada vez menos negativo. Por último cuando el $\Delta G = 0$, se llegará a un **equilibrio** químico; en este momento, el efecto de la concentración contrarresta exactamente el empuje dado a la reacción por $\Delta G°$ y la relación entre el sustrato y el producto se mantiene constante (**Figura 2-52**).

¿Durante cuánto tiempo debe producirse una reacción hasta alcanzar el equilibrio? Para resolver esta cuestión hemos de introducir el concepto de la **constante de equilibrio**, K. El valor de K es diferente para reacciones diferentes y refleja la relación entre el producto y el sustrato en el equilibrio. Para la reacción $Y \rightarrow X$:

$$K = \frac{[X]}{[Y]}$$

La ecuación que relaciona ΔG y la relación [X]/[Y] nos permite relacionar directamente $\Delta G°$ con K. Como que en el equilibrio $\Delta G = 0$, en este punto las concentraciones de Y y de X deben ser tales que

$$\Delta G° = -1{,}42 \log \frac{[X]}{[Y]} \quad \text{o} \quad \Delta G° = -1{,}42 \log K$$

Utilizando esta última ecuación podemos ver que la relación entre X e Y en el equilibrio (expresada en forma de constante de equilibrio, K) depende del carácter intrínseco de las mo-

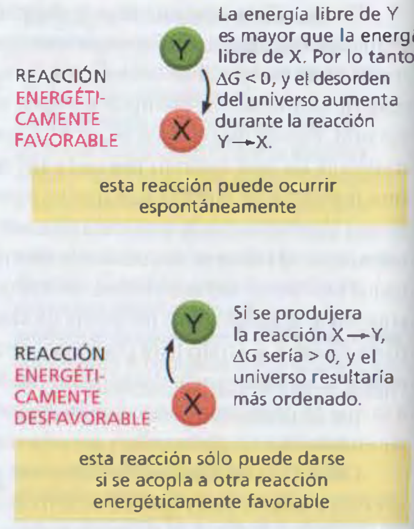


Figura 2-50 Diferencia entre reacciones energéticamente favorables y desfavorables.

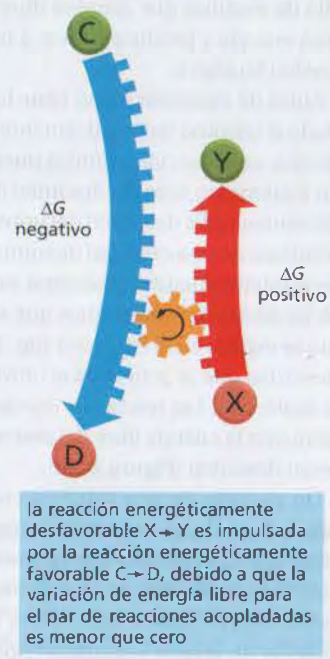


Figura 2-51 Una reacción acoplada puede impulsar una reacción energéticamente desfavorable.

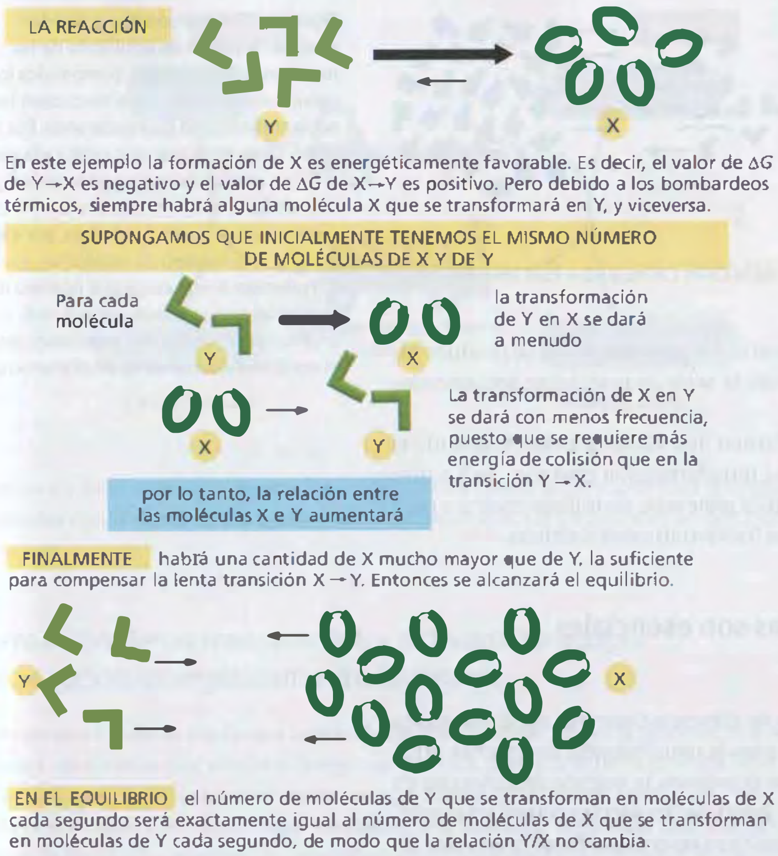


Figura 2–52 Equilibrio químico. Cuando una reacción alcanza el equilibrio, el flujo de las moléculas reaccionantes en un sentido y en otro, es igual y opuesto.

léculas expresado en el valor de $\Delta G°$ (**Tabla 2–4**). Nótese que por cada variación de energía libre a 37 °C de 1,4 kcal/mol (5,9 kJ/mol), la constante de equilibrio varía en un factor de 10.

Cuando una enzima (o cualquier catalizador) disminuye la energía de activación de la reacción Y → X, también disminuye la energía de activación para la reacción X → Y exactamente en la misma magnitud (véase Figura 2–44). Por lo tanto, las enzimas aceleran las reacciones en un sentido igual que en sentido contrario, de forma que el punto de equilibrio de la reacción (y su $\Delta G°$) no varía (**Figura 2–53**).

En el caso de reacciones secuenciales, los valores de $\Delta G°$ son aditivos

Podemos prever cuantitativamente el curso de la mayor parte de las reacciones de un modo cuantitativo. Se han registrado una gran cantidad de datos termodinámicos que permiten calcular la variación de energía libre estándar, $\Delta G°$, de la mayor parte de las reacciones celulares más importantes. El conjunto de la variación de la energía libre de una vía metabólica es sencillamente la suma de las variaciones de energía libre de cada uno de sus pasos. Por ejemplo, si consideramos dos reacciones secuenciales

$$X \rightarrow Y \quad \text{e} \quad Y \rightarrow Z$$

cuyos valores de $\Delta G°$ son +5 y −13 kcal/mol, respectivamente (un mol equivale a 6×10^{23} moléculas de una sustancia). Si estas dos reacciones se dan secuencialmente, el $\Delta G°$ para la reacción acoplada será de −8 kcal/mol. Así, la reacción desfavorable X → Y, que no se daría espontáneamente, se puede producir gracias a la reacción favorable Y → Z, siempre que esta segunda reacción siga a la primera.

Por lo tanto, las células pueden hacer que se produzca la transición energéticamente desfavorable X → Y, si una enzima que cataliza la reacción X → Y se suplementa con una segunda enzima que cataliza la reacción energéticamente *favorable* Y → Z. En efecto, la reacción Y → Z actuará como un "sifón" impulsando la transformación de una molécula X en una molécula Y y después en una molécula Z (**Figura 2–54**). Por ejemplo, varias de las reacciones que forman parte de la larga vía que transforma azúcares en CO_2 y H_2O serían ener-

Tabla 2–4 Relación entre la variación de energía libre, $\Delta G°$, y la constante de equilibrio

CONSTANTE EQUILIBRIO $\frac{[X]}{[Y]} = K$	ENERGÍA LIBRE DE X MENOS ENERGÍA LIBRE DE Y kcal/mol (kJ/mol)
10^5	−7,1 (−29,7)
10^4	−5,7 (−23,8)
10^3	−4,3 (−18,0)
10^2	−2,8 (−11,7)
10^1	−1,4 (−5,9)
1	0 (0)
10	1,4 (5,9)
10^{-2}	2,8 (11,7)
10^{-3}	4,3 (18,0)
10^{-4}	5,7 (23,8)
10^{-5}	7,1 (29,7)

Los valores de la constante de equilibrio se calcularon para la reacción química sencilla Y ⇌ X utilizando la ecuación dada.

El valor de $\Delta G°$ se expresa en kilocalorías por mol a 37 °C, y en kilojoules por mol entre paréntesis (1 kilocaloría es igual a 4,184 kilojoules). Como se explica en el texto, $\Delta G°$ representa la variación de energía libre en condiciones estándar (donde todos los componentes están presentes a una concentración 1,0 mol/litro).

A partir de esta tabla se puede ver que si se produce una variación de energía libre favorable ($\Delta G°$) de −4,3 kcal/mol (18,0 kJ/mol) para la transición Y → X, en el equilibrio habrá 1000 veces más moléculas en el estado X que en el estado Y (K = 1000).

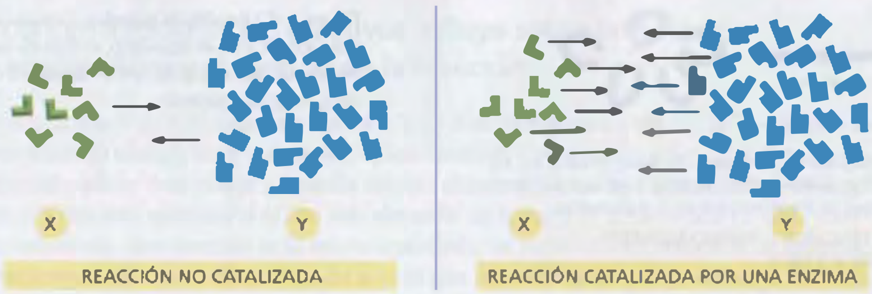


Figura 2–53 Las enzimas no pueden cambiar el punto de equilibrio de las reacciones. Las enzimas, como todos los catalizadores, aceleran las reacciones hacia adelante lo mismo que hacia atrás. Por lo tanto, tanto en la reacción catalizada como en la no catalizada que aparece en la figura, cuando la relación entre las moléculas de Y respecto a las moléculas de X es, por ejemplo, de 3,5 a 1, el número de moléculas que se transforman X → Y es igual al número de moléculas que se transforman Y → X. En otras palabras, las dos reacciones alcanzan el equilibrio exactamente en el mismo punto.

géticamente desfavorables si se consideran aisladamente. No obstante, la vía se produce rápidamente hasta el final debido a que el $\Delta G°$ total para la serie de reacciones secuenciales tiene un valor muy negativo.

Sin embargo, en muchos casos no es adecuado formar una vía secuencial. A menudo el proceso deseado es sencillamente X → Y, sin ninguna transformación posterior de Y a otro producto. Afortunadamente, existen otros sistemas más generales de utilizar enzimas para acoplar reacciones. A continuación se analizará cómo funcionan estos sistemas.

Las moléculas transportadoras activadas son esenciales para la biosíntesis

La energía liberada por la oxidación de las moléculas de alimento tiene que ser almacenada temporalmente antes de que pueda ser canalizada para la construcción de muchas otras moléculas que necesita la célula. En la mayoría de las ocasiones, la energía se almacena en forma de energía de enlace químico en un pequeño juego de "moléculas transportadoras" activadas, que contienen uno o más enlaces covalentes ricos en energía. Estas moléculas difunden rápidamente a través de la célula, por lo que pueden transportar su energía de enlace desde los lugares donde se genera la energía hasta los lugares donde se utiliza esta energía para biosíntesis o para otras actividades de la célula (**Figura 2–55**).

Los transportadores activados almacenan energía en una forma fácilmente intercambiable, bien sea como un grupo químico fácil de transferir, bien sea en forma de electrones energéticamente activados, que en las reacciones biosintéticas pueden desempeñar el papel de fuente de energía o de grupos químicos. Por razones históricas, estas moléculas son conocidas como *coenzimas*. Las moléculas transportadoras activadas más importantes son el ATP y dos moléculas estrechamente relacionadas entre sí, el NADH y el NADPH –que des-

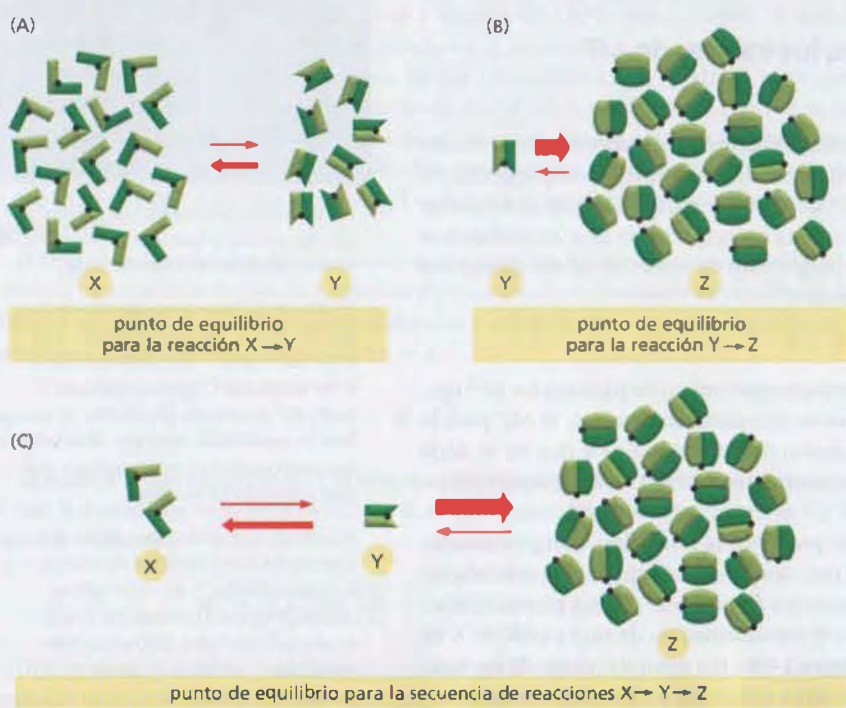


Figura 2–54 De qué forma una reacción energéticamente desfavorable puede ser impulsada por otra reacción consecutiva. (A) En el equilibrio, hay al menos el doble de moléculas de X que de Y, debido a que X tiene menos energía que Y. (B) En el equilibrio, hay 25 veces más moléculas de Z que de Y, porque Z tiene mucha menos energía que Y. (C) Si las reacciones de (A) y de (B) están acopladas, casi todas las moléculas de X se transformarán en moléculas de Z.

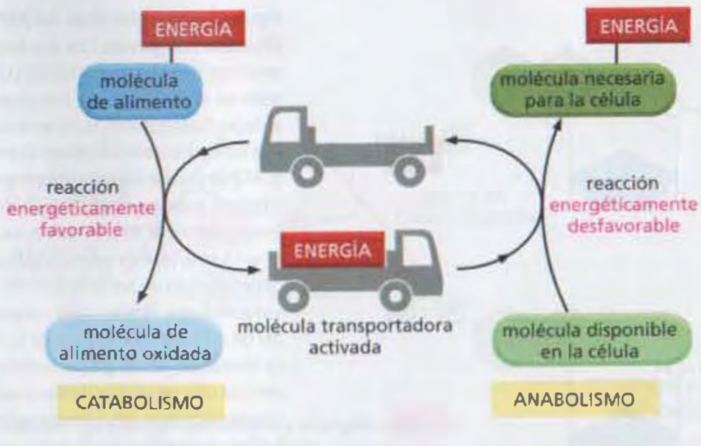


Figura 2–55 Transferencia de energía y papel en el metabolismo de los transportadores activados. Las moléculas transportadoras actúan como lanzaderas energéticas, que van y vienen de las reacciones que liberan energía mediante la rotura de moléculas de alimento *(catabolismo)* y reacciones que necesitan energía para la biosíntesis de moléculas orgánicas, pequeñas o grandes *(anabolismo)*.

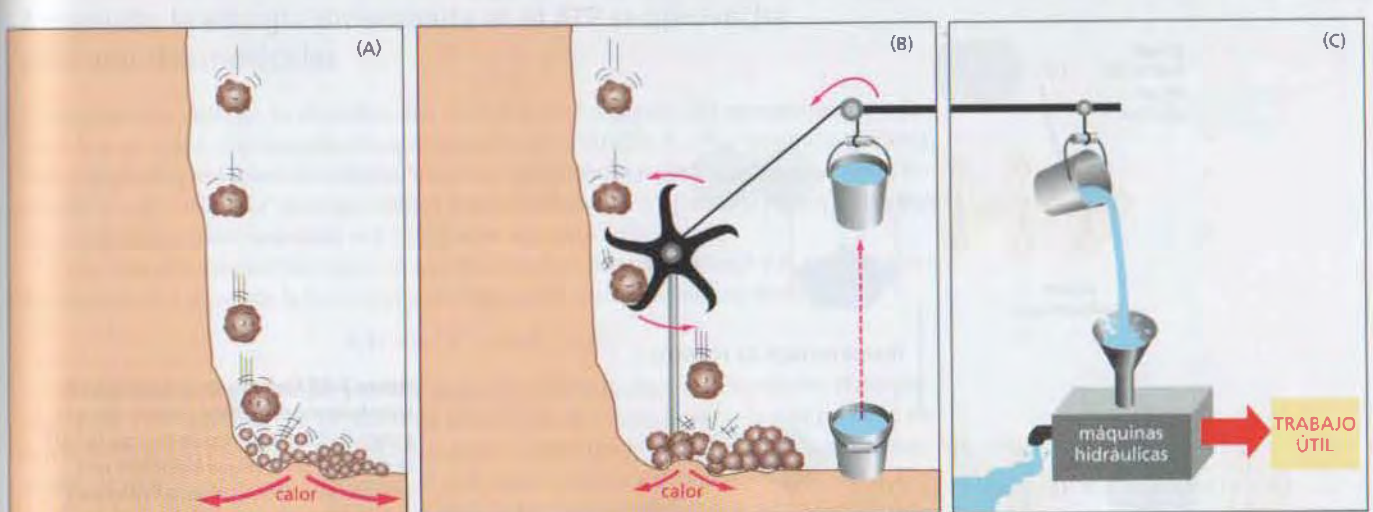
cribiremos en detalle. Hemos de resaltar que la célula utiliza estas moléculas transportadoras activadas como moneda para pagar las reacciones que, de otro modo, no podrían llegar a producirse.

La formación de un transportador activado se acopla a una reacción energéticamente favorable

Cuando en una célula se oxida una molécula de combustible, como la glucosa, una serie de reacciones catalizadas por enzimas aseguran que una gran parte de la energía libre que se libera en esta oxidación sea capturada en una forma química utilizable, en lugar de ser liberada como calor. Esto se consigue mediante una **reacción acoplada**: una reacción energéticamente favorable impulsa una reacción energéticamente desfavorable, la cual produce una molécula transportadora activada o alguna otra forma de almacenamiento de energía útil. Los mecanismos de acoplamiento requieren enzimas y son fundamentales para todas las transacciones energéticas de la célula.

En la **Figura 2–56** se ilustra la naturaleza de una reacción acoplada, por medio de una analogía mecánica, en la cual una reacción química energéticamente favorable se representa mediante rocas que caen desde un acantilado. Normalmente, la energía de las rocas que caen se perdería en forma del calor generado por la fricción que se produce cuando las rocas golpean el suelo (véase el diagrama del ladrillo que cae en la Figura 2–39). Sin embargo, por medio de un cuidadoso diseño parte de esta energía se puede utilizar, en cambio, para mover una rueda de palas que levanta un cubo de agua (Figura 2–56B). Ahora las rocas llegan al suelo después de haber movido la rueda de palas, por lo que podemos decir que la reacción energéticamente favorable de la caída de las rocas se acopla de forma directa a la reacción energéti-

Figura 2–56 Modelo mecánico que ilustra el principio de acoplamiento de reacciones químicas. La reacción espontánea mostrada en (A) podría servir como analogía de la oxidación directa de glucosa hasta CO_2 y H_2O, la cual sólo produce calor. En (B) la misma reacción está acoplada a una segunda reacción; es análoga a la síntesis de moléculas transportadoras activadas. La energía producida en (B) es más fácil de utilizar que la producida en (A) y puede impulsar una gran variedad de reacciones energéticamente desfavorables (C).



la energía cinética de las rocas que caen únicamente se transforma en energía calorífica

parte de la energía cinética es utilizada para elevar el cubo de agua, de forma que se transforma en calor una cantidad de energía correspondientemente menor

la energía cinética almacenada en forma de energía potencial en el cubo de agua se puede utilizar para hacer funcionar máquinas hidráulicas, que pueden realizar tareas útiles

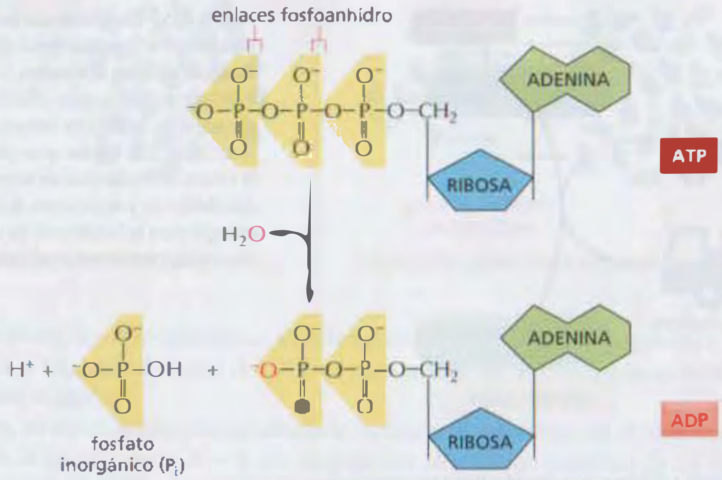


Figura 2–57 La hidrólisis del ATP en ADP y fosfato inorgánico. Los dos fosfatos más externos del ATP se mantienen unidos al resto de la molécula por medio de dos enlaces fosfoanhidro ricos en energía, que son fácilmente transferibles. Como se indica, el ATP se puede hidrolizar formando ADP y fosfato inorgánico (P_i). Esta hidrólisis del fosfato terminal del ATP produce entre 11 y 13 kcal/mol de energía utilizable, dependiendo de las condiciones intracelulares. El gran valor negativo de ΔG de esta reacción deriva de varios factores. La liberación de un grupo fosfato terminal elimina una repulsión desfavorable entre cargas negativas adyacentes; además, el ion fosfato inorgánico (P_i) liberado se estabiliza por resonancia y por la formación favorable de un enlace de hidrógeno con el agua.

camente desfavorable de levantar el cubo de agua. Hay que destacar que debido a que parte de la energía se utiliza para realizar trabajo en (B), las rocas golpean el suelo con menos velocidad que en (A), por lo que se disipa menos cantidad de energía en forma de calor.

En la célula se produce un proceso similar a éste, en el que las enzimas desempeñan el papel de la rueda de palas de la anterior analogía. Por medio de mecanismos que se describirán más adelante en este capítulo, acoplan una reacción energéticamente favorable como la oxidación de alimentos, a una reacción energéticamente desfavorable, como la generación de una molécula de transportador activada. Como resultado de este proceso, la cantidad de calor liberado por la reacción de oxidación disminuye en exactamente la misma cantidad de energía que es almacenada en los enlaces covalentes ricos en energía de la molécula transportadora activada. A su vez, la molécula transportadora activada toma un paquete de energía de tamaño suficiente para poder impulsar una reacción química en cualquier parte de la célula.

El ATP es la molécula que más se utiliza como transportador activado

El más importante y versátil de los transportadores activados de las células es el **ATP** (adenosina trifosfato). Exactamente como ocurre con la energía almacenada en el cubo de agua que ha sido elevado en la Figura 2–56B, y que puede impulsar una amplia variedad de máquinas hidráulicas, en las células, el ATP es un depósito, o moneda, de energía, adecuado y versátil que se utiliza para dirigir una gran variedad de reacciones químicas. El ATP se sintetiza a través de una reacción de fosforilación energéticamente desfavorable en la que un gru-

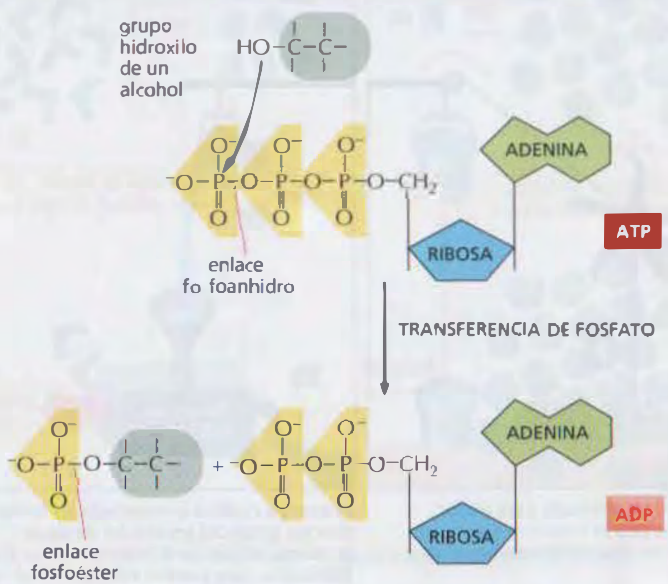
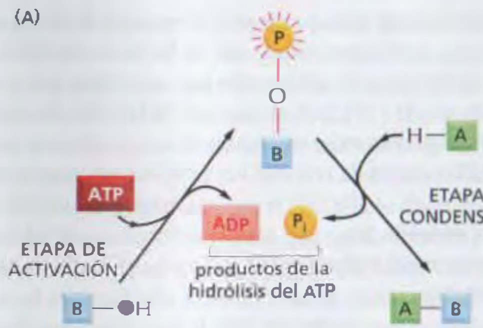


Figura 2–58 Ejemplo de una reacción de transferencia de fosfato. Debido a que el enlace fosfoanhidro rico en energía del ATP se transforma en enlace fosfoéster, esta reacción es energéticamente favorable y tiene un ΔG muy negativo. En la síntesis de fosfolípidos y en las etapas iniciales de las reacciones de catabolismo de los azúcares participan reacciones de este tipo.

(A)



(B)

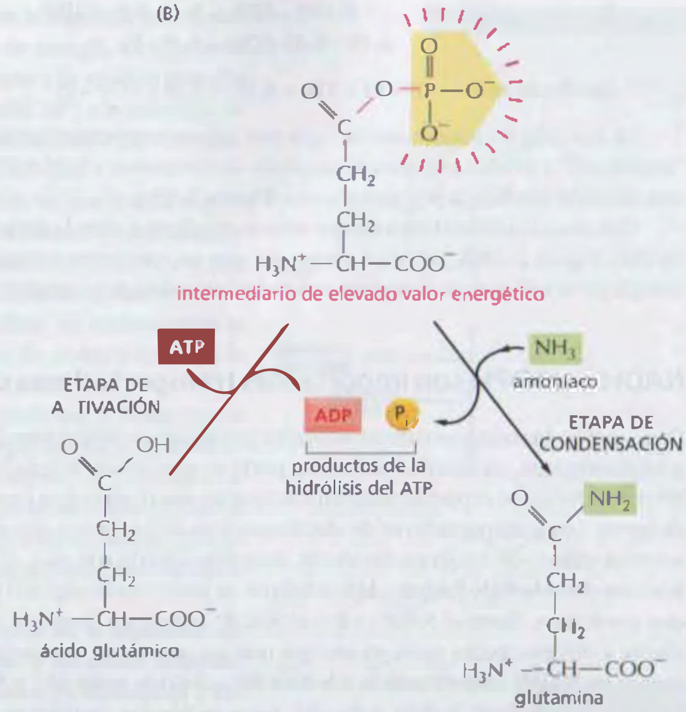


Figura 2–59 Ejemplo de reacción biosintética energéticamente desfavorable impulsada por la hidrólisis del ATP. (A) Ilustración esquemática de la formación de A–B mediante la reacción de condensación descrita en el texto. (B) Biosíntesis del aminoácido común glutamina. Primero, el ácido glutámico se transforma en un intermediario fosforilado de elevado valor energético (correspondiente al compuesto B-O-PO_3 descrito en el texto), el cual entonces reacciona con amoníaco (que corresponde a A–H) formando glutamina. En este ejemplo, ambos pasos se dan en la superficie de la misma enzima, la *glutamina sintetasa*. Los enlaces de alta energía están sombreados en rojo.

po fosfato se añade al ADP (adenosina difosfato). Cuando se requiere, el ATP libera su contenido energético a través de una hidrólisis energéticamente favorable y se descompone en ADP y fosfato inorgánico (**Figura 2–57**). El ADP regenerado está disponible para ser utilizado otra vez en una reacción de fosforilación que forme ATP.

La hidrólisis energéticamente favorable del ATP está acoplada a otras reacciones energéticamente desfavorables a través de las cuales se sintetizan otras moléculas. Más adelante, en este mismo capítulo, encontraremos algunas de estas reacciones. Muchas de ellas implican la transferencia del fosfato terminal del ATP a otra molécula, como se ilustra en la reacción de fosforilación en la **Figura 2–58**.

El ATP es el transportador activado más abundante en las células. Por ejemplo, suministra energía a muchas de las bombas que transportan sustancias entre el interior y el exterior de la célula (Capítulo 11); también proporciona energía a los motores moleculares que facilitan la contracción de las fibras musculares y que permiten a las células nerviosas transportar materiales de un extremo a otro de sus largos axones (véase el Capítulo 16).

A menudo, la energía almacenada en el ATP se aprovecha para unir dos moléculas

En un esquema anterior, se describió una vía por la cual una reacción energéticamente favorable se acopla a una reacción energéticamente desfavorable, X → Y, y posibilita que esta reacción pueda producirse; una segunda enzima catalizaba la reacción energéticamente favorable Y → Z, "estirando" para que todo el X se transformara en Y (véase la Figura 2–54). Pero cuando el producto necesario es Y y no Z, este mecanismo no es útil.

Una reacción biosintética típica es aquella en la que dos moléculas, A y B, se unen produciendo A–B, a través de la reacción de condensación, energéticamente desfavorable

$$A\text{–}H + B\text{–}OH \rightarrow A\text{–}B + H_2O$$

Existe una vía indirecta que permite que A–H y B–OH formen A–B, mediante el acoplamiento de esta reacción con la hidrólisis de ATP. En este caso, la energía que procede de la hidrólisis del ATP se utiliza inicialmente para transformar B–OH en un compuesto intermedio de mayor contenido energético, el cual luego reacciona de forma directa con A–H y produce A–B. El mecanismo más sencillo posible implica la transferencia de un fosfato desde el ATP hasta B–OH formando B–OPO_3, en cuyo caso la reacción sólo está formada por dos etapas:

1. $B\text{–}OH + ATP \rightarrow B\text{–}O\text{–}PO_3 + ADP$
2. $A\text{–}H + B\text{–}O\text{–}PO_3 \rightarrow A\text{–}B + P_i$

Resultado neto: $B\text{–}OH + ATP + A\text{–}H \rightarrow A\text{–}B + ADP + P_i$

La reacción de condensación, que por sí misma es energéticamente desfavorable, es "impulsada" a producirse al estar acoplada directamente a la hidrólisis del ATP a través de una reacción catalizada por una enzima (**Figura 2–59**A).

Una reacción biosintética de este mismo tipo lleva a cabo la síntesis del aminoácido glutamina (Figura 2–59B). Veremos enseguida que un mecanismo similar a éste (aunque más complejo) se utiliza para sintetizar casi todas las moléculas complejas de la célula.

NADH y NADPH son importantes transportadores de electrones

Otras moléculas transportadoras activadas participan en reacciones de oxidación-reducción y habitualmente, en las células, forman parte de reacciones acopladas. Estos transportadores activados están especializados en transportar electrones ricos en energía y átomos de hidrógeno. Los transportadores de electrones más importantes son el **NAD$^+$** (nicotinamida adenina dinucleótido) y una molécula, muy relacionada con ésta, el **NADP$^+$** (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato). Más adelante, se examinarán algunas de las reacciones en las que participan. Tanto el NAD$^+$ como el NADP$^+$ toman un "paquete de energía" correspondiente a dos electrones ricos en energía más un protón (H$^+$), transformándose respectivamente en **NADH** (nicotinamida adenina dinucleótido *reducido*) y **NADPH** (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato *reducido*). Estas moléculas también pueden considerarse como transportadores de iones hidruro (el H$^+$ más dos electrones, o H$^-$).

Como el ATP, el NADPH es un transportador activado que participa en muchas reacciones biosintéticas, las cuales en caso contrario serían energéticamente desfavorables. El

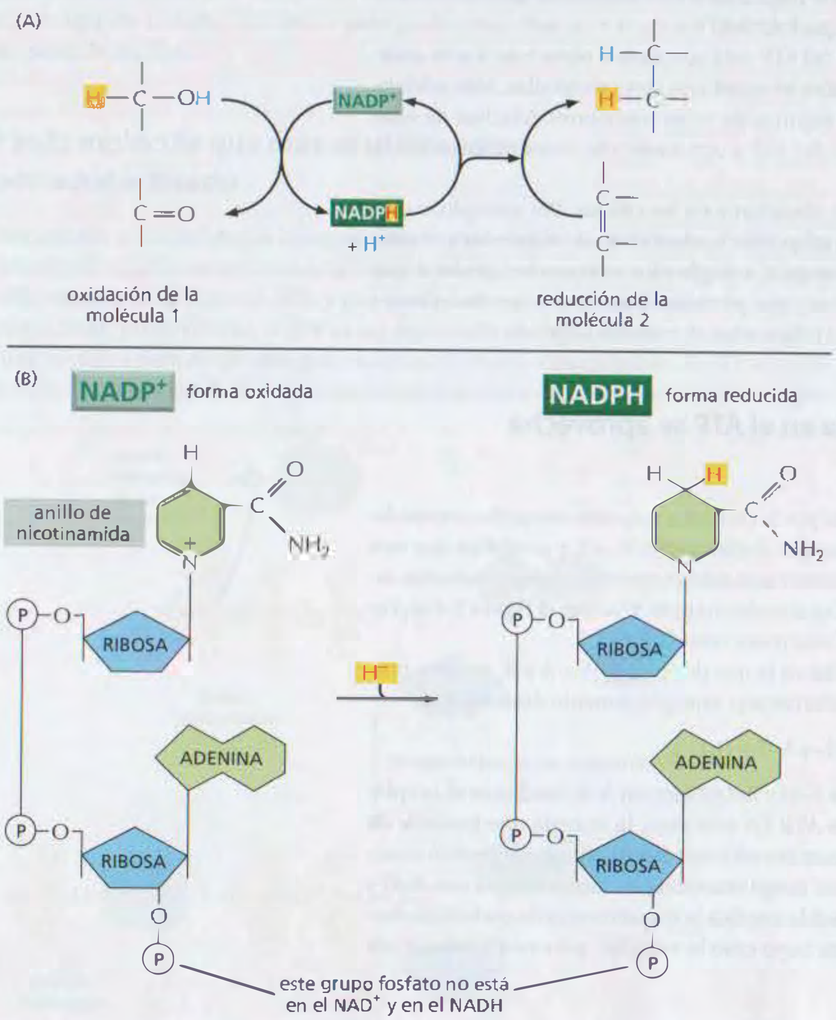


Figura 2–60 El NADPH, un importante transportador de electrones. (A) El NADPH se produce en reacciones del tipo general que se muestra a la izquierda, en las cuales a partir de una molécula de sustrato se liberan dos átomos de hidrógeno. La forma oxidada de la molécula transportadora, NADP$^+$, recibe un átomo de hidrógeno más un electrón (un ion hidruro); el protón (H$^+$) generado a partir de otro átomo de H, se libera a la solución. El NADPH mantiene su ion hidruro mediante un enlace rico en energía, por lo que este ion hidruro añadido puede ser fácilmente transferido a otras moléculas, como se muestra a la derecha. (B) Las estructuras del NADP$^+$ y del NADPH. La parte de la molécula del NADP$^+$ conocida como anillo de nicotinamida acepta dos electrones y un protón (el equivalente a un ion hidruro, H$^-$), formando NADPH. Las moléculas de NAD$^+$ y de NADH tienen una estructura idéntica al NADP$^+$ y al NADPH, respectivamente, excepto en que el grupo fosfato indicado está ausente en ambas.

NADPH se produce de acuerdo con el esquema general mostrado en la Figura 2–60A. A través de un conjunto especial de reacciones catabólicas productoras de energía, un átomo de hidrógeno y dos electrones son eliminados de la molécula de sustrato y se añaden al anillo de nicotinamida del $NADP^+$, formando NADPH y liberando un protón (H^+) a la solución. Se trata de una reacción típica de oxidación-reducción; el sustrato se oxida y el $NADP^+$ se reduce. Las estructuras del $NADP^+$ y del NADPH se muestran en la Figura 2–60B.

El ion hidruro transportado por el NADPH es liberado fácilmente en una reacción posterior de oxidación-reducción, puesto que sin él, el anillo puede alcanzar un estado más estable. En esta reacción posterior, que regenera $NADP^+$, el que se oxida es el NADPH y el que se reduce es el otro sustrato. El NADPH es un dador eficiente del ion hidruro a otras moléculas por la misma razón que el ATP transfiere con facilidad un fosfato: en ambos casos la transferencia se acompaña de una importante variación negativa de energía libre. En la Figura 2–61 se muestra un ejemplo de la utilización del NADPH en biosíntesis.

El grupo fosfato extra del NADPH no afecta las propiedades de transferencia de electrones del NADPH respecto a las del NADH, ya que está lejos de la región implicada en la transferencia de electrones (véase Figura 2–60B) y no tiene importancia en la reacción de transferencia. Sin embargo, hace que la molécula de NADPH tenga una forma ligeramente diferente a la del NADH y permite que el NADPH y el NADH se unan, como sustratos, a conjuntos completamente diferentes de enzimas. Así, los dos tipos de transportadores se utilizan para transferir electrones (o iones hidruro) entre dos grupos distintos de moléculas.

¿Por qué se produce este reparto del trabajo? La respuesta reside en la necesidad de regular dos conjuntos de reacciones de transferencia de electrones de un modo independiente. El NADPH actúa sobre todo con enzimas que catalizan reacciones anabólicas y suministra los electrones ricos en energía que se necesitan para sintetizar las moléculas ricas en energía. El NADH, por el contrario, actúa como intermediario en el sistema catabólico de reacciones que generan ATP a través de la oxidación de moléculas de alimento, como describiremos enseguida. La génesis de NADH a partir de NAD^+ y la de NADPH a partir de $NADP^+$ tienen lugar a través de vías diferentes, reguladas de manera independiente. Así, la célula puede ajustar de manera independiente el suministro de electrones a estos dos propósitos contrapuestos. En el interior de la célula, la relación de NAD^+/NADH se mantiene alta, mientras que la relación $NADP^+$/NADPH se mantiene baja. Este hecho hace que siempre haya una gran cantidad de NAD^+ (que actúa como agente oxidante) y una gran cantidad de NADPH (que actúa como agente reductor), como requieren los papeles específicos de ambos transportadores en el catabolismo y en el anabolismo, respectivamente.

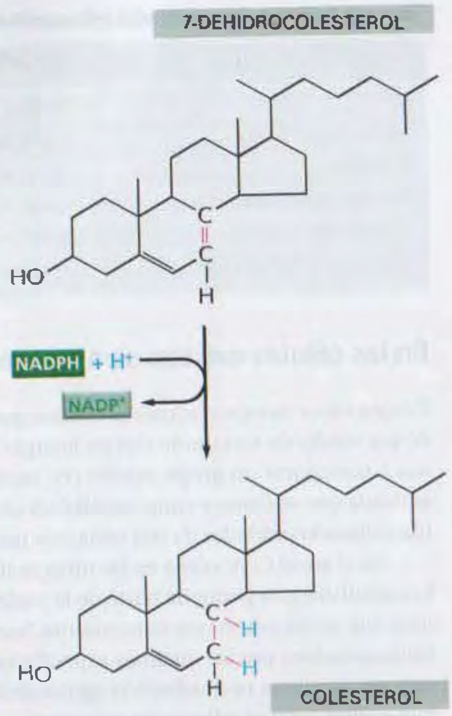


Figura 2–61 Etapa final de una de las vías biosintéticas que producen colesterol. Como en muchas otras reacciones biosintéticas, la reducción del enlace C=C se consigue gracias a la transferencia de un ion hidruro desde la molécula transportadora NADPH y de un protón (H^+) de la solución.

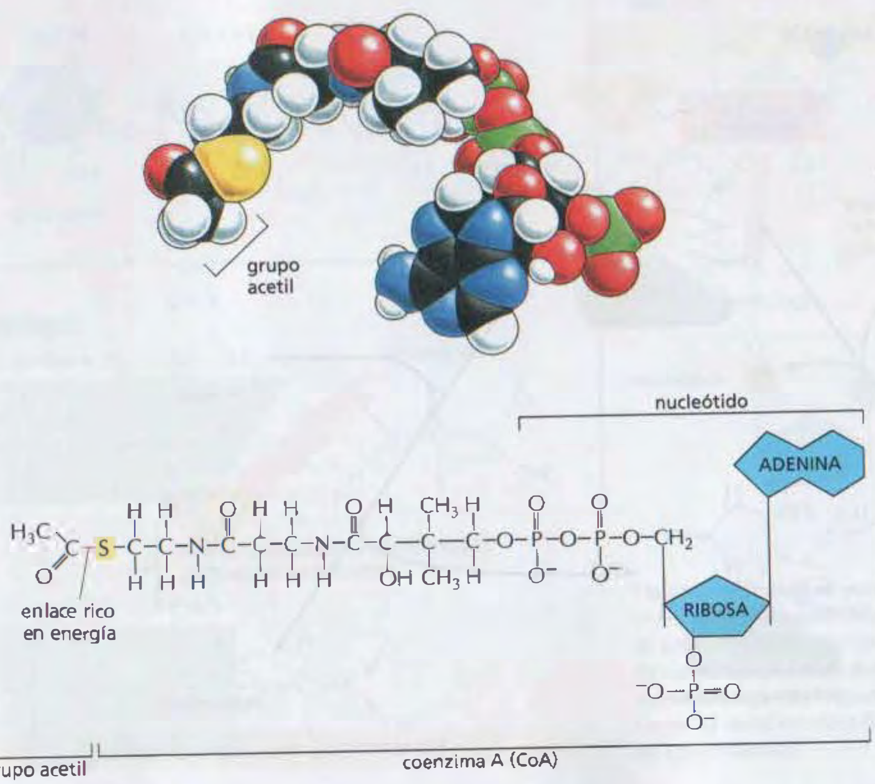


Figura 2–62 Estructura de la molécula activada de un importante transportador: el acetil CoA. Encima de la fórmula se muestra un modelo tridimensional de espacio lleno del acetil CoA. El átomo de azufre (*amarillo*) forma un enlace tioéster con el acetato. Como es un enlace rico en energía, cuando se hidroliza libera una gran cantidad de energía libre y, en consecuencia, la molécula de acetato puede ser transferida fácilmente a otras moléculas.

Tabla 2–5 Algunas moléculas transportadoras activadas, habituales en el metabolismo

TRANSPORTADOR ACTIVADO	GRUPO TRANSPORTADO EN ENLACES RICOS EN ENERGÍA
ATP	fosfato
NADH, NADPH, $FADH_2$	electrones e hidrógenos
Acetil CoA	grupo acetilo
Biotina carboxilada	grupo carboxilo
S-Adenosilmetionina	grupo metilo
Uridina difosfato glucosa	glucosa

En las células existen otras moléculas transportadoras activadas

Existen otros transportadores activados que también toman y transportan un grupo químico por medio de una unión rica en energía y fácilmente transferible. Por ejemplo, el coenzima A transporta un grupo acetilo por medio de una unión fácilmente transferible, forma activada que se conoce como **acetil CoA** (acetil coenzima A). El acetil CoA (**Figura 2–62**) actúa cediendo unidades de dos carbonos para la biosíntesis de grandes moléculas.

En el acetil CoA, como en las otras moléculas transportadoras, el grupo transferible sólo constituye una pequeña parte de la molécula. El resto constituye una gran porción orgánica que actúa como una conveniente "asa" que facilita el reconocimiento de la molécula transportadora por las enzimas específicas. Como ocurre con el acetil CoA, generalmente esta asa contiene un nucleótido (generalmente la adenosina), lo cual es un hecho curioso que podría ser una reliquia de primitivos estados de la evolución. Actualmente se cree que los principales catalizadores de las formas de vida primigenias sobre la tierra –antes que el DNA o las proteínas– fueron moléculas de RNA (o formas próximas a ellas) como se describe en el Capítulo 6. Resulta tentador especular con que la mayor parte de las moléculas transportadoras actuales se originaron en un mundo previo de RNA, en el que sus zonas de nucleótido podrían haber sido utilizadas para unirse a enzimas de RNA.

En las Figuras 2–58 y 2–61 se presentan ejemplos de tipos de reacciones de transferencia realizadas, respectivamente, por las moléculas transportadoras activadas ATP (transferidora de fosfato) y NADPH (transferidora de electrones y de hidrógeno). Las reacciones de otras moléculas transportadoras activadas implican la transferencia de un grupo metilo, carboxilo o glucosa, con propósitos biosintéticos (**Tabla 2–5**). Estos transportadores activados se generan mediante reacciones acopladas a la hidrólisis del ATP, como en el ejemplo de la

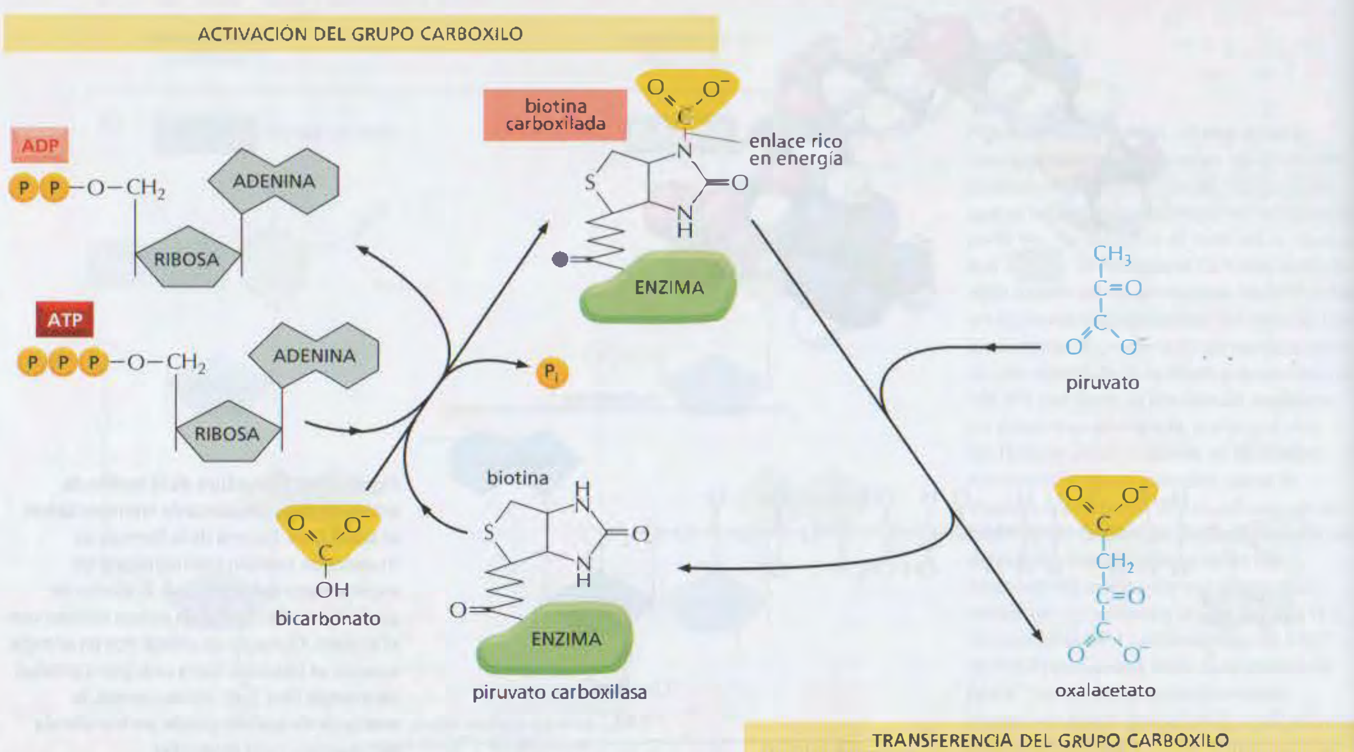


Figura 2–63 Reacción de transferencia de un grupo carboxilo, que utiliza una molécula transportadora activada. La enzima *piruvato carboxilasa* utiliza la biotina carboxilada para transferir un grupo carboxilo durante la producción de oxalacetato, una molécula necesaria para el ciclo del ácido cítrico. La molécula aceptora de esta reacción de transferencia de grupo es el piruvato. Otras enzimas utilizan la biotina para transferir grupos carboxilo a otras moléculas aceptoras. Es de destacar que la síntesis de la biotina carboxilada requiere energía derivada del ATP. Esta característica es habitual en muchos transportadores activados.

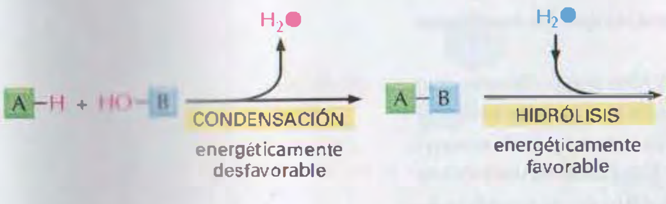


Figura 2–64 Condensación e hidrólisis como reacciones opuestas. Las macromoléculas de la célula son polímeros que se forman a partir de subunidades (o monómeros) mediante una reacción de condensación y se descomponen mediante reacciones de hidrólisis. Las reacciones de condensación son reacciones energéticamente desfavorables.

Figura 2–63. Por consiguiente, la energía que facilita que sus grupos se utilicen para biosíntesis procede en último término de las reacciones catabólicas que generan ATP. En la síntesis de moléculas muy complejas de la célula –como ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos– que analizaremos próximamente, se dan procesos similares.

La hidrólisis de ATP dirige la síntesis de polímeros biológicos

Como hemos descrito, las macromoléculas de la célula constituyen la mayor parte de su masa seca, es decir, la masa no debida al agua (véase Figura 2–29). Estas moléculas están formadas por subunidades (o monómeros) unidas entre sí mediante *reacciones de condensación*, en las que a partir de los dos compuestos que reaccionan, se liberan los constituyentes de una molécula de agua (OH más H). En consecuencia, la reacción inversa –la rotura de los tres tipos de polímeros– tiene lugar con la adición de agua (*hidrólisis*) catalizada por enzi-

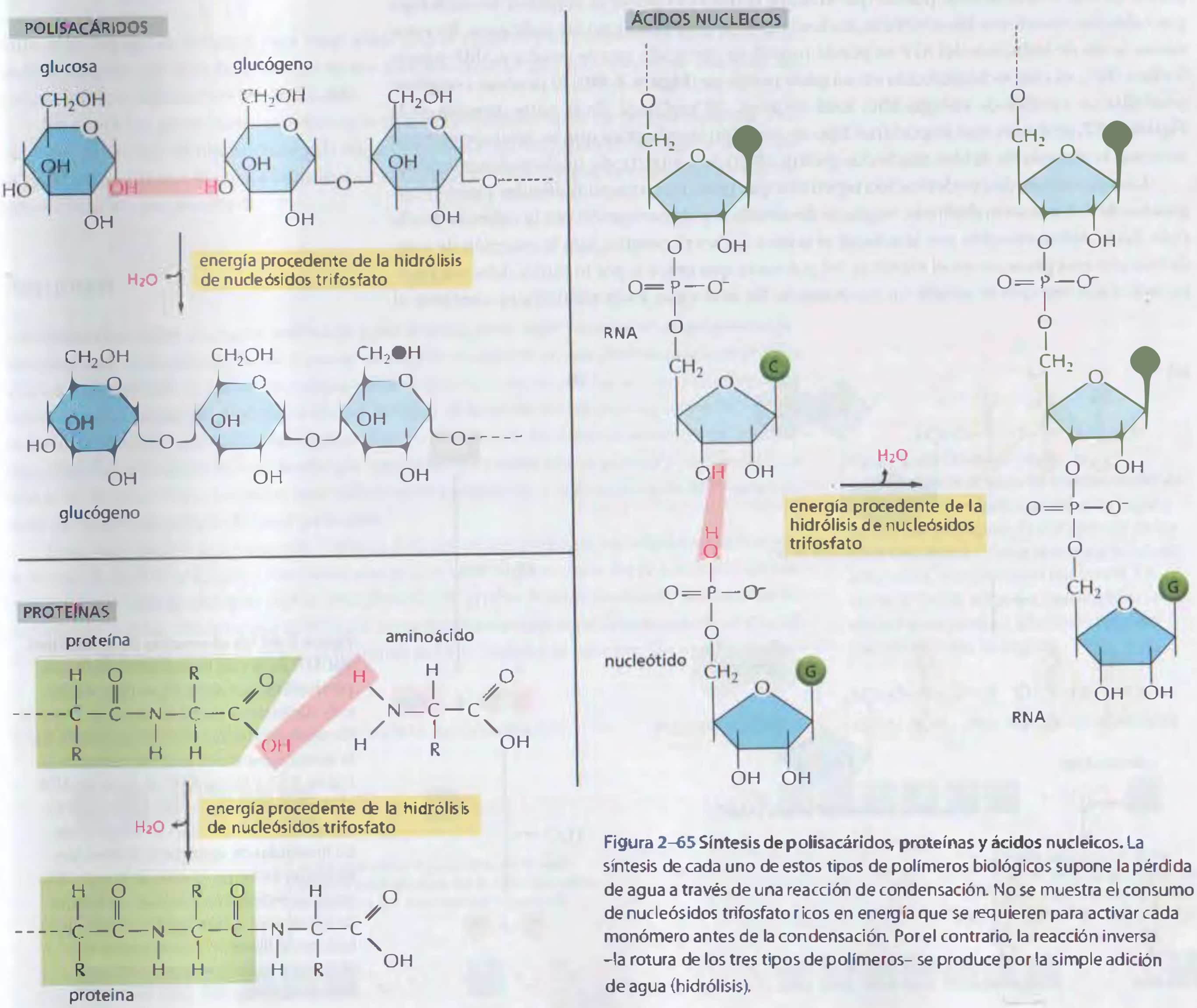


Figura 2–65 Síntesis de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. La síntesis de cada uno de estos tipos de polímeros biológicos supone la pérdida de agua a través de una reacción de condensación. No se muestra el consumo de nucleósidos trifosfato ricos en energía que se requieren para activar cada monómero antes de la condensación. Por el contrario, la reacción inversa –la rotura de los tres tipos de polímeros– se produce por la simple adición de agua (hidrólisis).

mas. Esta reacción de hidrólisis es energéticamente favorable, mientras que las reacciones biosintéticas requieren el aporte de energía (**Figura 2–64**).

Los ácidos nucleicos (DNA y RNA), las proteínas y los polisacáridos son polímeros que se producen por la adición repetida de un monómero a un extremo de una cadena en crecimiento. En la **Figura 2-65** se indica cómo se sintetiza cada uno de esos tres tipos de macromoléculas. En cada caso, la condensación depende de la energía de hidrólisis del nucleósido trifosfato. Excepto para los ácidos nucleicos, no se generan grupos fosfato como producto final. Entonces, ¿cómo pueden estar acopladas las reacciones que liberan energía de la hidrólisis del ATP a la síntesis de polímeros?

Para cada tipo de macromolécula, existe una reacción catalizada por una enzima que se parece a la reacción que hemos visto antes referente a la síntesis del aminoácido glutamina (véase Figura 2-59). El principio es el mismo: el grupo OH que será liberado en la reacción de condensación es activado previamente mediante su participación en una unión rica en energía con una segunda molécula. Sin embargo, los mecanismos reales que se utilizan para unir la hidrólisis del ATP a la síntesis de proteínas y polisacáridos son más complejos que los que se utilizan para la síntesis de glutamina, ya que (como se describirá en el Capítulo 6 para la síntesis de proteínas) el enlace final rico en energía que se rompe durante la etapa de condensación, se genera a través de una serie de intermediarios ricos en energía.

Cada transportador activado tiene unos límites y unas habilidades para impulsar una reacción biosintética. El ΔG de la hidrólisis del ATP a ADP y fosfato inorgánico (P_i) depende de la concentración de los compuestos que participan en la reacción, pero bajo las condiciones habituales de la célula, tiene un valor de entre –11 y –13 kcal/mol (entre –46 y –54 kJ/mol). En principio, esta reacción de hidrólisis puede impulsar una reacción desfavorable que tenga un ΔG de, tal vez, + 10 kcal/mol, puesto que el ΔG de la reacción global es negativo. Sin embargo, para algunas reacciones biosintéticas, incluso –13 kcal/mol podría no ser suficiente. En estos casos, la vía de hidrólisis del ATP se puede modificar, de modo que se produce AMP y pirofosfato (PP_i), el cual es hidrolizado en un paso posterior (**Figura 2–66**). El proceso completo posibilita un cambio de energía libre total de unas –26 kcal/mol. En la parte derecha de la **Figura 2–67**, se ilustra una importante tipo de reacción biosintética que se produce por este sistema, la síntesis de ácidos nucleicos (polinucleótidos) a partir de nucleósidos trifosfato.

Las reacciones de condensación repetitiva que producen macromoléculas pueden originarse de dos maneras distintas, según se desarrolle la polimerización por la cabeza o por la cola. En la *polimerización por la cabeza*, el enlace activo necesario para la reacción de condensación está presente en el extremo del polímero que crece y, por lo tanto, debe ser regenerado cada vez que se añade un monómero. En este caso, cada monómero contiene el

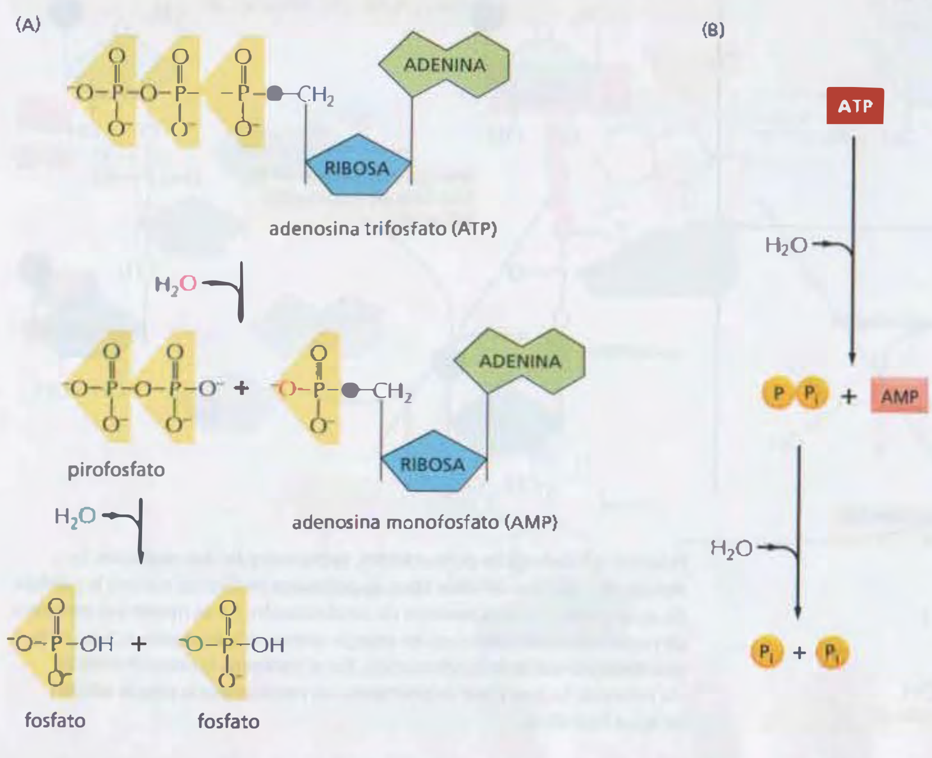


Figura 2–66 Vía alternativa de la hidrólisis del ATP, en la cual inicialmente se forma pirofosfato, que después es hidrolizado. Esta vía libera cerca del doble de la cantidad de energía libre que se obtiene, a partir de la reacción mostrada anteriormente en la Figura 2-57, y forma AMP en lugar de ADP. (A) Mediante dos reacciones de hidrólisis consecutivas, los átomos de oxígeno de las moléculas de agua participantes son retenidas en los productos de la reacción, como se indica, mientras que los átomos de hidrógeno se disocian formando iones hidrógeno libres (H^+, no se muestra). (B) Diagrama de la reacción global en forma resumida.

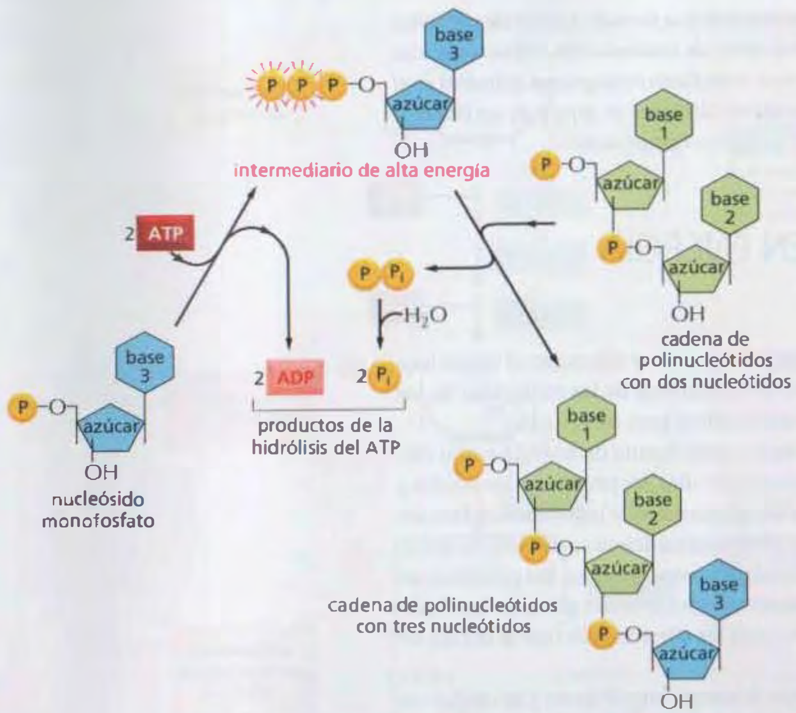


Figura 2–67 La síntesis completa de un polinucleótido, RNA o DNA, es un proceso que se produce a través de varias etapas, impulsado por la hidrólisis de ATP. En la primera de las etapas, un nucleósido monofosforilado es activado mediante la transferencia secuencial de los grupos fosfato terminales de dos moléculas de ATP. El intermediario formado de alta energía –un nucleósido trifosforilado– queda libre en la solución hasta que reacciona con el extremo en crecimiento de una cadena de RNA o de DNA, lo cual libera el pirofosfato. La hidrólisis de este pirofosfato formando dos moléculas de fosfato inorgánico es muy favorable y favorece el impulso del conjunto de la reacción en la dirección de la síntesis del polinucleótido. Véase el Capítulo 5 para más detalles.

enlace activo que se utilizará para reaccionar con el siguiente monómero de la serie. En la *polimerización por la cola*, el enlace activo que transporta cada monómero se usa para su propia adición al polímero (**Figura 2–68**).

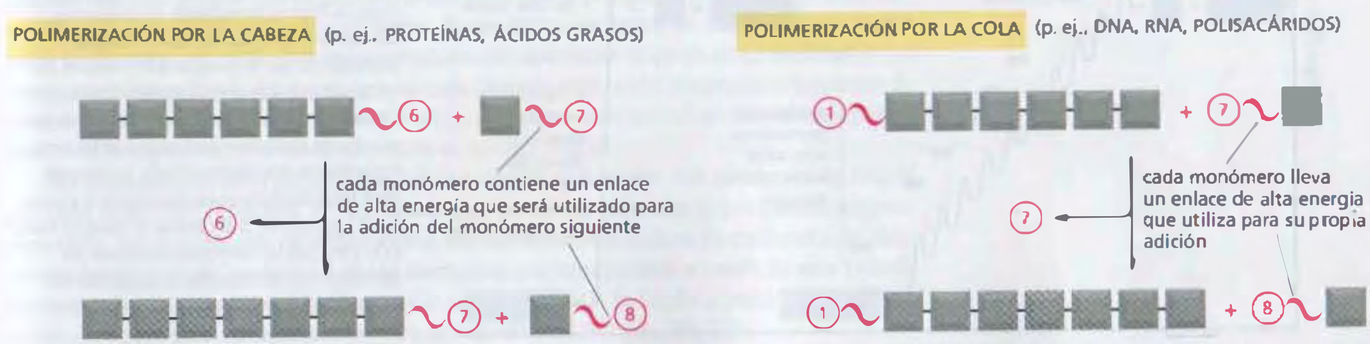
En capítulos posteriores veremos que se utilizan ambos tipos de polimerización. Por ejemplo, la síntesis de nucleótidos y de algunos polisacáridos simples tiene lugar a través de la polimerización por la cola, mientras que la síntesis de proteínas se lleva a cabo mediante polimerización por la cabeza.

Resumen

Las células vivas están altamente ordenadas y, por lo tanto, para crecer y sobrevivir deben generar orden dentro de ellas mismas. Desde el punto de vista termodinámico, este fenómeno sólo es posible gracias a una entrada continua de energía, parte de la cual es cedida por las células a su entorno en forma de calor. La energía procede, en último término, de la radiación electromagnética del sol, que impulsa la formación de moléculas orgánicas en los organismos fotosintetizadores, como las plantas verdes. Los animales obtienen su energía ingiriendo estas moléculas orgánicas y oxidándolas en una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente y acopladas a la formación de ATP –una moneda de cambio de energía de todas las células.

Para hacer posible la producción continua de orden en las células, la hidrólisis energéticamente favorable del ATP se acopla a reacciones energéticamente desfavorables. En la biosíntesis de macromoléculas, esto se consigue por la transferencia de grupos fosfato formando intermediarios fosforilados activos. Debido a que la reacción energéticamente desfavorable se convierte en energéticamente favorable, se considera que la hidrólisis del ATP impulsa la reacción. Las moléculas poli-

Figura 2–68 Orientación de los intermediarios activos en las reacciones de condensación repetitivas que dan lugar a polímeros biológicos. El crecimiento de los polímeros por la cabeza se compara con su alternativa, el crecimiento por la cola. Tal como se indica, estos dos mecanismos se utilizan para producir diferentes tipos de macromoléculas biológicas.



méricas como las proteínas, los ácidos nucleicos y los polisacáridos se forman a partir de pequeñas moléculas precursoras activadas mediante repetidas reacciones de condensación. Otras moléculas activas, denominadas transportadores activos o coenzimas, transfieren otros grupos químicos en el transcurso de la biosíntesis: por ejemplo el NADPH transfiere hidrógeno en forma de un protón y dos electrones (ion híbrido) mientras que el acetil CoA transfiere un grupo acetilo.

CÓMO LAS CÉLULAS OBTIENEN ENERGÍA DE LOS ALIMENTOS

Las células necesitan un aporte constante de energía para generar y mantener el orden biológico que las mantiene vivas, procedente de los enlaces químicos de las moléculas de los nutrientes, los cuales, de esta forma, actúan como combustible para las células.

Para poder ser utilizados por nuestras células tanto como fuente de energía como elementos básicos de la construcción de nuestras propias moléculas, las proteínas, los lípidos y los polisacáridos, que constituyen la mayor parte de los alimentos que ingerimos, deben ser descompuestos en moléculas más pequeñas. La digestión enzimática descompone las grandes moléculas poliméricas de los alimentos en sus unidades monoméricas: las proteínas en aminoácidos, los polisacáridos en azúcares y las grasas en ácidos grasos y glicerol. Tras la digestión, las pequeñas moléculas orgánicas que derivan de los alimentos entran al citosol de las células, donde comienza su oxidación gradual.

Los azúcares son moléculas de combustible especialmente importantes y se oxidan en diversas etapas controladas hasta dióxido de carbono (CO_2) y agua (**Figura 2-69**). En esta sección trazamos las etapas principales de la hidrólisis, o catabolismo, de los azúcares y mostramos cómo se produce en las células animales el ATP, el NADH y otras moléculas transportadoras activadas. En las plantas, en los hongos y en muchas bacterias, funciona una vía muy similar. Como comprobaremos la oxidación de los ácidos grasos es igual de importante para las células. Otras moléculas como las proteínas, también se utilizan como fuentes de energía si son conducidas a través de rutas enzimáticas apropiadas.

La glucólisis es una vía central de producción de ATP

El proceso principal de la oxidación de azúcares es la secuencia de reacciones conocida como **glucólisis**, del griego *glykos*, "azúcar," y *lysis*, "rotura." La glucólisis produce ATP sin la intervención de oxígeno molecular (O_2 gas). Tiene lugar en el citosol de la mayoría de las células, incluyendo algunos microorganismos anaerobios (aquellos que pueden vivir sin usar oxígeno molecular). Probablemente la glucólisis se desarrolló en alguna etapa inicial de la historia de la vida, antes de que los organismos fotosintéticos introdujeran el oxígeno en la atmósfera. En la glucólisis, una molécula de glucosa, de seis átomos de carbono, es transformada en dos moléculas de *piruvato*, de tres átomos de carbono cada una. Por cada

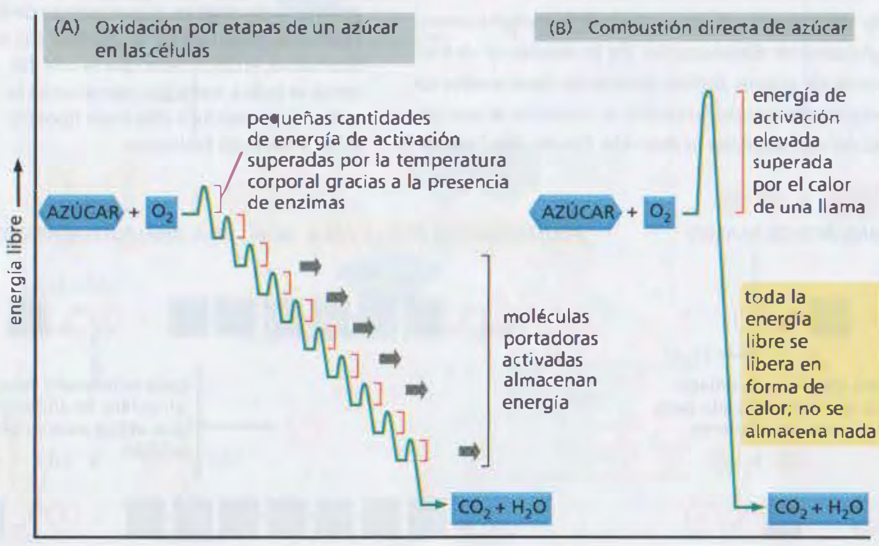


Figura 2-69 Representación esquemática de la oxidación, controlada por etapas, de un azúcar en una célula, comparada con la combustión corriente. (A) En la célula, las enzimas catalizan la oxidación a través de una serie de pequeños pasos en los que la energía libre es transferida en paquetes del tamaño adecuado a las moléculas portadoras, por lo general ATP y NADH. En cada paso, una enzima controla la reacción y reduce la barrera de energía de activación que ha de superarse para que pueda tener lugar la reacción determinada. La energía libre total liberada es exactamente la misma en (A) que en (B). Si el azúcar se oxidara hasta CO_2 y H_2O en un solo paso como en (B), liberaría una cantidad de energía mucho mayor de la que se podría capturar para poderla aprovechar.

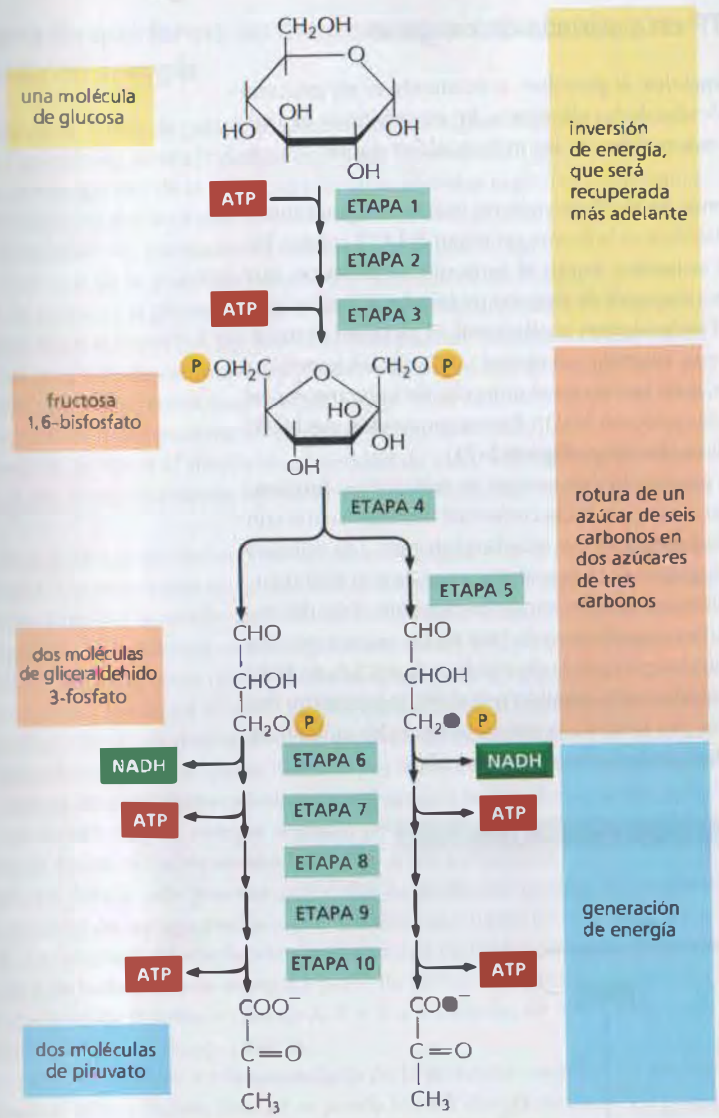


Figura 2–70 Esquema de la glucólisis. <GGGC> Cada una de las 10 etapas que se muestran está catalizada por una enzima diferente. Nótese que en la etapa 4 un azúcar de seis carbonos se rompe en dos azúcares de 3 carbonos, de forma que el número de moléculas que hay en las etapas siguientes es el doble. Como se indica, en la etapa 6 empieza la fase de generación de energía de la glucólisis. Dado que al inicio se han hidrolizado dos moléculas de ATP, el balance neto de la glucosa es la formación de 2 ATP y 2 NADH por cada molécula de glucosa (véase también el Panel 2–8).

molécula de glucosa se hidrolizan dos moléculas de ATP que aportan la energía necesaria en los primeros pasos, pero en los últimos pasos se producen cuatro moléculas de ATP. Por lo tanto, al final de la glucólisis se produce una ganancia neta aproximada de dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa hidrolizada.

La vía glucolítica se esquematiza en la Figura 2–70 y se muestra con más detalle en el Panel 2-8 (pp. 120–121). La glucólisis implica una secuencia de 10 reacciones, cada una de las cuales produce un azúcar intermediario diferente y que está catalizada por una enzima diferente. Como la mayoría de enzimas, estas reciben nombres que acaban en *asa* –como isomer*asa* y deshidrogen*asa*– que indica el tipo de reacción que catalizan.

A pesar de que en la glucólisis no participa el oxígeno molecular, se produce oxidación y los electrones son recogidos por el NAD^+ (produciéndose NADH) a partir de alguno de los carbonos derivados de la molécula de glucosa. El hecho de que el proceso se produzca en varias etapas libera la energía de oxidación en forma de pequeños paquetes, de manera que la mayor parte se almacena en moléculas transportadoras en lugar de ser liberada en su totalidad como calor (véase Figura 2-69). Así, parte de la energía liberada en la oxidación produce la síntesis directa de moléculas de ATP a partir de ADP y P_i y, otra parte, se mantiene en los electrones de la molécula transportadora de electrones ricos en energía NADH.

En el transcurso de la glucólisis se forman aproximadamente dos moléculas de NADH por cada molécula de glucosa. En los organismos aeróbicos (aquellos que requieren oxígeno para vivir), estas moléculas de NADH ceden sus electrones a la cadena de transporte de electrones descrita en el Capítulo 14. Estos electrones son conducidos a través de esta cadena hasta el oxígeno molecular (O_2), formando agua, y el NAD^+ formado a partir del NADH se utiliza de nuevo en la glucólisis (véase etapa 6 en el Panel 2–8, pp. 120–121).

Las fermentaciones producen ATP en ausencia de oxígeno

Para la mayoría de las células animales y vegetales, la glucólisis únicamente es un preludio de la fase final de la degradación de las moléculas de los alimentos. En estas células, el piruvato que se forma en la glucólisis penetra con rapidez en las mitocondrias donde se convierte en CO_2 y H_2O.

Sin embargo, en el caso de los organismos anaerobios –que no utilizan oxígeno molecular y pueden crecer y dividirse sin él– la glucólisis es la fuente principal del ATP celular. Esto también es cierto para algunos tejidos animales, como el músculo esquelético, que pueden continuar funcionando a pesar de no disponer de oxígeno molecular. En estas condiciones anaeróbicas, el piruvato y el NADH permanecen en el citosol. El piruvato se transforma en productos de excreción celular –por ejemplo, en etanol y CO_2 en las levaduras utilizadas en la fabricación de cerveza y pan, o en lactato en el músculo. En este proceso, el NADH cede sus electrones y se transforma de nuevo en NAD^+. Esta regeneración del NAD^+ es necesaria para mantener las reacciones de la glucólisis (**Figura 2–71**).

Estas vías anaeróbicas que permiten la producción de energía se denominan **fermentaciones**. Los estudios de las fermentaciones con importancia comercial llevadas a cabo con levaduras inspiraron la mayor parte de la bioquímica en sus estadios iniciales. Los trabajos realizados en el siglo XIX condujeron, en 1896, al relevante descubrimiento de que estos procesos podían estudiarse al margen de organismos vivos, en extractos celulares. Este descubrimiento revolucionario hizo posible estudiar y analizar cada una de las reacciones del proceso de la fermentación. La reconstrucción completa de la glucólisis en la década de 1930 fue el mayor triunfo de la bioquímica y fue rápidamente seguido por el reconocimiento del papel central del ATP en los procesos celulares. Por lo tanto, la mayor parte de los conceptos fundamentales tratados en este capítulo se descubrieron hace muchos años.

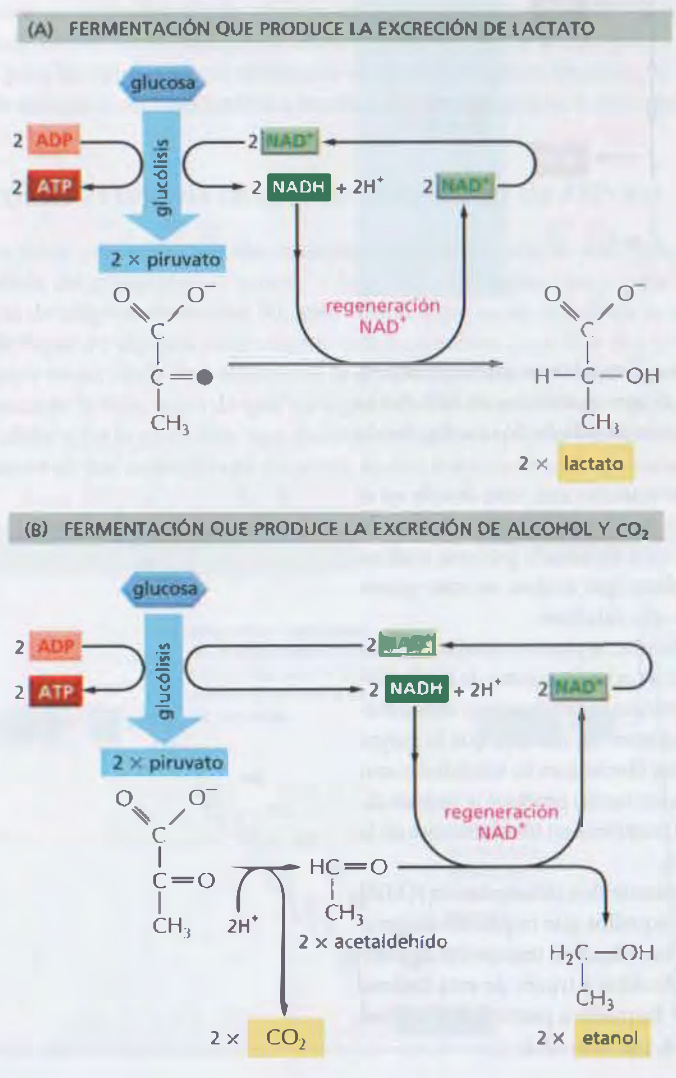


Figura 2–71 Dos vías para la hidrólisis anaeróbica del piruvato. (A) Cuando la cantidad de oxígeno presente no es suficiente, por ejemplo en una fibra muscular sometida a una contracción vigorosa, el piruvato producido en la glucólisis es transformado en lactato, como se muestra en la figura. Esta reacción restablece el NAD^+ consumido en la etapa 6 de la glucólisis, pero toda la vía proporciona mucha menos cantidad de energía que la oxidación completa de la glucosa. (B) En algunos organismos que pueden desarrollarse anaeróbicamente, como las levaduras, el piruvato es transformado en dióxido de carbono y etanol a través de acetaldehído. De nuevo, esta vía regenera el NAD^+ a partir del NADH, tal como se requiere para que la glucólisis pueda continuar. Tanto (A) como (B) son ejemplos de *fermentaciones*.

La glucólisis ilustra de qué forma las enzimas acoplan la oxidación al almacenamiento de energía

Volviendo a la analogía de la "rueda de palas" que hemos utilizado para ilustrar las reacciones acopladas (véase Figura 2–56), ahora podemos equiparar las enzimas a la rueda de palas. Las enzimas recogen la energía útil de la oxidación de las moléculas orgánicas acoplando una reacción energéticamente desfavorable con otra reacción energéticamente favorable. Para demostrar este acoplamiento, examinemos una etapa de la glucólisis.

Dos reacciones centrales de la glucólisis (etapas 6 y 7) transforman el azúcar intermediario de tres átomos de carbono, el gliceraldehído 3-fosfato (un aldehído), en 3-fosfoglicerato (un ácido carboxílico; véase el Panel 2–8, pp. 120-121). Este proceso implica la oxidación de un grupo aldehído a un grupo ácido carboxílico, a través de una reacción que se produce en dos etapas. La reacción global libera una cantidad de energía libre suficiente para transformar una molécula de ADP en ATP y para transferir dos electrones del aldehído al NAD^+, generando NADH, y todavía se libera al medio una cantidad de calor suficiente para hacer que la reacción global sea energéticamente favorable (la $\Delta G°$ para la reacción global es de –3,0 kcal/mol).

En la **Figura 2–72** se ilustra el mecanismo por el que se consigue este hecho remarcable de captación de energía. Las reacciones químicas que se indican están dirigidas de forma precisa por dos enzimas a las que se une fuertemente el azúcar intermediario. De hecho, como se detalla en la Figura 2–72, la primera enzima (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) forma un enlace covalente de vida corta con el aldehído, a través de un grupo reactivo –SH de la enzima, y cataliza su oxidación por el NAD^+ en este estado unido a la enzima. Entonces el enlace reactivo enzima-sustrato es desplazado por un ion fosfato inorgánico y se produce un fosfato intermediario de alta energía, que es liberado por la enzima. Este intermediario se une a una segunda enzima (fosfoglicerato quinasa) la cual cataliza la transferencia energéticamente favorable del fosfato rico en energía acabado de formar al ADP, formando ATP y completando el proceso de oxidación de un aldehído a un ácido carboxílico.

Hemos mostrado en detalle este proceso particular de oxidación porque es un claro ejemplo de almacenamiento de energía mediada por una enzima a través de reacciones acopladas (**Figura 2–73**). Las etapas 6 y 7 son las únicas reacciones de la glucólisis que generan directamente un enlace de fosfato rico en energía a partir de fosfato inorgánico. Como tales, contribuyen al balance neto de dos moléculas de ATP y dos moléculas de NADH por cada molécula de glucosa (véase Panel 2–8, pp. 120–121).

Como acabamos de ver, cuando un intermediario de la reacción contiene un fosfato más rico en energía que el enlace fosfato del ATP, se puede formar directamente ATP a partir de ADP. Los enlaces fosfato se pueden ordenar según su energía, comparando la variación de energía libre estándar ($\Delta G°$) para la rotura de cada enlace por hidrólisis. En la **Figura 2–74** se comparan los enlaces fosfato anhidros ricos en energía del ATP con la energía de algunos otros enlaces fosfato, algunos de los cuales se generan durante la glucólisis.

Los organismos almacenan moléculas de alimento en reservorios especiales

Todos los organismos necesitan mantener una relación ATP/ADP elevada para poder mantener un orden biológico en sus células. Además, el acceso al alimento de los animales únicamente es periódico y las plantas deben sobrevivir durante la noche, sin la luz solar, cuando no son capaces de producir azúcares por fotosíntesis. Por esta razón, tanto las plantas como los animales transforman azúcares y grasas en formas especiales de reserva (**Figura 2–75**).

Para poder sobrevivir a largos periodos de ayuno, los animales almacenan ácidos grasos en forma de gotas compuestas por triacilgliceroles, insolubles en agua, especialmente en el citoplasma de células especializadas del tejido adiposo, denominadas adipocitos. Para almacenamientos a más corto plazo, almacenan azúcares en forma de subunidades de glucosa en forma de glucógeno, un gran polisacárido ramificado que está presente en forma de pequeños gránulos en el citoplasma de muchos tipos celulares, incluidos los del hígado y del músculo. Tanto la síntesis como la degradación del glucógeno están reguladas rápidamente de acuerdo con las necesidades. Cuando una célula necesita más cantidad de ATP del que puede generar a partir de las moléculas de alimento que se encuentran en la sangre, degrada glucógeno a través de reacciones que producen glucosa 1-fosfato, la cual es rápidamente transformada en glucosa 6-fosfato.

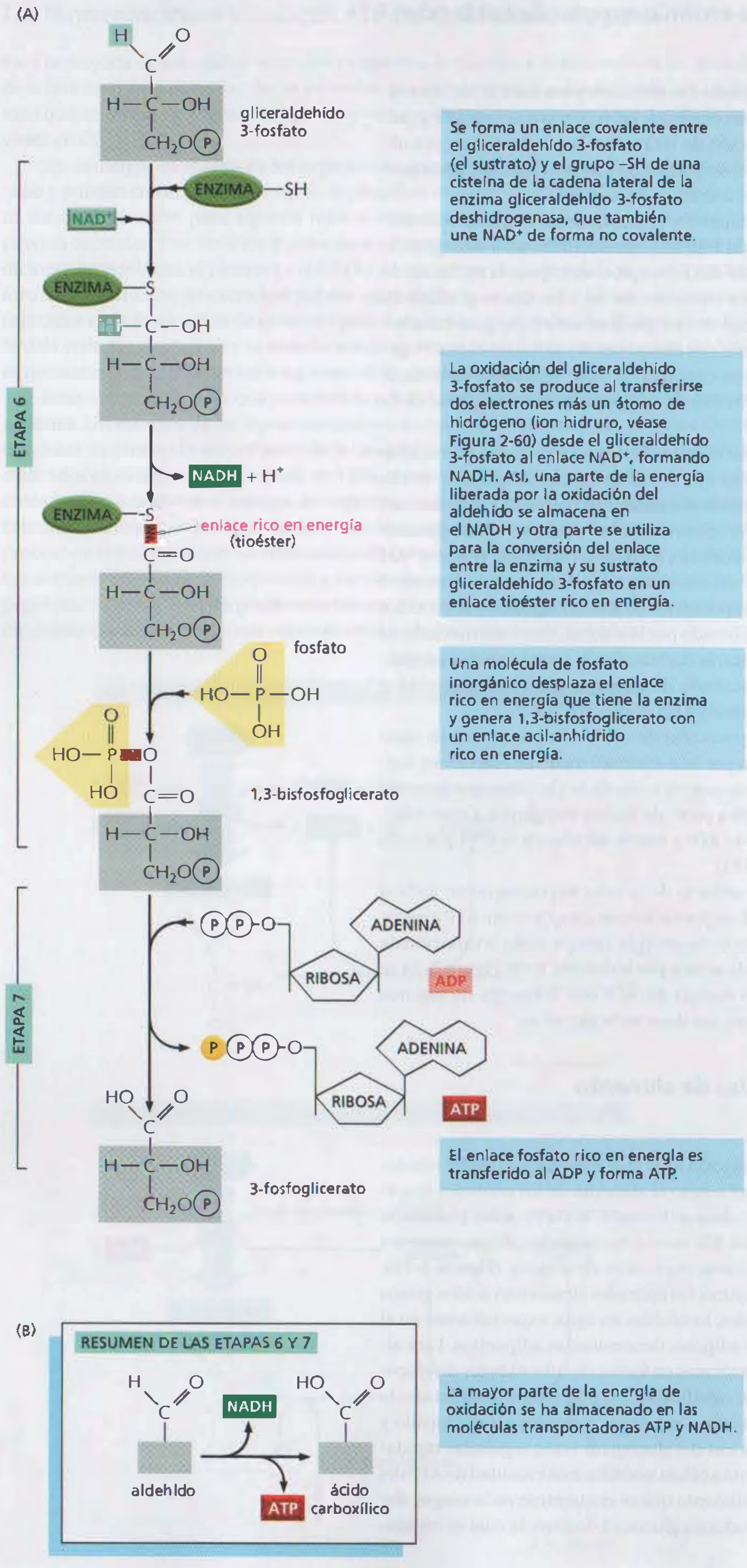


Figura 2–72 Almacenamiento de energía en las etapas 6 y 7 de la glucólisis. En estas etapas, la oxidación de un aldehído a ácido carboxílico se acopla a la formación de ATP y NADH. (A) La etapa 6 se inicia con la formación de un enlace covalente entre el sustrato (gliceraldehído 3-fosfato) y un grupo –SH situado sobre la superficie de la enzima (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa). Entonces la enzima cataliza la transferencia del hidrógeno (en forma de ion hidruro; un protón más dos electrones) desde el gliceraldehído 3-fosfato unido a una molécula de NAD^+. Parte de la energía liberada en esta oxidación se utiliza para formar una molécula de NADH y otra parte se utiliza para transformar el enlace original entre la enzima y su sustrato en un enlace tioéster de alta energía (mostrado en *rojo*). Luego, una molécula de fosfato inorgánico desplaza este enlace rico en energía de la enzima y genera en su lugar un enlace azúcar–fosfato rico en energía (*rojo*). Llegado a este punto, la enzima no sólo ha almacenado energía (en el NADH), sino que también ha acoplado la oxidación, energéticamente favorable, de un aldehído a la formación energéticamente desfavorable de un enlace fosfato rico en energía. La segunda reacción ha sido impulsada por la primera, actuando así como la "rueda de palas" acopladora de la Figura 2-56.

En la reacción de la etapa 7, el intermediario azúcar–fosfato rico en energía acabado de formar, el 1,3-bisfosfoglicerato, se une a una segunda enzima, la fosfoglicerato quinasa. El fosfato reactivo es transferido a ADP, forma una molécula de ATP y deja un grupo carboxilo libre en el azúcar oxidado.

(B) Resumen del cambio químico global producido por las reacciones 6 y 7.

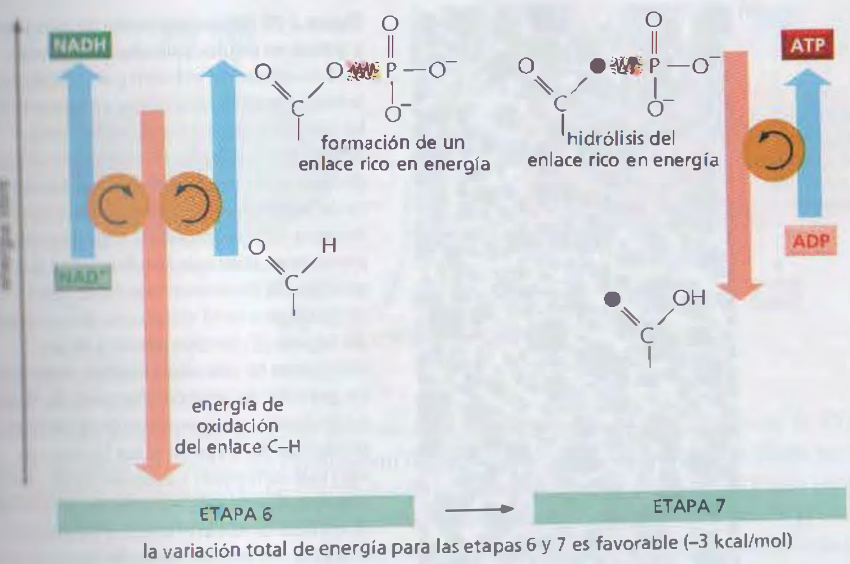


Figura 2–73 Representación esquemática de las reacciones acopladas que forman NADH y ATP en las etapas 6 y 7 de la glucólisis. La energía de oxidación del enlace C–H impulsa la formación de NADH y de un enlace fosfato rico en energía. Entonces, la hidrólisis del enlace rico en energía impulsa la formación de ATP.

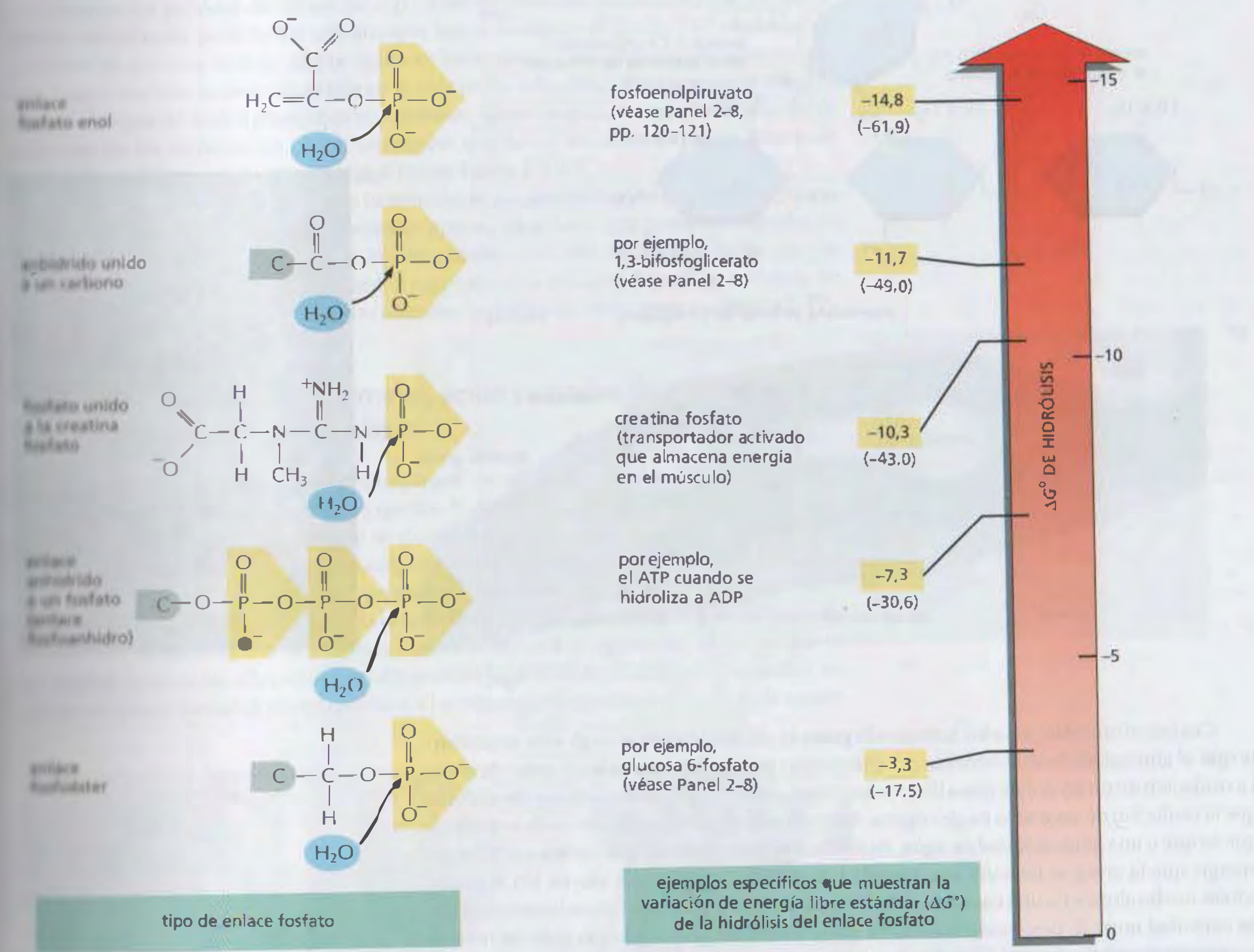
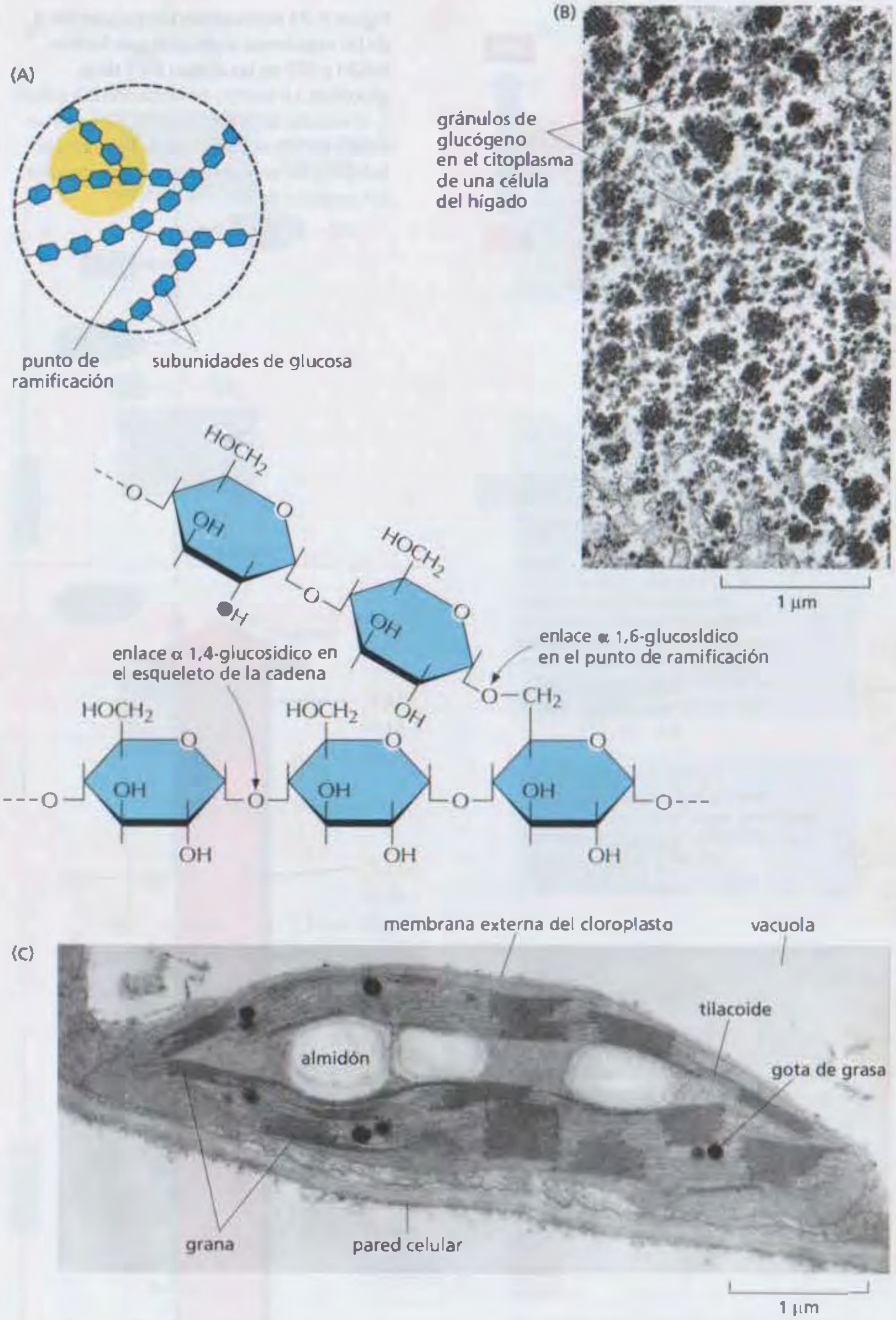


Figura 2–74 Los enlaces fosfato tienen energías diferentes. Se muestran ejemplos de diferentes tipos de enlaces fosfato con sus lugares de hidrólisis (moléculas de la izquierda). Las que empiezan con un átomo de carbono *gris* únicamente muestran una parte de la molécula. A la derecha se muestran ejemplos de moléculas que contienen enlaces del tipo de que se trata, con la variación de energía libre de hidrólisis en kilocalorías (entre paréntesis en kilojulios). La transferencia de un grupo fosfato desde cualquier molécula a otra es energéticamente favorable si la variación de energía libre estándar (ΔG°) para la hidrólisis del enlace fosfato de la primera molécula es más negativa que la de la hidrólisis del enlace fosfato de la segunda molécula. Así, por ejemplo, un grupo fosfato es transferido fácilmente del 1,3-bifosfoglicerato al ADP para formar ATP. La reacción de hidrólisis puede ser interpretada como la transferencia del grupo fosfato al agua.



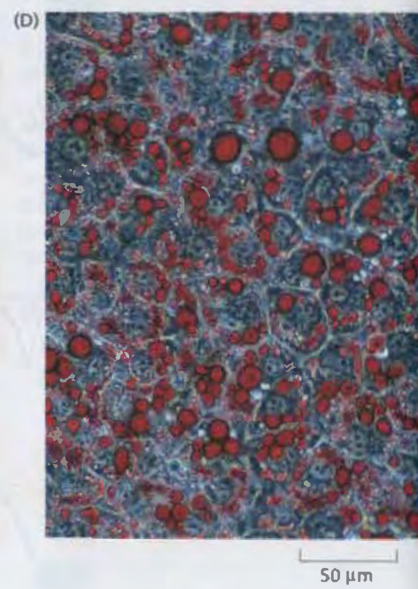


Figura 2-75 Almacenamiento de azúcares y grasas en células animales y vegetales. (A) Estructuras del almidón y del glucógeno, la forma de almacenamiento de azúcares en las plantas y animales, respectivamente. Ambos son polímeros de reserva del azúcar glucosa y sólo se diferencian en la frecuencia de las ramificaciones (la región en *amarillo* se muestra debajo, ampliada). El glucógeno presenta muchas más ramificaciones que el almidón. (B) Electromicrografía de gránulos de glucógeno en el citoplasma de una célula del hígado. (C) Sección ultrafina de un cloroplasto de una célula vegetal, mostrando los gránulos de almidón y las gotas de lípido acumulados como resultado de la biosíntesis producida. (D) Gotas de grasa (teñidas en *rojo*) que comienzan a acumularse en células adiposas durante el desarrollo de un animal. (B, cortesía de Robert Fletterick y Daniel S. Friend; C, cortesía de Ronald M. Evans y Peter Totonoz.)

Cuantitativamente, para los animales la **grasa** es un almacén de energía más importante que el glucógeno, probablemente porque constituye un almacenamiento más eficiente. La oxidación de un gramo de grasa libera una cantidad de energía aproximadamente el doble que la oxidación de un gramo de glucógeno. Además, el glucógeno se diferencia de la grasa en que se une a una gran cantidad de agua, de forma que para almacenar la misma cantidad de energía que la grasa se necesita una cantidad de glucógeno seis veces mayor. Un humano adulto medio almacena una cantidad de glucógeno suficiente para aproximadamente un día de actividad normal, pero una cantidad de grasa suficiente como mínimo para un mes. Si nuestras reservas de energía se tuvieran que almacenar en forma de glucógeno en lugar de hacerlo en forma de grasa, nuestro peso corporal se incrementaría unos 27 kilos.

A pesar de que las plantas producen NADPH y ATP a través de la fotosíntesis, este importante proceso ocurre en un orgánulo especializado llamado cloroplasto, el cual se encuentra aislado del resto de la célula vegetal mediante una membrana que es impermeable a ambos tipos de transportadores activados. Además, la planta contiene muchos otros tipos celulares (como todos los de las raíces) que no tienen cloroplastos, por lo que no pueden

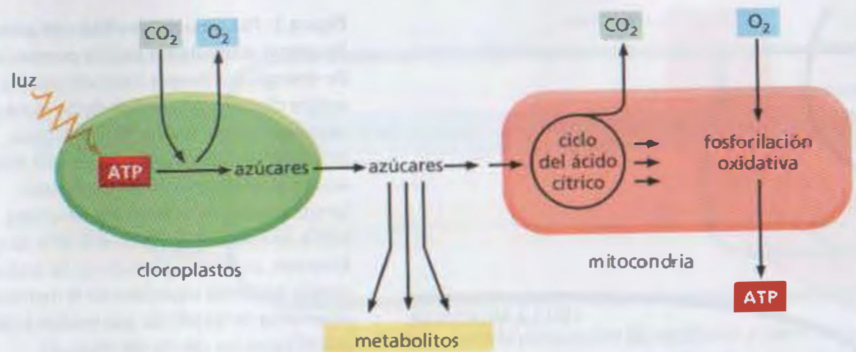


Figura 2-76 Cómo se fabrica el ATP necesario para el metabolismo de la mayoría de las células vegetales. En las plantas, los cloroplastos y las mitocondrias colaboran entre sí aportando metabolitos y ATP a las células (para más detalles véase el Capítulo 14).

producir sus propios azúcares. Por lo tanto, para la mayor parte de su producción de ATP, la planta requiere un sistema de exportación de azúcares desde los cloroplastos hasta las mitocondrias, localizadas en todas las células de la planta. La mayor parte del ATP que necesita la planta se sintetiza en estas mitocondrias utilizando exactamente los mismos procesos para la degradación oxidativa de los azúcares que los organismos no fotosintéticos y se transporta desde ellas al resto de las células (**Figura 2–76**).

Durante los periodos de exceso de capacidad fotosintética (durante el día) los cloroplastos transforman parte de los azúcares que han sintetizado, en grasas y en **almidón**, un polímero de glucosas análogo al glucógeno de los animales. Las grasas de las plantas son triacilgliceroles, exactamente igual que en el caso de los animales, y únicamente se diferencian en los tipos de ácidos grasos que predominan. Tanto las grasas como el almidón se almacenan en los cloroplastos como reservorios que serán movilizados como fuente de energía durante los periodos de oscuridad (véase Figura 2–75C).

Los embriones, situados dentro de las semillas de las plantas, tienen que vivir a expensas de los almacenes de energía durante periodos prolongados, hasta que germinan y producen hojas que pueden captar energía solar. Por esta razón a menudo las semillas de las plantas contienen cantidades de grasa y de almidón especialmente elevadas, lo cual las convierte en importantes fuentes de alimento para los animales, incluidos nosotros mismos (**Figura 2–77**).

La mayoría de las células animales, entre periodos de alimentación, obtienen su energía de las grasas

Tras una ingesta, la mayor parte de la energía que necesita un animal se obtiene a partir de los azúcares procedentes del alimento ingerido. El exceso de azúcares, si lo hay, se utiliza para volver a llenar los almacenes vacíos de glucógeno o para sintetizar grasa. Pero pronto se utiliza la grasa almacenada en el tejido adiposo y por la mañana, tras el ayuno de la noche, la mayor parte del ATP que necesitamos procede de la oxidación de los ácidos grasos.

Unos bajos niveles de glucosa en la sangre disparan la degradación de grasa para la obtención de energía. Como se ilustra en la **Figura 2–78**, los triacilgliceroles almacenados en las gotas de grasa de los adipocitos son hidrolizados produciendo ácidos grasos y glicerol; estos ácidos grasos liberados son transferidos a las células del organismo a través de la sangre.



Figura 2–77 Algunas semillas de plantas que se utilizan como alimentos importantes para los humanos. El maíz, las nueces y los guisantes contienen importantes reservas de almidón y de grasa en las semillas, que proporcionan al embrión de la nueva planta, energía y unidades para la biosíntesis. (Cortesía de la John Innes Foundation.)

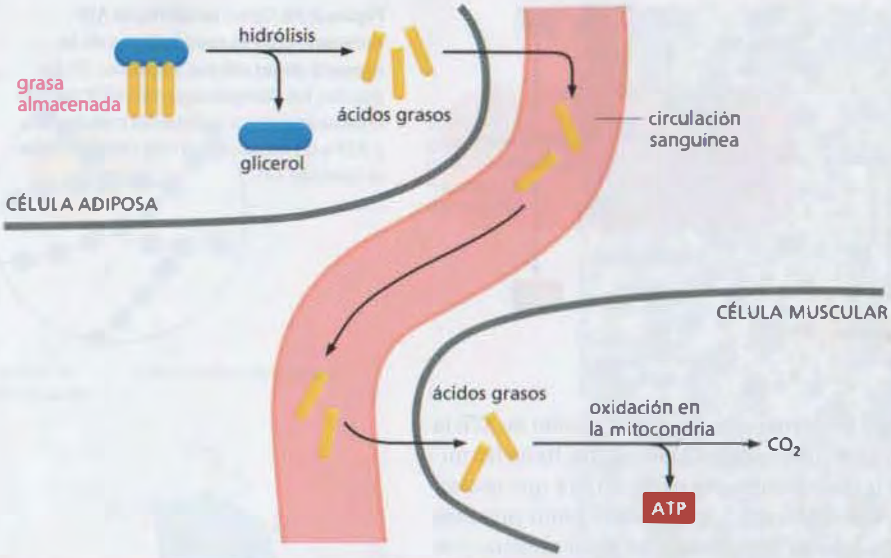


Figura 2–78 Cómo se movilizan en animales las grasas acumuladas para la producción de energía. Los niveles bajos de glucosa en la sangre disparan la hidrólisis de las moléculas de triacilgliceroles de las gotas de grasa, produciendo ácidos grasos y glicerol. Estos ácidos grasos entran en la circulación sanguínea donde se unen a la albúmina sérica, una abundante proteína de la sangre. Entonces, unos transportadores de ácidos grasos, proteínas especiales de la membrana plasmática de las células que oxidan ácidos grasos como las células del músculo, permiten que estos ácidos grasos pasen al citosol, desde donde se desplazan hasta la mitocondria para la producción de energía (véase la Figura 2–80).

Sin embargo, los animales pueden transformar azúcares en grasa pero no grasa en azúcares. Por este motivo, estos ácidos grasos deben ser oxidados de forma directa.

Los azúcares y las grasas son degradados a acetil CoA en la mitocondria

En el metabolismo aeróbico, el piruvato, producido por la glucólisis a partir de los azúcares en el citosol, se transporta al interior de la *mitocondria* de las células eucariotas y es rápidamente descarboxilado por un complejo gigante de tres enzimas, denominado *complejo piruvato deshidrogenasa.* Los productos resultado de la descarboxilación del piruvato son una molécula de CO_2 (un producto de deshecho), una molécula de NADH y una de acetil CoA (**Figura 2–79**).

Los ácidos grasos importados desde la sangre son trasladados hasta la mitocondria y oxidados (**Figura 2–80**). Cada molécula de ácido graso (en forma activada *acil graso CoA*) es hidrolizada por completo mediante un ciclo de reacciones que cada vez elimina dos átomos de carbono de su extremo carboxilo y genera una molécula de acetil CoA en cada vuelta del ciclo. En este proceso también se produce una molécula de NADH y una de $FADH_2$ (**Figura 2–81**).

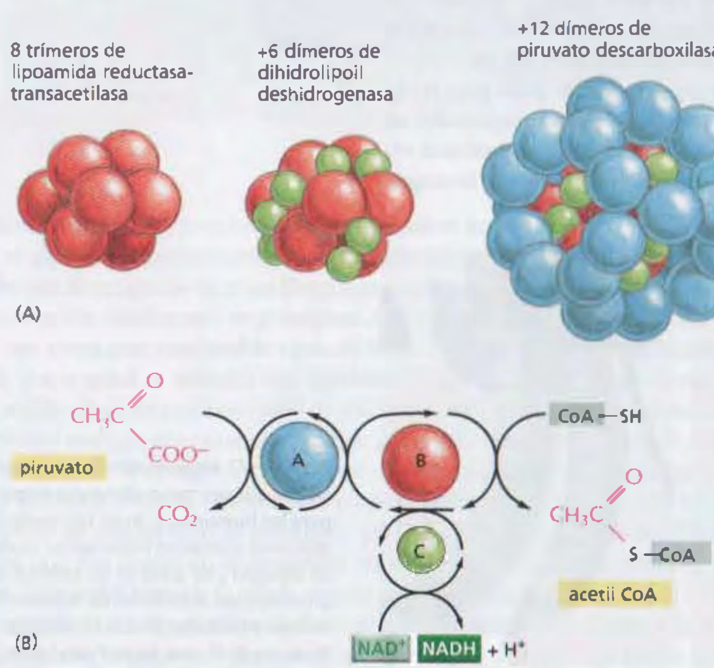


Figura 2–79 Oxidación del piruvato a acetil CoA y CO_2. (A) Estructura del complejo piruvato deshidrogenasa, que contiene 60 cadenas polipeptídicas. Se trata de un ejemplo de un gran complejo multienzimático en el que los intermediarios de la reacción pasan directamente de una enzima a otra. En células eucariotas se localiza en la mitocondria. (B) Reacciones catalizadas por el complejo de la piruvato deshidrogenasa. El complejo transforma el piruvato en acetil CoA en la matriz mitocondrial; en esta reacción también se produce NADH. A, B y C son las tres enzimas *piruvato descarboxilasa, lipoamida reductasa-transacetilasa* y *dihidrolipoil deshidrogenasa,* respectivamente. Estas enzimas, sus actividades y la relación entre ellas se ilustran en (A).

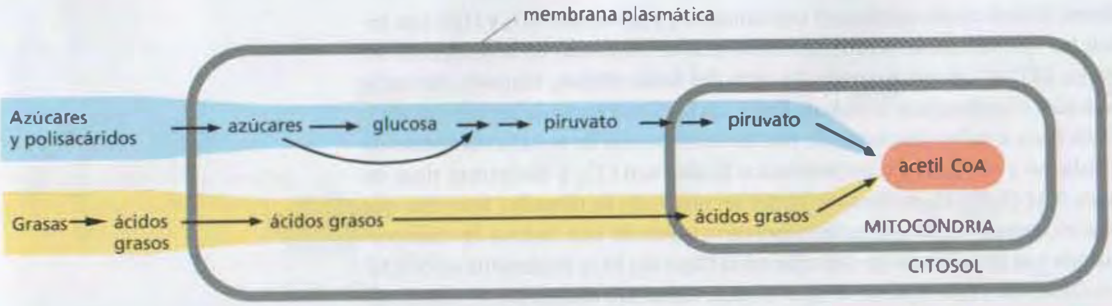


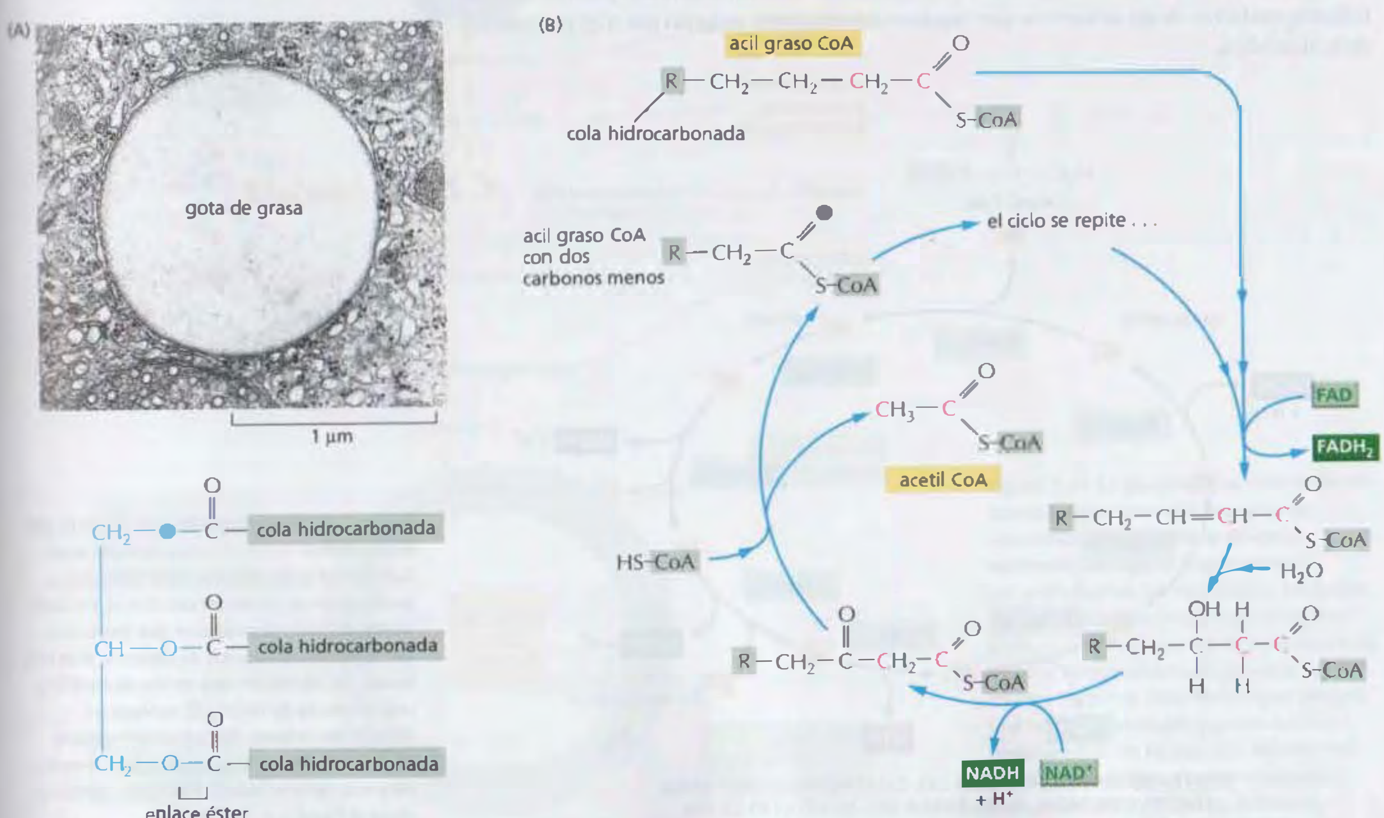
Figura 2–80 Rutas para la producción de acetil CoA a partir de azúcares y grasas. Las mitocondrias de las células eucariotas son el lugar de producción del acetil CoA a partir de los dos principales tipos de moléculas de nutrientes. Por lo tanto, es el lugar en el que se produce la mayoría de reacciones de oxidación de la célula y la mayor parte de su ATP. La estructura y la función de la mitocondria se tratan en el Capítulo 14.

Los azúcares y las grasas constituyen las principales fuentes de energía para la mayoría de organismos no fotosintéticos, incluyendo el hombre. Sin embargo, la mayor parte de la energía útil que puede ser extraída de la oxidación de ambos tipos de nutrientes permanece almacenada en las moléculas de acetil CoA que se producen en los dos tipos de reacciones que acabamos de describir. Por lo tanto, el ciclo de reacciones del ciclo del ácido cítrico, en el que el grupo acetil del acetil CoA es oxidado a CO_2 y H_2O, es en proceso central en el metabolismo energético de los organismos aeróbicos. En las células eucariotas todas estas reacciones tienen lugar en la mitocondria. Por lo tanto no nos debe sorprender que la mitocondria sea el lugar donde se produce la mayor parte del ATP de las células animales. En cambio, las bacterias aeróbicas realizan todas sus reacciones en un solo compartimiento, el citosol, en el que tiene lugar el ciclo del ácido cítrico en estas células.

El ciclo del ácido cítrico genera NADH mediante la oxidación de grupos acetilo hasta CO_2

En el siglo XIX, se observó que en ausencia de aire (condiciones anaeróbicas) las células producen ácido láctico (p. ej., en el músculo) o etanol (p. ej., en las levaduras), mientras que en

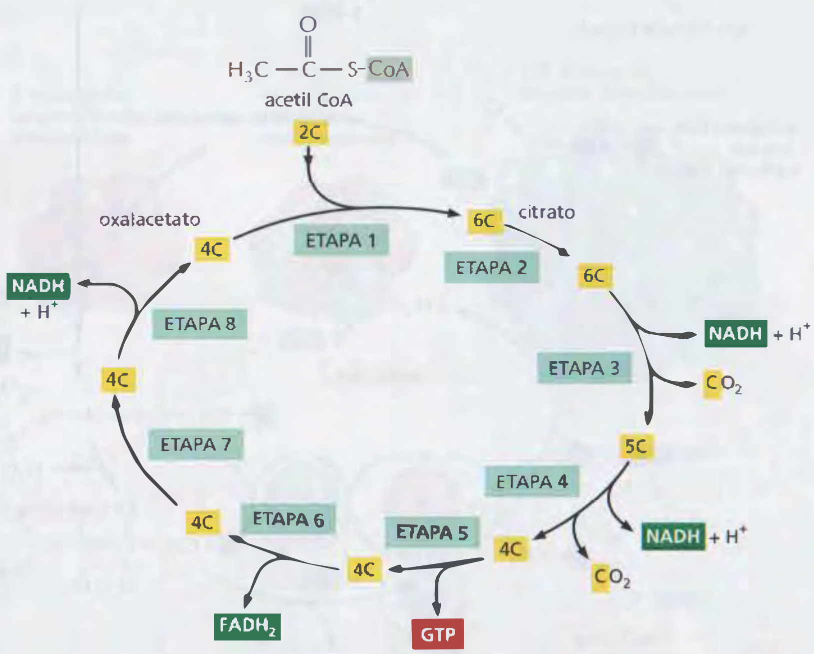
Figura 2–81 Oxidación de los ácidos grasos a acetil CoA. (A) Electromicrografía de una gota de grasa en el citoplasma (*arriba*) y la estructura de las grasas (*debajo*). Las grasas son triacilgliceroles. La parte del glicerol, a la que se unen tres ácidos grasos mediante enlaces éster, se muestra en *azul*. Las grasas son insolubles en agua y forman grandes gotas de lípido en las células grasas especializadas (denominadas adipocitos) en las que se almacenan. (B) Ciclo de oxidación de los ácidos grasos. El ciclo está catalizado por una serie de cuatro enzimas en la mitocondria. Cada vuelta del ciclo disminuye la longitud de la cadena de ácido graso en dos carbonos (mostrado en *rojo*) y genera una molécula de acetil CoA, una molécula de NADH y una de $FADH_2$. La estructura del $FADH_2$ puede consultarse en la Figura 2–83B. (A, cortesía de Daniel S. Friend.)



presencia de oxígeno (condiciones aeróbicas) consumen O_2 y producen CO_2 y H_2O. Los estudios para definir las vías del metabolismo aeróbico, que se centraron en la oxidación del piruvato, llevaron en 1937 al descubrimiento del **ciclo del ácido cítrico**, también conocido como *ciclo de los ácidos tricarboxílicos* o *ciclo de Krebs*. En la mayor parte de las células, el ciclo del ácido cítrico lleva a cabo alrededor de dos terceras partes de toda la oxidación de compuestos de carbono y sus principales productos finales son CO_2 y electrones ricos en energía en forma de NADH. El CO_2 es liberado como un producto de desecho, mientras que los electrones ricos en energía del NADH se transportan a través de una cadena de transporte de electrones unida a la membrana (se describe en el Capítulo 14) y finalmente se combinan con el O_2 produciendo H_2O. A pesar de que el ciclo del ácido cítrico por sí mismo no utiliza O_2, necesita O_2 porque no existe ninguna otra vía eficiente para que el NADH pueda desprenderse de sus electrones y generar así el NAD^+ necesario para mantener el ciclo funcionando.

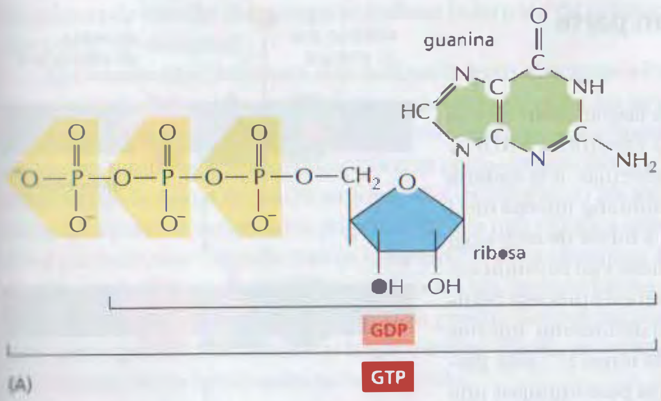
El ciclo del ácido cítrico tiene lugar en el interior de la mitocondria de las células eucariotas y produce la oxidación completa de los átomos de carbono de los grupos acetilo del acetil CoA, transformándolos en CO_2, pero el grupo acetilo no se oxida directamente. Por el contrario, el grupo acetilo es transferido desde el acetil CoA hasta una molécula mayor, de cuatro carbonos, el *oxalacetato*, formando el ácido tricarboxílico de seis carbonos, el *ácido cítrico*, que da nombre al siguiente ciclo de reacciones. Entonces, la molécula de ácido cítrico se oxida gradualmente y permite que la energía de esta oxidación sea utilizada para producir moléculas transportadoras ricas en energía. La cadena de ocho reacciones forma un ciclo, porque al final de ellas, se regenera el oxalacetato, que inicia una nueva vuelta del ciclo, tal como se esboza en la **Figura 2–82**.

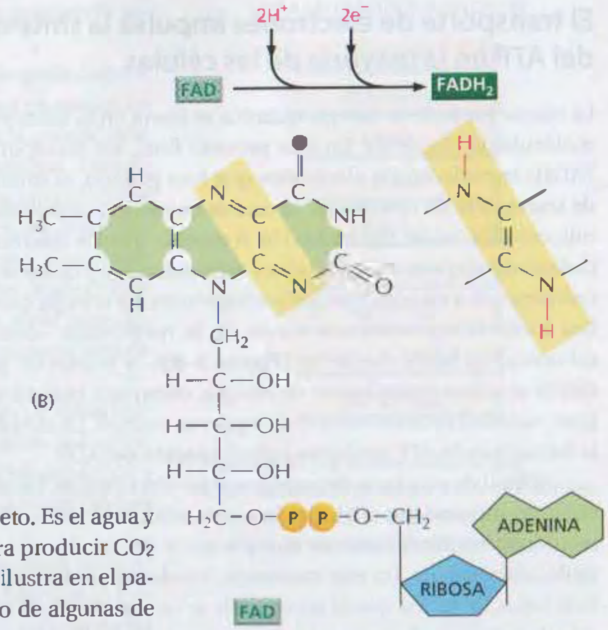
Sólo se ha comentado hasta ahora uno de los tres tipos de moléculas transportadoras que se producen en el ciclo del ácido cítrico, el par NAD^+-NADH (véase la Figura 2–60). Además de las tres moléculas de NADH, en cada vuelta del ciclo también se produce una molécula de **$FADH_2$** (flavina adenina dinucleótido reducido) a partir de FAD y una molécula del ribonucleótido **GTP** (guanosina trifosfato) a partir de GDP. En la **Figura 2–83** se ilustran las estructuras de estas dos moléculas transportadoras activadas. El GTP está estrechamente relacionado con el ATP y la transferencia de su grupo fosfato terminal al ADP produce una molécula de ATP en cada una de las vueltas. Como el NADH, el $FADH_2$ es un transportador de electrones ricos en energía y de hidrógeno. Como se ha comentado, la energía que se almacena en los electrones fácilmente transferibles del NADH y del $FADH_2$ será utilizada para la producción de ATP, mediante el proceso de *fosforilación oxidativa*, el único paso en el catabolismo oxidativo de los alimentos que requiere directamente oxígeno gas (O_2) procedente de la atmósfera.



RESULTADO NETO: UNA VUELTA DEL CICLO PRODUCE TRES NADH, UN GTP Y UN $FADH_2$, Y SE LIBERAN DOS MOLÉCULAS DE CO_2

Figura 2–82 Visión simplificada del ciclo del ácido cítrico. <TAGT> La reacción del acetil CoA con el oxalacetato inicia el ciclo con la producción de citrato (ácido cítrico). En cada vuelta del ciclo se producen dos moléculas de CO_2 como productos de desecho, más tres moléculas de NADH, una molécula de GTP y una molécula de $FADH_2$. El número de átomos de carbono de cada intermediario se muestra dentro de un *rectángulo amarillo*. Para más detalles sobre el proceso completo, véase el Panel 2-9 (pp. 122-123).





En el Panel 2–9 (pp. 122–123) se presenta el ciclo del ácido cítrico completo. Es el agua y no el oxígeno molecular la que aporta los átomos de oxígeno necesarios para producir CO_2 a partir de los grupos acetil que entran en el ciclo del ácido cítrico. Como se ilustra en el panel, en cada ciclo se rompen tres moléculas de agua y los átomos de oxígeno de algunas de ellas se utilizan finalmente para producir CO_2.

Además del piruvato y de los ácidos grasos, algunos aminoácidos pasan del citosol al interior de la mitocondria, donde son transformados en acetil CoA o en otros intermediarios. Así, en las células eucariotas las mitocondrias son el centro de todos los procesos productores de energía, tanto si comienzan en azúcares, en grasas o en proteínas.

Tanto el ciclo del ácido cítrico como la glucólisis actúan como puntos de origen de importantes reacciones biosintéticas, debido a que en él se producen compuestos vitales, como el *oxalacetato* y el *α-cetoglutarato*. Algunos de estos compuestos producidos por el catabolismo son transferidos de nuevo desde la mitocondria al citosol, donde se utilizan en reacciones anabólicas como precursores de la síntesis de algunas moléculas esenciales, como por ejemplo los aminoácidos (**Figura 2–84**).

Figura 2–83 Estructura del GTP y del $FADH_2$. (A) El GTP y el GDP están muy relacionados con el ATP y el ADP, respectivamente. (B) El $FADH_2$ es un transportador de hidrógenos y de electrones ricos en energía, como el NADH y el NADPH. Aquí se muestra en su forma oxidada (FAD) con los átomos transportadores de electrones resaltados en *amarillo*.

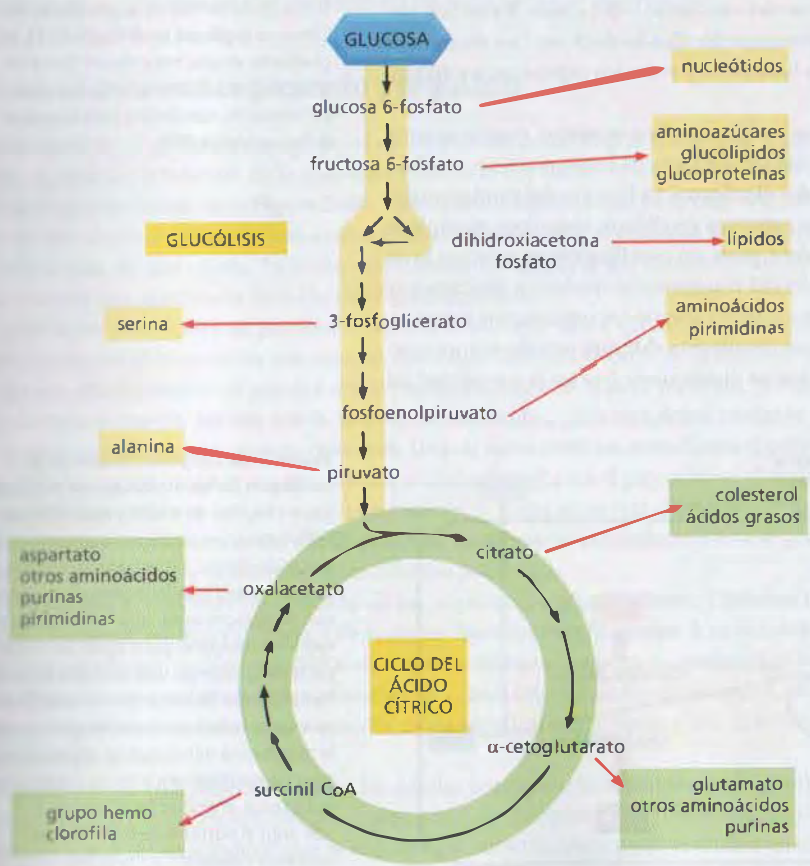


Figura 2–84 La glucólisis y el ciclo del ácido cítrico proporcionan los precursores necesarios para la síntesis de varias moléculas biológicas importantes. Los aminoácidos, los nucleótidos, los lípidos, los azúcares y otras moléculas –en cuanto productos– sirven a su vez de precursores de muchas otras macromoléculas de la célula. En este diagrama cada *flecha negra* designa una reacción catalizada por una enzima; generalmente las *flechas rojas* representan vías de varias etapas que son necesarias para producir los productos indicados.

El transporte de electrones impulsa la síntesis de gran parte del ATP en la mayoría de las células

La mayor parte de la energía química se libera en la última etapa de la degradación de una molécula de nutriente. En este proceso final, los transportadores de electrones NADH y $FADH_2$ transfieren los electrones que han ganado, al oxidar otras moléculas, a la **cadena de transporte de electrones**, la cual se encuentra embebida en la membrana interna de la mitocondria (véase Figura 14–10). A medida que los electrones pasan a través de esta larga cadena de aceptores de electrones especializados y de moléculas dadoras, van cayendo sucesivamente a estados energéticos inferiores. La energía que se libera en este proceso bombea iones H^+ (protones) a través de la membrana –desde el compartimiento interior mitocondrial hacia el exterior (**Figura 2–85**)– y genera un gradiente de iones H^+. Este gradiente se utiliza como fuente de energía, como una batería, que se utiliza para impulsar una gran variedad de reacciones que requieren energía. La más destacada de estas reacciones es la formación de ATP mediante la fosforilación del ADP.

Al final de esta serie de transferencias electrónicas, los electrones se transfieren a moléculas de oxígeno gas (O_2) que han difundido al interior de la mitocondria, los cuales se combinan simultáneamente con protones (H^+) de la solución circundante para producir moléculas de agua. En este momento, los electrones han alcanzado sus niveles energéticos más bajos, de forma que al ser oxidada se ha extraído toda la energía disponible de la molécula de nutriente. Este proceso, denominado **fosforilación oxidativa** (**Figura 2–86**), también tiene lugar en la membrana plasmática de las bacterias. De hecho, se trata de uno de los logros más remarcables de la evolución celular, y será el tema central del Capítulo 14.

En resumen, la célula utiliza la oxidación completa de una molécula de glucosa hasta H_2O y CO_2 para producir unas 30 moléculas de ATP. En cambio, en la glucólisis sólo se producen 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa.

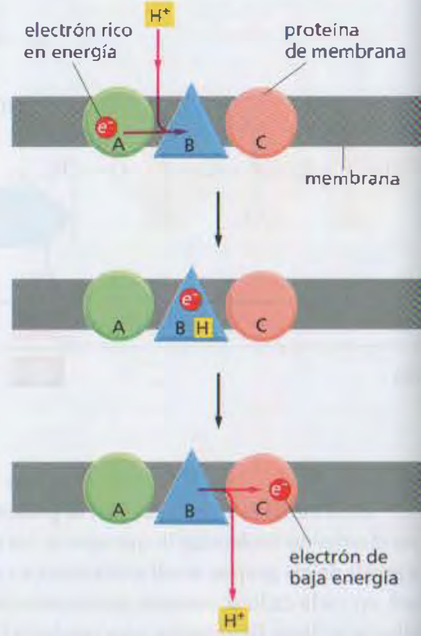


Figura 2–85 Generación de un gradiente de H^+ a través de la membrana mitocondrial, mediante las reacciones de transporte de electrones. Un electrón altamente energético (derivado, por ejemplo, de la oxidación de un metabolito) pasa secuencialmente por los transportadores A, B y C hasta un estado de menor energía. En este diagrama, el transportador B está dispuesto en la membrana de forma que, a medida que pasa el electrón, capta un H^+ de un lado de la membrana y lo libera en el otro lado. El resultado de ello es un gradiente de H^+. Como se explicará en el Capítulo 14, este gradiente es una importante forma de energía que es aprovechada por otras proteínas de membrana para impulsar la formación de ATP.

Los aminoácidos y los nucleótidos forman parte del ciclo del nitrógeno

Hasta el momento, nos hemos centrado principalmente en el metabolismo de los carbohidratos y no hemos tratado todavía del metabolismo del nitrógeno o del azufre. Estos dos elementos son constituyentes importantes de las macromoléculas biológicas. Los átomos de nitrógeno y de azufre pasan desde un compuesto hasta otro y entre los organismos y su ambiente a través de una serie de ciclos reversibles.

Aunque el nitrógeno molecular es abundante en la atmósfera terrestre, químicamente no es reactivo como gas. Sólo algunas especies vivas son capaces de incorporarlo a moléculas orgánicas; este proceso se denomina **fijación del nitrógeno**. La fijación del nitrógeno tiene lugar en ciertos microorganismos y en algunos procesos geofísicos, como por ejemplo la descarga de un rayo. Es esencial para toda la biosfera, pues sin esta fijación no existiría la vida en este planeta. Pero el producto de la fijación del nitrógeno atmosférico únicamente constituye una pequeña parte de los compuestos nitrogenados de los organismos actuales. La mayor parte del nitrógeno orgánico ha estado en circulación durante mucho tiempo, pasando de un organismo vivo a otro. Por consiguiente se puede decir que en la actualidad las

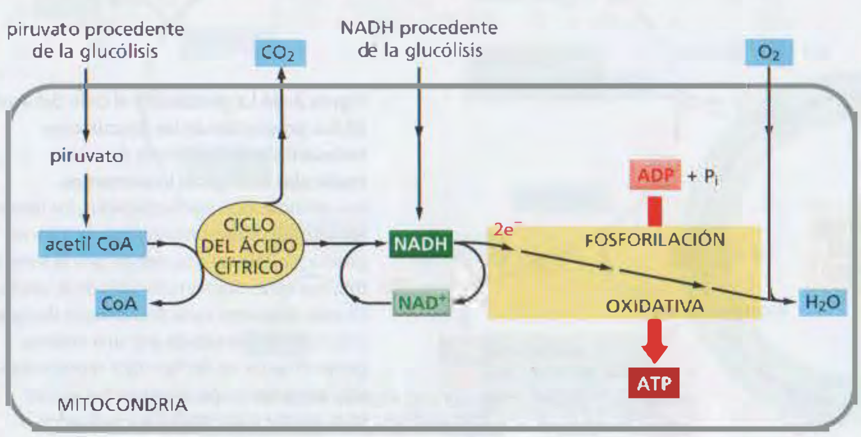


Figura 2–86 Los pasos finales de la oxidación de las moléculas de nutrientes. Las moléculas de NADH y de $FADH_2$ (el $FADH_2$ no se muestra) se producen en el ciclo del ácido cítrico. Estos transportadores activos ceden los electrones ricos en energía, que posteriormente serán utilizados para reducir el oxígeno gas a agua. La mayor parte de la energía que se libera durante la transferencia de electrones a lo largo de una cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna (o en la membrana plasmática de las bacterias) se utiliza para impulsar la síntesis de ATP –de aquí el nombre de fosforilación oxidativa (véase el Capítulo 14).

reacciones de fijación del nitrógeno realizan la función de mantener llena al máximo la reserva total de nitrógeno.

Los vertebrados prácticamente reciben todo su nitrógeno a través de la ingesta de proteínas y ácidos nucleicos. En el cuerpo, estas macromoléculas se transforman en sus componentes aminoácidos y nucleótidos; el nitrógeno que contienen se usa en la producción de nuevas proteínas y ácidos nucleicos o es utilizado para fabricar otras moléculas. Aproximadamente la mitad de los 20 aminoácidos existentes en las proteínas son aminoácidos esenciales para los vertebrados (**Figura 2–87**), lo que significa que no pueden ser sintetizados a partir de otros ingredientes de la dieta. El resto se sintetizan a partir de una gran variedad de materiales precursores, que incluyen a los intermediarios del ciclo del ácido cítrico descritos. Los aminoácidos esenciales son producidos por las plantas y por otros organismos, por lo general a través de vías largas y energéticamente costosas que en el transcurso de la evolución de los vertebrados se han perdido.

Los nucleótidos necesarios para fabricar RNA y DNA se sintetizan a través de rutas biosintéticas especializadas. Todo el nitrógeno de las bases purínicas y pirimidínicas (así como parte del carbono) derivan de distintos aminoácidos como la glutamina, el ácido aspártico y la glicina, mientras que la ribosa y la desoxirribosa se obtienen a partir de la glucosa. No hay "nucleótidos esenciales" que hayan de ser adquiridos a través de la dieta.

Los aminoácidos no utilizados en la biosíntesis pueden ser oxidados y generar, en consecuencia, energía metabólica. La mayoría de sus átomos de carbono y de hidrógeno forman finalmente CO_2 y H_2O, mientras que sus átomos de nitrógeno pasan a través de varias formas hasta aparecer en forma de urea, que es excretada. Cada aminoácido se transforma de una manera diferente y para su catabolismo existe toda una constelación de reacciones enzimáticas.

El azufre es abundante en la Tierra en su forma más oxidada, el sulfato (SO_4^{2-}). Para transformarlo en formas utilizables para la vida, el sulfato debe ser reducido a sulfuro (S^{2-}), el estado de oxidación del azufre necesario para la síntesis de moléculas biológicas esenciales, como los aminoácidos metionina y cisteína, el coenzima A (véase la Figura 2–62) y los centros de hierro-azufre esenciales para el transporte electrónico (véase Figura 14–23). El proceso empieza en las bacterias, hongos y plantas, en los que un grupo especial de enzimas utilizan ATP y poder reductor para generar un proceso de asimilación de azufre. Los humanos y otros animales no podemos reducir sulfato, por lo que hemos de adquirir el sulfuro que necesitamos para nuestro metabolismo en los alimentos que ingerimos.

LOS AMINOÁCIDOS ESENCIALES

- TREONINA
- METIONINA
- LISINA
- VALINA
- LEUCINA
- ISOLEUCINA
- HISTIDINA
- FENILALANINA
- TRIPTÓFANO

Figura 2–87 Los nueve aminoácidos esenciales. Estos aminoácidos no pueden ser sintetizados por las células humanas por lo que han de ser adquiridos en la dieta.

El metabolismo está organizado y regulado

Se puede apreciar el grado de complejidad de una célula considerada como una máquina química, a partir de la relación de la glucólisis y del ciclo del ácido cítrico con otras vías metabólicas esquematizadas en la **Figura 2–88**. Este tipo de esquema que ya se utilizó anteriormente en este capítulo como introducción al metabolismo, sólo representa algunas de las vías enzimáticas de una célula. Es obvio que nuestra descripción del metabolismo celular sólo ha tratado una minúscula fracción de la química celular.

Todas estas reacciones se producen en una célula que tiene un diámetro inferior a 0,1 mm y cada reacción necesita una enzima diferente. Como se deduce de la Figura 2–88, a menudo una misma molécula puede formar parte de diferentes vías. El piruvato, por ejemplo, es sustrato de media docena o más de enzimas diferentes, cada una de los cuales lo modifica químicamente de una manera diferente. Una de estas enzimas transforma el piruvato en acetil CoA, otra en oxalacetato; una tercera enzima transforma el piruvato en el aminoácido alanina, una cuarta en lactato, y así sucesivamente. Todas estas vías diferentes entran en competencia por una misma molécula de piruvato. Competencias similares a ésta se producen simultáneamente por otros miles de moléculas pequeñas.

La situación es aún más complicada en los organismos pluricelulares. Distintos tipos celulares requieren, en general, grupos de enzimas ligeramente diferentes. A su vez diferentes tejidos contribuyen de forma distinta a la química del organismo en su conjunto. Además de las diferencias en productos especializados como las hormonas o los anticuerpos, existen diferencias significativas en las vías metabólicas "habituales" entre varios tipos de células de un mismo organismo.

A pesar de que prácticamente todas las células contienen las enzimas de la glucólisis, del ciclo del ácido cítrico, de la síntesis y degradación de los lípidos y del metabolismo de los aminoácidos, el nivel de actividad que se requiere de estos procesos no es el mismo en los di-

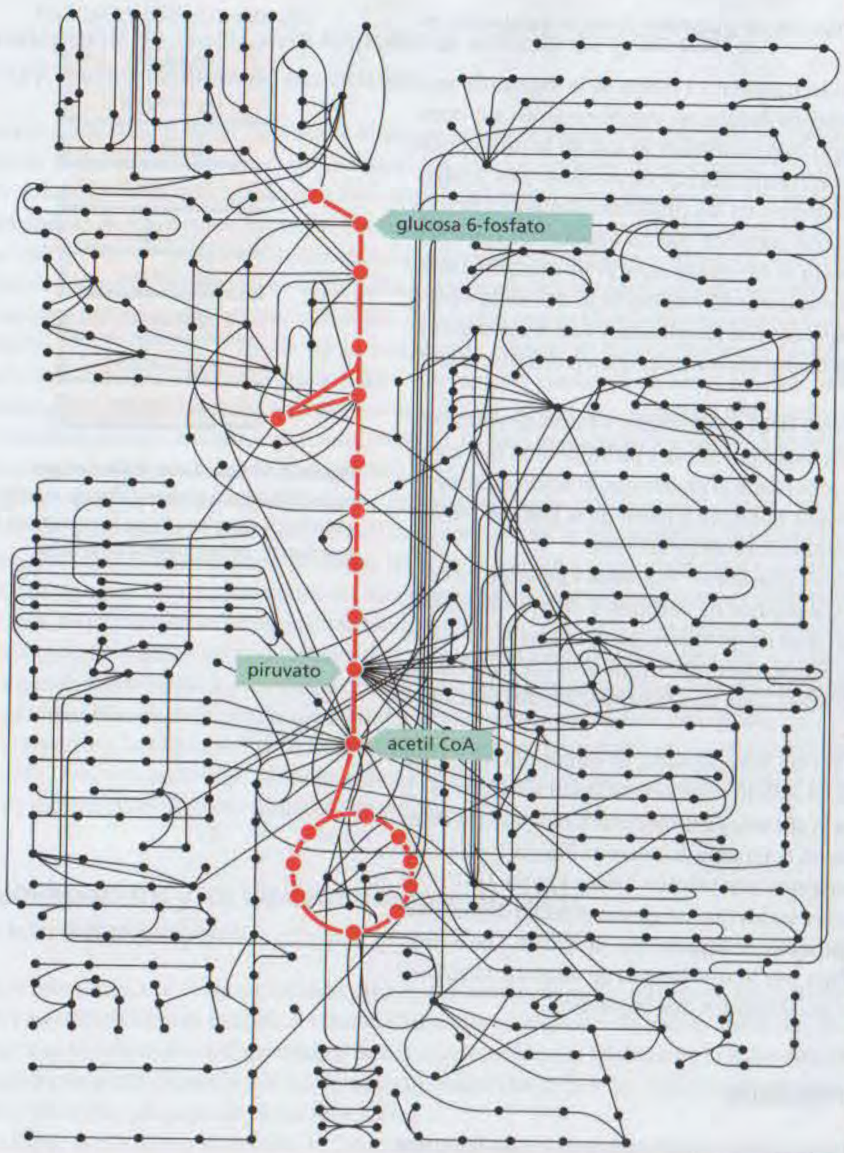


Figura 2-88 La glucólisis y el ciclo del ácido cítrico están en el centro del metabolismo. Se muestran esquemáticamente cerca de unas 500 reacciones metabólicas de una célula típica, con las reacciones de la glucólisis y del ciclo del ácido cítrico en *rojo*. Otras reacciones desembocan en estas dos vías centrales –aportando pequeñas moléculas para ser catabolizadas con la consiguiente producción de energía– o bien parten de ellas y proporcionan compuestos de carbono con finalidades biosintéticas.

ferentes tejidos. Por ejemplo, las células nerviosas, que son probablemente las células más exigentes del cuerpo, carecen casi totalmente de reservas de glucógeno y de ácidos grasos, por lo que dependen, casi por completo, del aporte constante de glucosa por el torrente circulatorio. Por el contrario, las células hepáticas proporcionan glucosa a las fibras musculares que se contraen activamente, y reciclan de nuevo hasta glucosa, el ácido láctico producido por las células musculares. Todos los tipos de células tienen sus rasgos metabólicos característicos y cooperan intensamente entre ellas, tanto en el estado normal como en la respuesta al estrés y al hambre. Cualquiera podría pensar que todo el sistema requiere estar tan finamente compensado que cualquier pequeña alteración, como podría ser un cambio temporal de la ingesta, debería tener consecuencias desastrosas.

Pero, de hecho, el equilibrio metabólico de una célula es sorprendentemente estable. Siempre que este equilibrio sea perturbado, la célula reacciona de modo que restablece su estado inicial. La célula se puede adaptar y continuar funcionando durante la privación de alimento o la enfermedad. Todo tipo de mutaciones pueden dañar o eliminar rutas concretas de reacciones y, a pesar de ello –siempre y cuando se mantengan unos requerimientos mínimos–, la célula sobrevive. Esto es posible gracias a que una elaborada red de *mecanismos de control* regula y coordina las velocidades de todas estas reacciones. Este control recae, en última instancia, en la gran capacidad que tienen las proteínas para cambiar su forma y sus características químicas en respuesta a cambios en su ambiente inmediato. Nuestro próximo centro de interés serán los principios por los que se rige la estructura de las grandes moléculas como las proteínas así como la química de su regulación.

Resumen

La glucosa y otras moléculas de los alimentos se hidrolizan a través de una secuencia oxidativa organizada en distintas etapas controladas, y que suministra energía química en forma de ATP y NADH. Existen tres conjuntos principales de reacciones que actúan en serie y los productos de cada uno se convierten en el material de inicio para el siguiente: la glucólisis (que tiene lugar en el citosol), el ciclo del ácido cítrico (en la matriz mitocondrial) y la fosforilación oxidativa (sobre la membrana mitocondrial interna). Los productos intermedios de la glucólisis y del ciclo del ácido cítrico se utilizan como fuente de energía metabólica y para producir la mayoría de las pequeñas moléculas que se utilizan como material base para la biosíntesis. Las células almacenan moléculas de azúcar en forma de glucógeno en los animales y de almidón en las plantas; tanto las plantas como los animales utilizan exhaustivamente los lípidos como almacén de alimento. A su vez, estos materiales de reserva constituyen la mayor fuente de alimento para los humanos, juntamente con las proteínas que representan la mayor parte del peso seco de la mayoría de las células de los alimentos que ingerimos.

PROBLEMAS

¿Qué afirmaciones son ciertas? Explicar por qué sí o por qué no

2-1 Tras un tiempo igual a 10 vidas medias, únicamente queda sí alrededor de 1/1000 del total de radiactividad de una muestra.

2-2 Una solución 10^{-8} M de HCl tiene un pH de 8.

2-3 La mayor parte de las interacciones que se producen entre macromoléculas tanto pueden estar mediadas por enlaces covalentes como por enlaces no-covalentes.

2-4 Los animales y las plantas utilizan la oxidación para la extracción de energía de las moléculas de alimento.

2-5 Si en una reacción se produce una oxidación, debe ir acompañada de una reducción.

2-6 Enlazando la reacción energéticamente desfavorable A → B a una segunda reacción, la reacción favorable B → C, puede cambiar la constante de equilibrio de la primera.

2-7 El criterio por el cual una reacción se produce espontáneamente es ΔG no $\Delta G°$, porque ΔG tiene en cuenta la concentración de los sustratos y de los productos.

2-8 La glucólisis es únicamente el preludio de la oxidación de la glucosa en la mitocondria, que produce una cantidad de ATP 15 veces mayor, por lo cual la glucólisis no es importante en las células humanas.

2-9 El oxígeno consumido por las células animales durante la oxidación de la glucosa vuelve a la atmósfera en forma de CO_2.

Resolver los siguientes problemas

2-10 Se dice que los procesos de química orgánica de las células vivas son especiales por dos razones: se producen en un ambiente acuoso y comprenden muchas reacciones complejas. Sin embargo, ¿estos son todos los aspectos que los diferencian de los procesos de química orgánica que se desarrollan en los laboratorios más importantes del mundo? Razonar la respuesta.

2-11 El peso molecular del etanol (CH_3CH_2OH) es de 46 y su densidad es de 0,789 g/cm^3.

A. ¿Qué concentración molar de etanol tiene una cerveza que tiene un 5% de etanol en volumen? (el contenido de alcohol de las cervezas varía entre el 4% y el 8%).

B. El límite legal de contenido de alcohol en sangre para conductores es variable, pero 80 mg de etanol por 100 mL de sangre (que habitualmente se indica como un contenido de alcohol en sangre de 0,08) es un límite habitual en algunos países. ¿Cuál es la concentración molar de etanol de una persona según este límite legal? (En España, el límite legal es de 0,05.)

C. ¿Qué cantidad de botellas de 355 mL de cerveza del 5% puede ingerir una persona de 70 kg de peso sin llegar al límite legal de alcohol en sangre? Una persona de 70 kg de peso contiene unos 40 litros de agua. Ignorar la metabolización del etanol y asumir que el contenido de agua permanece constante.

D. El etanol se metaboliza a una velocidad constante de unos 120 mg por hora y kg de peso corporal, independientemente de su concentración. Si una persona de 70 kg de peso tiene una concentración tres veces la del límite legal (es decir, 160 mg/100 mL), ¿cuánto tiempo tiene que esperar para que sus niveles de alcohol en sangre disminuyan hasta el límite legal?

Tabla P2–1 **Isótopos radiactivos y algunas de sus propiedades** (Problema 2–12).

ISÓTOPO RADIACTIVO	EMISIÓN	VIDA MEDIA	ACTIVIDAD ESPECÍFICA MÁXIMA (Ci/mmol)
^{14}C	partícula β	5730 años	0,062
^{3}H	partícula β	12,3 años	29
^{35}S	partícula β	87,4 años	1490
^{32}P	partícula β	14,3 años	9120

2-12 La actividad específica se refiere a cantidad de radiactividad por unidad de cantidad de sustancia, y en biología habitualmente se expresa en unidades de molaridad, por ejemplo, como Ci/mmol [un curio (Ci) corresponde a $2{,}22 \times 10^{12}$ desintegraciones por minuto (dpm)]. Como resulta evidente en la **Tabla P2–1**, en la que se listan las propiedades de cuatro isótopos utilizados habitualmente en biología, existe una relación inversa entre actividad específica máxima y vida media. ¿Se trata únicamente de una coincidencia o existe alguna razón subyacente? Explicar la respuesta.

2-13 Por una coincidencia conveniente, el producto iónico del agua, $K_w = [H^+][OH^-]$, es un número redondo: $1{,}0 \times 10^{-14}$ M^2.

A. ¿Por qué se dice que es neutra una solución de pH 7,0?

B. ¿Cuál es la concentración de H^+ y el pH de una solución 1 mM de NaOH?

C. Si el pH de una solución es de 5,0, ¿Cuál es su concentración de iones OH^-?

2–14 Sugerir un orden para los valores de pK (de menor a mayor) del grupo carboxilo de la cadena lateral del aspartato situado en los ambientes siguientes de una proteína. Explicar la respuesta.

1. En la superficie de una proteína y sin ningún otro grupo ionizable cercano.
2. Enterrado en un bolsillo hidrofóbico sobre la superficie de una proteína.
3. En un bolsillo hidrofóbico adyacente a una cadena lateral de un glutamato.
4. En un bolsillo hidrofóbico adyacente a una cadena lateral de una lisina.

2–15 Se conoce que una cadena lateral de una histidina tiene un importante papel en el mecanismo catalítico de una enzima; sin embargo, no está claro si es necesario que la histidina esté en su forma protonada (cargada) o en su forma no-protonada (no cargada). Para resolver esta cuestión se mide la actividad enzimática a diferentes pH, con los resultados que se muestran en la **Figura P2–1**. ¿Qué forma de la histidina se requiere para la actividad enzimática?

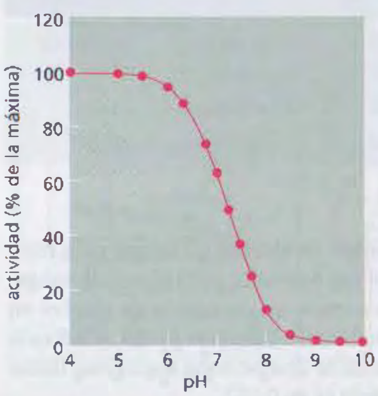


Figura P2–1 Actividad enzimática en función del pH (Problema 2–15).

2–16 Durante un esprint los músculos metabolizan glucosa de forma anaeróbica y producen una elevada concentración de ácido láctico, que baja el pH de la sangre y del citosol y contribuye a la fatiga que experimentan los esprínters antes de que se hayan acabado sus reservas de combustible. El principal tamponador sanguíneo de pH contra los cambios de pH es el sistema bicarbonato/CO_2.

$$\underset{\text{(gas)}}{CO_2} \rightleftharpoons \underset{\text{(disuelto)}}{CO_2} \underset{2,3}{\overset{pK_1 =}{\rightleftharpoons}} H_2CO_3 \underset{3,8}{\overset{pK_2 =}{\rightleftharpoons}} H^+ + HCO_3^- \underset{10,3}{\overset{pK_3 =}{\rightleftharpoons}} H^+ + CO_3^{2-}$$

Para mejorar su rendimiento, ¿los esprínters deberían antes de la carrera contener la respiración o respirar rápidamente? Explicar la respuesta.

2–17 Las tres moléculas de la **Figura P2–2** contienen los siete grupos reactivos más comunes en biología. La mayoría de moléculas de una célula se construyen a partir de alguno de estos grupos. Indicar y nombrar los grupos funcionales de estas moléculas.

2–18 La "difusión" se asocia a un proceso lento – y lo es a nuestra escala de distancias diarias– pero a escala celular es muy rápido. La velocidad instantánea media de una partícula en solución, es decir, la velocidad entre colisiones, es

$$v = (kT/m)^{1/2}$$

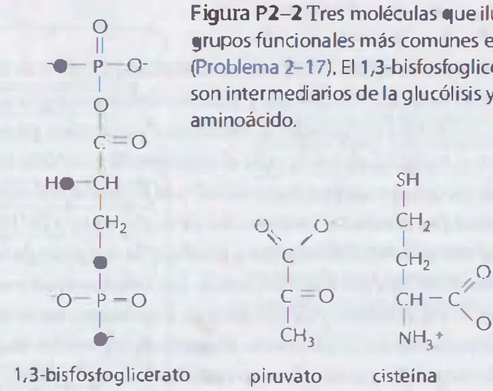


Figura P2–2 Tres moléculas que ilustran los siete grupos funcionales más comunes en biología (Problema 2–17). El 1,3-bisfosfoglicerato y el piruvato son intermediarios de la glucólisis y la cisteína es un aminoácido.

donde $k = 1,38 \times 10^{-16}$ g cm^2/K seg^2, T = temperatura en K (37 °C son 310 K), m = masa en g de la molécular.

Calcular la velocidad instantánea de una molécula de agua (masa molecular = 180 dalton) y de una molécula de mioglobina (masa molecular = 15.000 dalton) a 37 °C. A fin de establecer comparaciones transformar estos números en kilómetros/hora. Antes de hacer ningún cálculo intentar adivinar si la molécula se desplaza a una velocidad de paseo lento (< 1 km/h), a paso rápido (5 km/h) o a velocidad de carrera (40 km/h).

2–19 La polimerización de las subunidades de tubulina formando microtúbulos supone un incremento del orden de las subunidades (**Figura P2–3**). Sin embargo, la polimerización ocurre con un incremento de la entropía (disminución del orden). ¿Cómo puede ser?



Figura P2–3 Polimerización de las subunidades de tubulina formando un microtúbulo (Problema 2–19). Se muestra el destino de una subunidad (sombreada en *verde*) y de las moléculas de agua (*pequeñas esferas azules*) asociadas a ella.

2–20 Un humano adulto de 70 kg de peso puede ingerir la cantidad de energía que necesita para un día, comiendo 3 moles de glucosa (540 g). (Una dieta poco recomendable.) Cada molécula de glucosa cuando se oxida hasta CO_2 genera 30 ATP. En las células, la concentración de ATP se mantiene alrededor de 2 mM y un adulto de 70 kg tiene unos 25 litros de líquido intracelular. Dado que la concentración de ATP se mantiene constante en las células, calcular cuántas veces al día de promedio cada molécula de ATP del cuerpo es hidrolizada y resintetizada.

2–21 Asumiendo que en un cuerpo humano hay 5×10^{13} células y que el ATP se recambia a una velocidad de 10^9 ATP por minuto en cada célula, ¿cuántos vatios consume el cuerpo humano? (un vatio es un julio por segundo; cada caloría son 4,18 julios). Asumir que la hidrólisis de ATP genera 12 kcal/mol.

2–22 ¿Una barrita energética (65 g; 325 kcal) proporciona suficiente cantidad de energía para subir desde Zermatt (1660 m de



Figura P2-4 El Matterhorn (Problema 2-22). (Por cortesía del turismo del Zermatt.)

altura) hasta el Matterhorn (4478 m, **Figura P2-4**) o será necesario parar en el Hörnli Hut (3260 m) para comer otra barrita? Imaginar que el escalador tiene una masa de 75 kg y que todo el trabajo lo realizará en contra de la gravedad (es decir, únicamente ascenderá en vertical). Recordar que según los cálculos del preparador físico:

$$\text{trabajo (J)} = \text{masa (kg)} \times g\ (\text{m/seg}^2) \times \text{altura ganada (m)}$$

donde g es la aceleración debida a la gravedad (9,8 m/seg^2). Un julio es 1 kg m^2/seg^2 y que una caloría son 4,18 kj.

¿Qué aproximación asumimos que subestima notablemente la cantidad de ingesta necesaria?

2-23 En principio, la fermentación del piruvato a lactato parece ser una reacción accesoria de la glucólisis. Al fin y al cabo, ¿las células no podrían crecer en ausencia de oxígeno simplemente eliminando el piruvato como producto de desecho? En ausencia de fermentación, ¿qué productos derivados de la glucólisis se acumularían en las células en condiciones anaeróbicas? ¿El metabolismo de la glucosa a través de la vía glucolítica puede producirse en ausencia de oxígeno en células que no pueden hacer fermentación? Razonar la respuesta.

2-24 En ausencia de oxígeno, las células consumen glucosa a una velocidad mayor. Cuando se agrega oxígeno, el consumo de glucosa cae de forma súbita y se mantiene a una velocidad menor. ¿Por qué se consume más rápidamente la glucosa en ausencia que en presencia de oxígeno?

2-25 El hígado proporciona glucosa al cuerpo entre ingestas mediante la degradación del glucógeno y formando glucosa 6-fosfato en la penúltima etapa. La glucosa 6-fosfato se transforma en glucosa eliminando el fosfato ($\Delta G° = -3{,}3$ kcal/mol). ¿Por qué se supone que el hígado elimina este fosfato por hidrólisis en lugar de hacerlo revirtiendo la reacción por la que se forma la glucosa 6-fosfato (G6P) a partir de la glucosa (glucosa + ATP → G6P + ADP, $\Delta G° = -4{,}0$ kcal/mol)? Revirtiendo esta reacción el hígado podría generar tanto glucosa como ATP.

2-26 En 1904, Franz Knoop realizó el que probablemente resultó ser el primer experimento de marcaje para estudiar una vía metabólica. Alimentó perros con diferentes ácidos grasos marcados con un anillo benceno terminal y analizó los derivados de benceno en la orina de los perros. Siempre que los ácidos grasos tenían un número par de átomos de carbono, se excretaba fenilacetato (**Figura P2-5A**). Siempre que los ácidos grasos tenían un número impar de átomos de carbono se excretaba benzoato (Figura P2-5B).

A partir de este experimento, Knoop dedujo que la oxidación de los ácidos grasos hasta CO_2 y H_2O suponía la eliminación de fragmentos de dos carbonos a partir del extremo carboxilo de la cadena. ¿Es posible explicar las razones que le llevaron a concluir

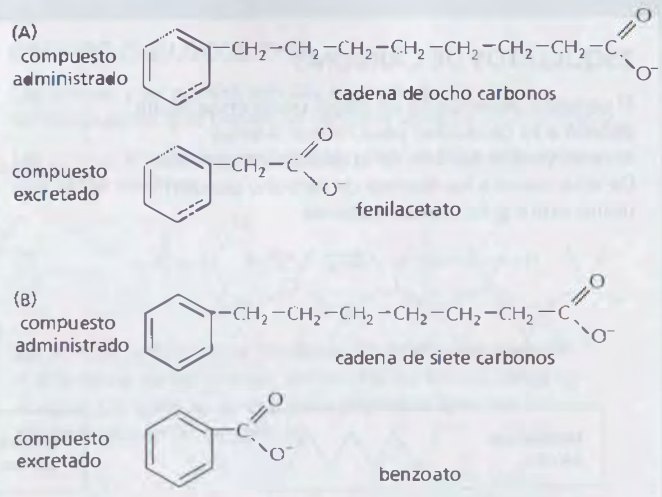


Figura P2-5 Experimento original de marcaje que permitió analizar la oxidación de los ácidos grasos (Problema 2-26). (A) Derivados administrado y excretado de un ácido graso de número par de carbonos. (B) Derivados administrado y excretado de un ácido graso de número impar de carbonos.

que se eliminaban fragmentos de dos carbonos, y no de otro número, y que la degradación se producía a partir del extremo carboxilo y no del otro extremo?

2-27 Las reacciones de síntesis de aminoácidos en microorganismos se estudiaron en parte mediante experimentos de alimentación cruzada entre organismos mutantes defectuosos en una etapa determinada de la vía. En la **Figura P2-6** se presentan los resultados de alimentación cruzada de tres mutantes defectuosos de la vía del triptófano: *TrpB*$^-$, *TrpD*$^-$ y *TrpE*$^-$. Los mutantes se extendieron en tres bandas (como se observa en la Figura P2-6) sobre una placa de Petri y se les permitió crecer en presencia de una cantidad de triptófano muy pequeña. Como se muestra, los mayores crecimientos se observaron en puntos en los que las bandas eran cercanas a otras bandas. Estos puntos de mayor crecimiento indicaban que uno de los mutantes podía alimentarse de forma cruzada (le proporcionaba un intermediario) con otro mutante.

A partir del patrón de alimentación cruzada que se muestra en la Figura P2-6, deducir el orden de las etapas controladas por los productos de los genes *TrpB*, *TrpD* y *TrpE*. Explicar el razonamiento efectuado.

RESULTADOS DE ALIMENTACIÓN CRUZADA

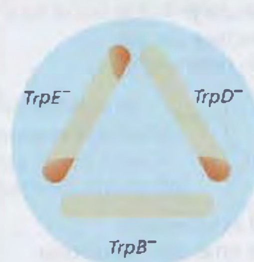
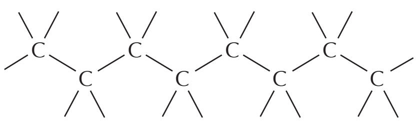


Figura P2-6 Experimentos de alimentación cruzada utilizados para definir la vía de síntesis del triptófano (Problema 2-27). Resultados de un experimento de alimentación cruzada entre mutantes defectuosos de etapas de la biosíntesis de triptófano. *Áreas oscuras* en la placa de Petri indican regiones de crecimiento celular.

ESQUELETOS DE CARBONO

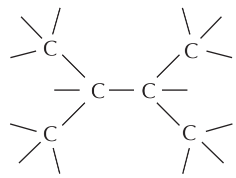
El carbono desempeña un papel único en la célula debido a su capacidad para formar fuertes enlaces covalentes con otros átomos de carbono. De esta manera los átomos de carbono pueden unirse entre sí formando cadenas



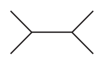
también se escribe



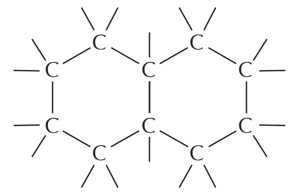
o ramificaciones



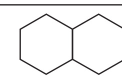
también se escribe



o anillos



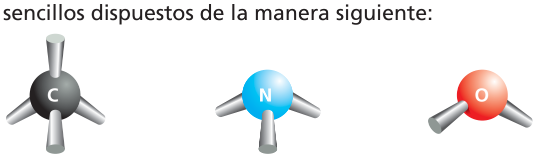
también se escribe



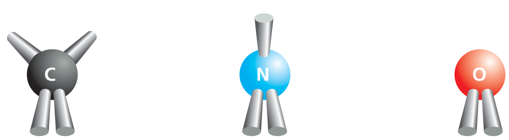
ENLACES COVALENTES

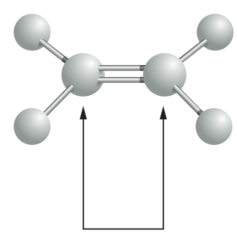
Un enlace covalente se forma cuando dos átomos se acercan suficientemente y comparten uno o más de sus electrones. En un enlace sencillo se comparte un electrón de cada uno de los átomos; en un enlace doble, un total de cuatro electrones.

Cada átomo forma un número determinado de enlaces covalentes con una disposición espacial definida. El carbono forma cuatro enlaces sencillos dispuestos en forma tetraédrica; el nitrógeno tres enlaces sencillos y el oxígeno dos enlaces sencillos dispuestos de la manera siguiente:



Los dobles enlaces tienen otra disposición espacial.

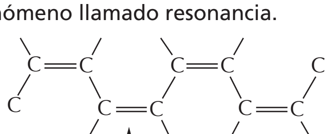




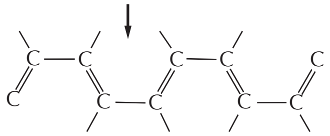
Los átomos unidos por dos o más enlaces covalentes no pueden rotar libremente alrededor del eje del enlace. Esta restricción tiene una gran influencia sobre la estructura tridimensional de muchos tipos de macromoléculas.

DOBLES ENLACES ALTERNOS

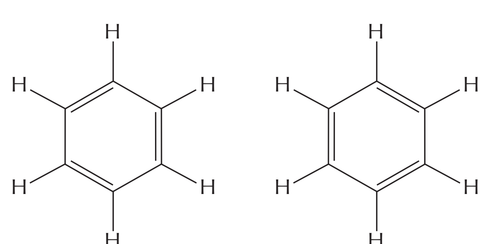
La cadena de carbonos puede contener dobles enlaces. Si se presentan entre átomos de carbono alternos, los electrones de enlace se desplazan a lo largo de molécula y estabilizan la estructura por un fenómeno llamado resonancia.



la estructura real es un estado intermedio entre estas dos estructuras

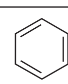


La existencia de dobles enlaces alternos en un anillo puede generar una estructura muy estable.



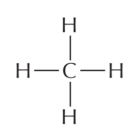
benceno

también se escribe

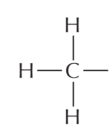


HIDROCARBONOS

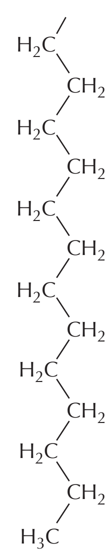
El carbono y el hidrógeno forman compuestos estables (o grupos) llamados hidrocarbonos. Son grupos no polares, no forman enlaces de hidrógeno y generalmente son insolubles en agua.



metano



grupo metilo

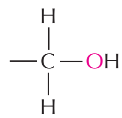


parte de una "cola" hidrocarbonada de una molécula de ácido graso

GRUPOS QUÍMICOS C–O

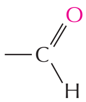
Muchos compuestos biológicos tienen un carbono unido a un oxígeno. Por ejemplo,

alcohol

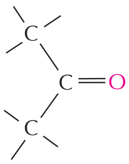


El –OH recibe el nombre de grupo hidroxilo.

aldehído

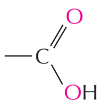


cetona



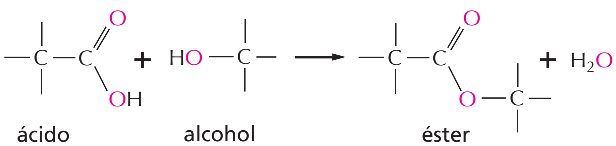
El C═O recibe el nombre de grupo carbonilo.

ácido carboxílico



El –COOH recibe el nombre de grupo carboxilo. En el agua pierde un ion H⁺ y se convierte en –COO⁻.

ésteres Los ésteres se forman al combinar un ácido y un alcohol.

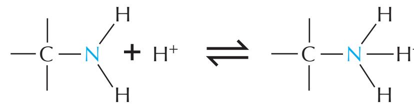


ácido alcohol éster

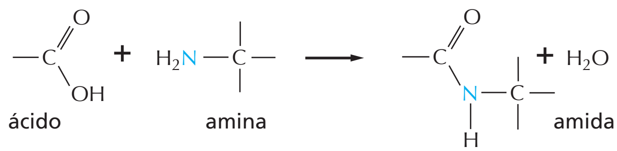
GRUPOS QUÍMICOS C–N

Las aminas y las amidas son dos ejemplos importantes de compuestos que tienen un carbono unido a un nitrógeno.

Las aminas en el agua se combinan con un H⁺ y adquieren una carga positiva.

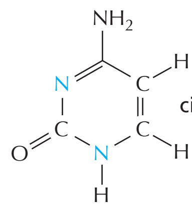


Las amidas se forman al combinar un ácido y una amina. A diferencia de las aminas, las amidas no tienen carga en el agua. Un ejemplo es el enlace peptídico que une los aminoácidos en las proteínas.



ácido amina amida

El nitrógeno también se encuentra en compuestos cíclicos, como los constituyentes de los ácidos nucleicos: las purinas y las pirimidinas.



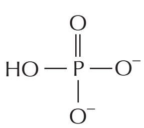
citosina (una pirimidina)

GRUPO SULFHIDRILO

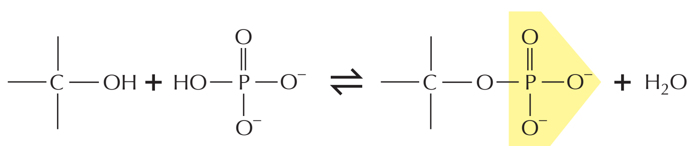
El —C—SH recibe el nombre de grupo sulfhidrilo. En el aminoácido cisteína, el grupo sulfhidrilo puede encontrarse en forma reducida, —C—SH o más raramente en una forma oxidada con un enlace, —C—S—S—C—

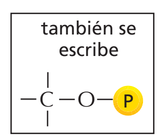
FOSFATOS

Los fosfatos inorgánicos son iones estables formados a partir del ácido fosfórico, H_3PO_4. Generalmente se escriben como P_i.

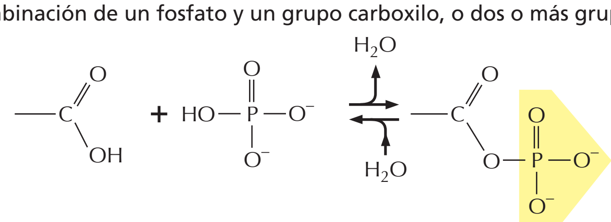


Los ésteres de fosfato se pueden formar entre un fosfato y un grupo hidroxilo libre. Los grupos fosfato se encuentran unidos de esta manera a las proteínas.

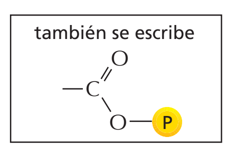


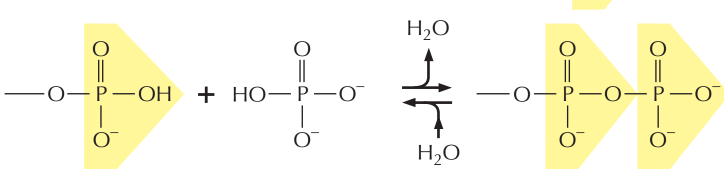


La combinación de un fosfato y un grupo carboxilo, o dos o más grupos fosfato, da lugar a un ácido anhídrido.

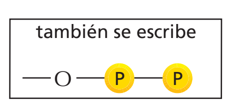


en algunos metabolitos se encuentran enlaces acil fosfato de alta energía (ácido carboxílico-fosfórico anhídrido)



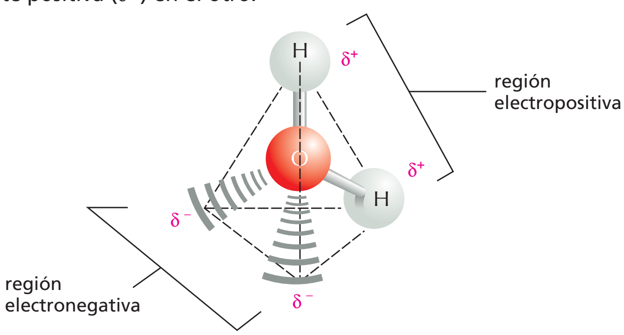


el fosfoanhidro –un enlace de alta energía se encuentra en moléculas como el ATP



EL AGUA

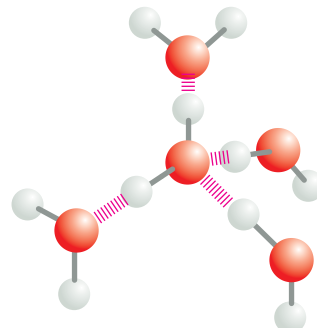
Dos átomos que están conectados entre sí por un enlace covalente pueden ejercer diversas fuerzas de atracción sobre los electrones. El enlace es polar, con una carga ligeramente negativa (δ–) en un extremo y una carga ligeramente positiva (δ+) en el otro.



La carga global de la molécula de agua es neutra (tiene el mismo número de electrones que de protones), pero los electrones se distribuyen de manera asimétrica y generan una polaridad. El núcleo de oxígeno atrae los electrones, separándolos del núcleo del hidrógeno que se queda con una pequeña carga neta positiva. El exceso de densidad electrónica en el átomo de oxígeno genera regiones débilmente negativas en los otros dos ángulos de un tetraedro imaginario.

ESTRUCTURA DEL AGUA

Las moléculas de agua se unen entre sí de manera transitoria formado un entramado de enlaces de hidrógeno. Incluso a 37 °C, el 15% de las moléculas de agua se encuentran unidas a otras cuatro en una disposición transitoria o "agregado fluctuante."

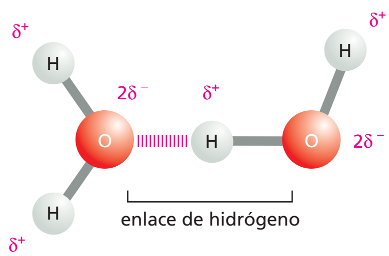


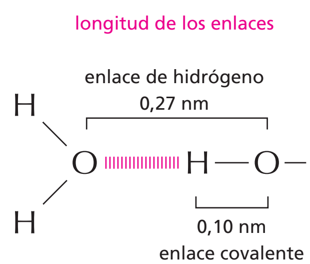
La naturaleza cohesiva de las moléculas de agua es la responsable de muchas de sus propiedades extraordinarias, como su elevada tensión superficial, su elevado calor específico y su elevado calor de vaporización.

ENLACES DE HIDRÓGENO

Debido a que están polarizadas, dos moléculas de H_2O adyacentes pueden formar una unión llamada enlace de hidrógeno. Los enlaces de hidrógeno tienen cerca de 1/20 de la fuerza de un enlace covalente.

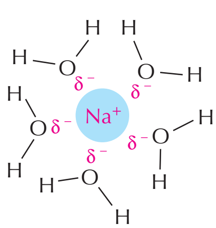
Los enlaces de hidrógeno son más fuertes cuando los tres átomos se encuentran en línea recta.

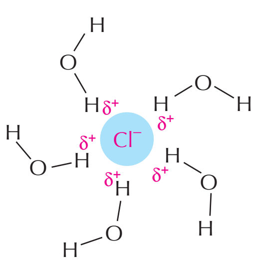




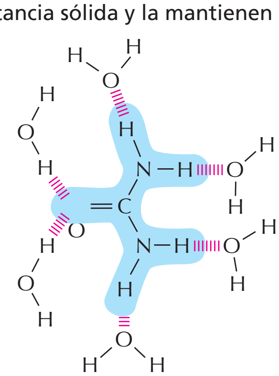
MOLÉCULAS HIDROFÍLICAS

Las sustancias que se disuelven fácilmente en el agua se llaman hidrofílicas. Están formadas por iones o por moléculas polares que atraen a las moléculas de agua por el efecto de sus cargas eléctricas. Las moléculas de agua envuelven cada ion o molécula polar de la superficie de una sustancia sólida y la mantienen en solución.





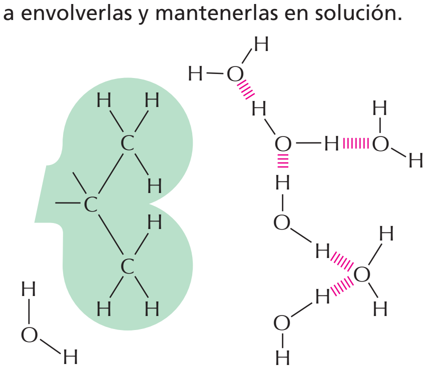
Las sustancias iónicas, como el cloruro de sodio, se disuelven gracias a que las moléculas de agua son atraídas por las cargas positivas (Na^+) o negativas ($Cl^–$) de cada ion.



Las sustancias polares, como la urea, se disuelven porque sus moléculas forman enlaces de H con las moléculas de agua.

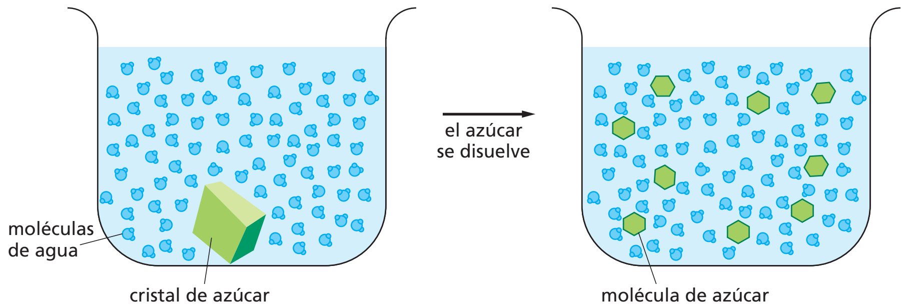
MOLÉCULAS HIDROFÓBICAS

Las moléculas que contienen una mayoría de enlaces no-polares no son solubles en agua y se denominan hIdrofóbicas. Esto es así especialmente para los hidrocarburos, que contienen muchos enlaces C–H. Las moléculas de agua no son atraídas por estas moléculas y tienen poca tendencia a envolverlas y mantenerlas en solución.



EL AGUA COMO SOLVENTE

Muchas sustancias, como el azúcar casero, se disuelven, es decir, sus moléculas se separan unas de las otras y son rodeadas por moléculas de agua.



Cuando una sustancia se disuelve en un líquido, la mezcla se denomina solución. La sustancia disuelta (en este caso el azúcar) es el soluto y el líquido que la disuelve (en este caso el agua) es el solvente. El agua es un excelente solvente para muchas sustancias debido a sus enlaces polares.

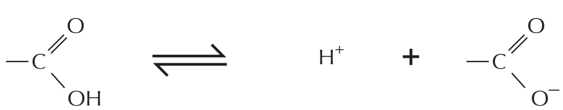
ÁCIDOS

Las sustancias que liberan iones hidrógeno en solución se denominan ácidos.

$$HCl \longrightarrow H^+ + Cl^-$$

ácido clorhídrico (ácido fuerte) → ion hidrógeno + ion cloro

Muchos de los ácidos importantes en la célula sólo se disocian parcialmente, por lo que son ácidos débiles, por ejemplo, el grupo carboxilo (–COOH), se disocia dando un ion hidrógeno en solución

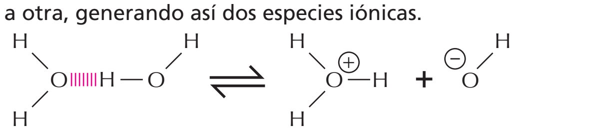


(ácido débil)

Obsérvese que es una reacción reversible.

INTERCAMBIO DE HIDRÓGENOS

Los iones hidrógeno (H^+) cargados positivamente pueden desplazarse espontáneamente de una molécula de agua a otra, generando así dos especies iónicas.



iones hidronio (el agua actúa como una base débil)

iones hidroxilo (el agua actúa como un ácido débil)

a menudo se representa como:

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$$

ion hidrógeno; ion hidroxilo

Dado que el proceso es rápidamente reversible, los iones hidrógeno se desplazan continuamente entre las moléculas de agua. El agua pura contiene una concentración constante de iones hidrógeno y de iones hidroxilo (10^{-7} M para ambos).

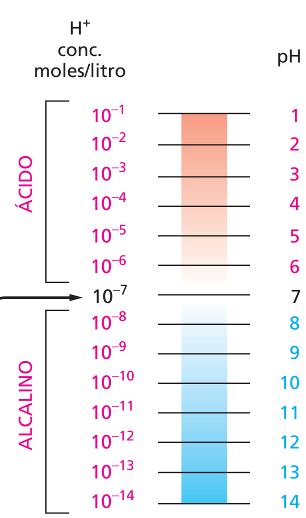
pH

La acidez de una solución se define como la concentración de iones H^+ que posee. Por conveniencia se utiliza la escala de pH, donde

$pH = -\log_{10}[H^+]$

Para el agua pura

$[H^+] = 10^{-7}$ moles/litro



BASES

Las sustancias que reducen el número de iones hidrógeno de la solución se llaman bases. Algunas bases, como el amoníaco, se combinan directamente con los iones de hidrógeno.

$$NH_3 + H^+ \longrightarrow NH_4^+$$

amoníaco + ion hidrógeno → ion amonio

Otras bases, como el hidróxido de sodio, reducen el número de iones H^+ indirectamente, al generar iones OH^- que se combinan directamente con iones H^+ del agua, incrementando la cantidad de iones H_2O libres.

$$NaOH \longrightarrow Na^+ + OH^-$$

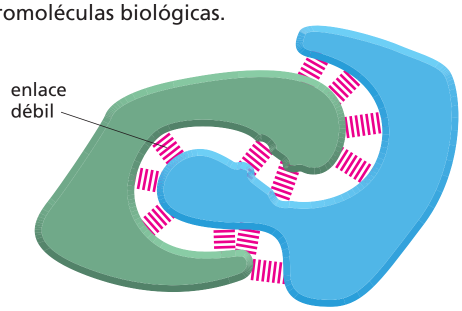
hidróxido de sodio (base fuerte) → ion sodio + ion hidroxilo

Muchas de las bases que se encuentran en las células están parcialmente disociadas y se denominan bases débiles, como en los compuestos con un grupo amino ($-NH_2$), que tiene tendencia a aceptar de manera reversible un ion H^+ del agua e incrementar los iones OH^- libres.

$$-NH_2 + H^+ \rightleftharpoons -NH_3^+$$

ENLACES QUÍMICOS DÉBILES

Las moléculas orgánicas interaccionan con otras moléculas mediante tres fuerzas de atracción de alcance reducido llamadas *enlaces no-covalentes*: atracciones de van der Waals, atracciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno. La repulsión de los grupos hidrofóbicos en el agua es importante para ordenar las macromoléculas biológicas.

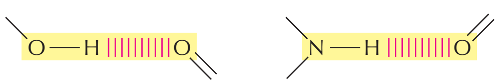


Los enlaces débiles tienen una fuerza 20 veces inferior a la de un enlace covalente. Sólo son suficientemente fuertes para fijar dos moléculas cuando se forman simultáneamente un número elevado de ellos.

ENLACES DE HIDRÓGENO

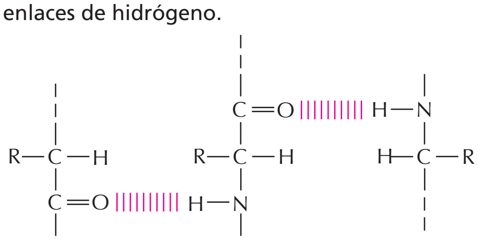
Como ya se describió para el agua (véase el Panel 2–2), los enlaces de hidrógeno se forman cuando un átomo de hidrógeno queda en medio de dos átomos que atraen electrones (generalmente el oxígeno o el nitrógeno).

Los enlaces de hidrógeno son más fuertes cuando los tres átomos están alineados:

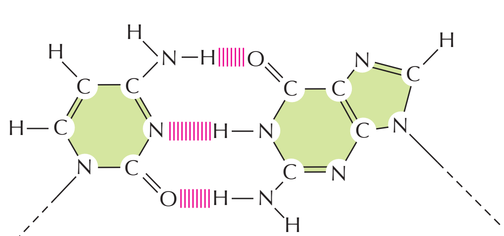


Ejemplos en macromoléculas:

Los aminoácidos de las cadenas polipeptídicas se unen por enlaces de hidrógeno.

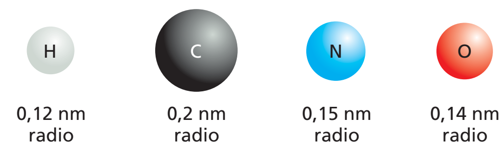


Dos bases, G y C, se unen por enlaces de hidrógeno en el DNA o en el RNA.



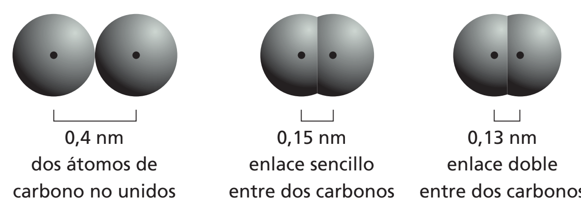
ATRACCIONES DE VAN DER WAALS

Si dos átomos se acercan demasiado, se repelen muy intensamente. Por esta razón podemos representar un átomo como una esfera con un radio fijo. El "tamaño" característico de cada átomo se expresa mediante su radio de van der Waals. La distancia de contacto entre cualquiera de los dos átomos unidos covalentemente es la suma de sus radios de van der Waals.



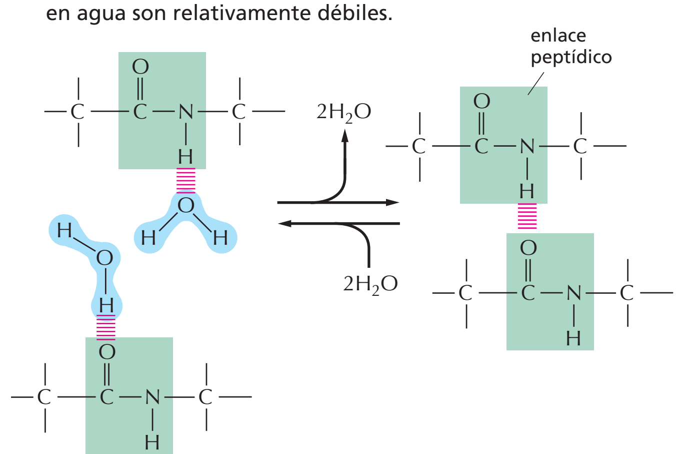
A una distancia muy reducida, dos átomos cualesquiera muestran una débil interacción de enlace debido a la fluctuación de sus cargas eléctricas. Los dos átomos pueden atraerse mutuamente hasta que la distancia entre sus núcleos es aproximadamente igual a la suma de sus radios de van der Waals. Aunque de forma individual son muy débiles, las atracciones de van der Waals pueden resultar importantes cuando dos macromoléculas adaptan estrechamente sus superficies, porque implican a muchos átomos.

Obsérvese que cuando dos átomos forman un enlace covalente, los centros de los dos átomos (los dos núcleos atómicos) se acercan más que la suma de los dos radios de van der Waals. Así,

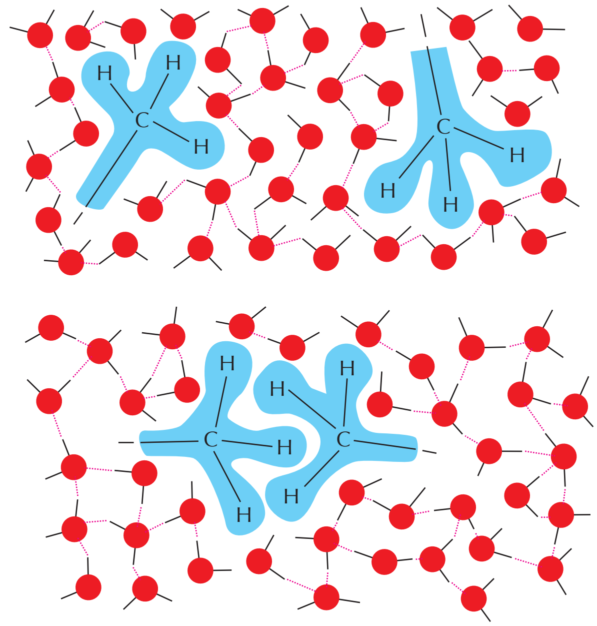


ENLACES DE HIDRÓGENO EN EL AGUA

Cualquier molécula que pueda formar enlaces de hidrógeno con otra molécula, también puede, alternativamente, formar enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua. Debido a esta competencia con las moléculas de agua, los enlaces de hidrógeno que se forman entre dos moléculas disueltas en agua son relativamente débiles.



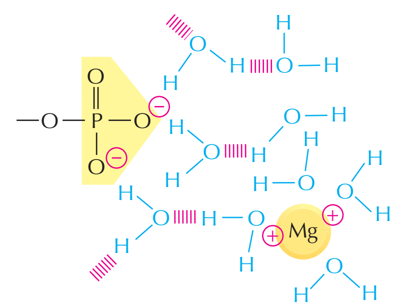
FUERZAS HIDROFÓBICAS



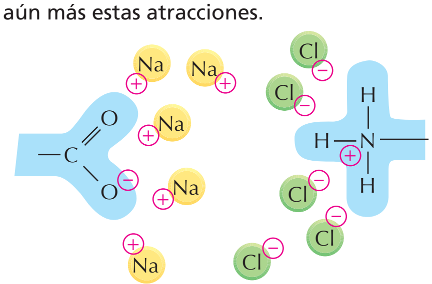
El agua fuerza a los grupos hidrofóbicos a agruparse entre sí para minimizar los efectos desorganizadores que estos grupos tienen sobre la red de enlaces de hidrógeno del agua. Algunas veces se dice que estos grupos hidrofóbicos están unidos por “enlaces hidrofóbicos”, a pesar de que esta atracción está generada en realidad por una repulsión del agua.

ATRACCIONES ELECTROSTÁTICAS EN SOLUCIONES ACUOSAS

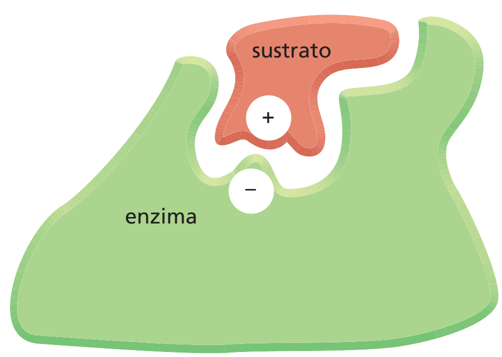
Los grupos cargados están protegidos por sus interacciones con las moléculas de agua. Por lo tanto, en el agua las atracciones electrostáticas son bastante débiles.



De igual manera, otros iones en solución pueden agregarse alrededor de grupos cargados y debilitar aún más estas atracciones.

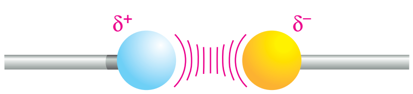


El agua y las sales debilitan las atracciones electrostáticas, pero son muy importantes en los sistemas biológicos. Por ejemplo, una enzima que se une a un sustrato cargado positivamente a menudo presenta un aminoácido cuya cadena lateral está cargada negativamente en el lugar apropiado.



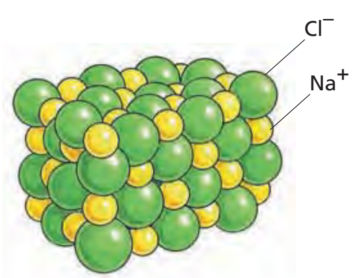
ATRACCIONES ELECTROSTÁTICAS

Se producen fuerzas de atracción tanto entre grupos completamente cargados (enlaces iónicos) como entre grupos parcialmente cargados de moléculas polares.

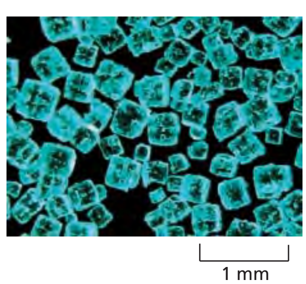


La fuerza de atracción entre dos cargas, δ^+ y δ^-, decae rápidamente a medida que la distancia entre las cargas aumenta.

En ausencia de agua, las fuerzas iónicas son muy grandes. Son las responsables de la dureza de minerales tales como el mármol y el ágata, y de la formación de cristales de sal común, NaCl.

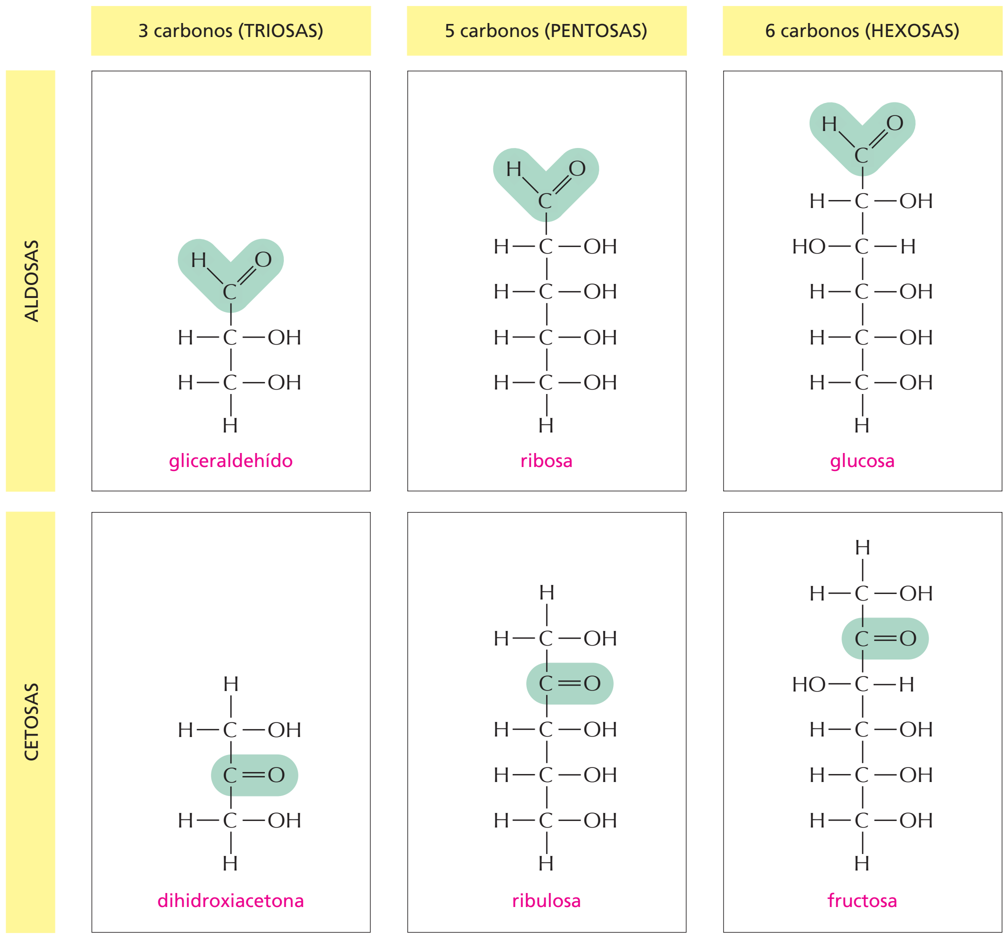


un cristal de sal, NaCl



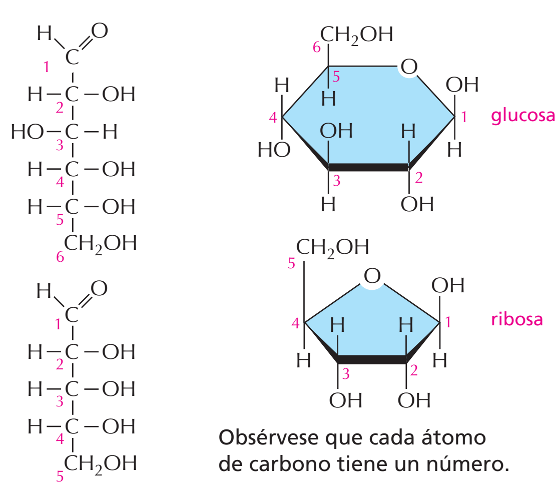
MONOSACÁRIDOS

Los monosacáridos tienen la fórmula general $(CH_2O)_n$, donde *n* puede ser 3, 4, 5, 6, 7 u 8, y presentan dos o más grupos hidroxilo. Pueden contener tanto un grupo aldehído ($-C{\overset{O}{\underset{H}{\lessgtr}}}$), las denominadas aldosas, o un grupo cetona ($>C=O$), las denominadas cetosas.



FORMACIÓN DE ANILLOS

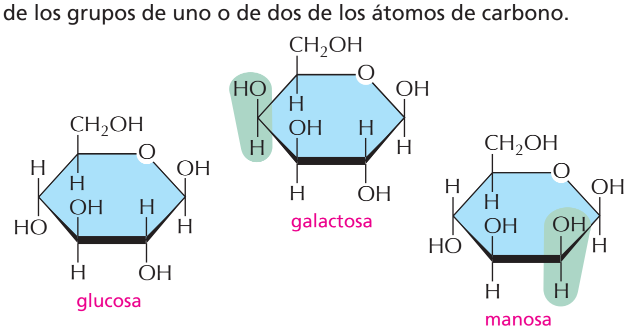
En solución acuosa, el grupo aldehído o cetona de una molécula de azúcar reacciona con un grupo hidroxilo de la misma molécula que se cierra formando un anillo.



Obsérvese que cada átomo de carbono tiene un número.

ISÓMEROS

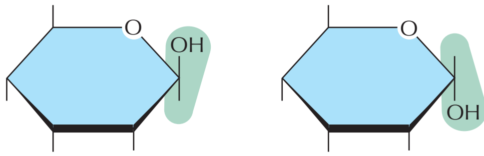
Muchos monosacáridos sólo se diferencian de otros en la distribución espacial de sus átomos, es decir, son isómeros. Por ejemplo, la glucosa, la galactosa y la manosa tienen la misma fórmula $(C_6H_{12}O_6)$, pero difieren en la disposición de los grupos de uno o de dos de los átomos de carbono.



Estas pequeñas diferencias sólo determinan cambios menores en las propiedades de los azúcares. Pero estas diferencias son reconocidas por enzimas y otras proteínas, por lo que pueden tener efectos biológicos importantes.

UNIONES α Y β

El grupo hidroxilo situado en el carbono que tiene el aldehído o la cetona puede cambiar rápidamente de una posición a otra. Estas dos posiciones se llaman α y β.

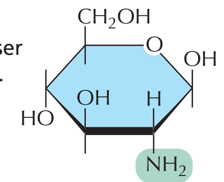


hidroxilo β hidroxilo α

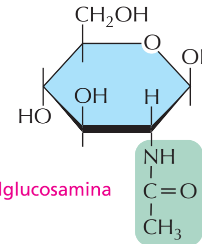
En cuanto un azúcar queda unido a otro, la posición α o β queda fijada.

DERIVADOS DE AZÚCARES

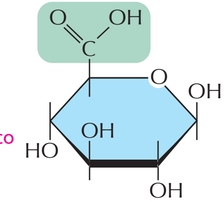
Los grupos hidroxilo de un monosacárido sencillo pueden ser reemplazados por otros grupos.



glucosamina



N-acetilglucosamina



ácido glucurónico

DISACÁRIDOS

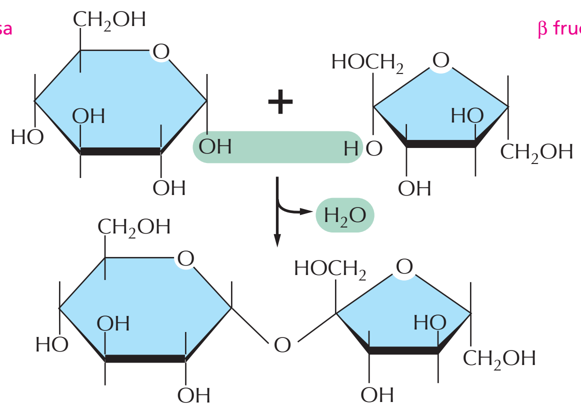
El carbono que tiene el grupo aldehído o cetona puede reaccionar con cualquier grupo hidroxilo de otra molécula de azúcar formando un disacárido. Esta unión se llama enlace glucosídico.

Tres disacáridos muy habituales son

- maltosa (glucosa + glucosa)
- lactosa (galactosa + glucosa)
- sacarosa (glucosa + fructosa)

A continuación se muestra la reacción de formación de la sacarosa.

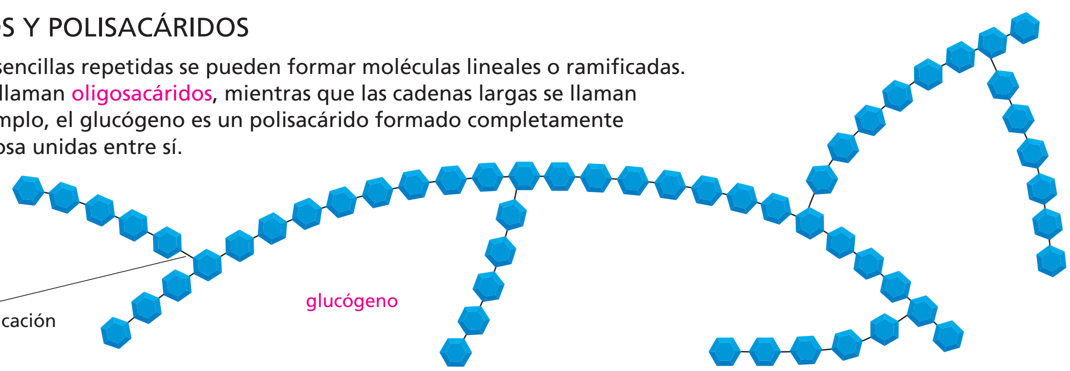
α glucosa β fructosa



sacarosa

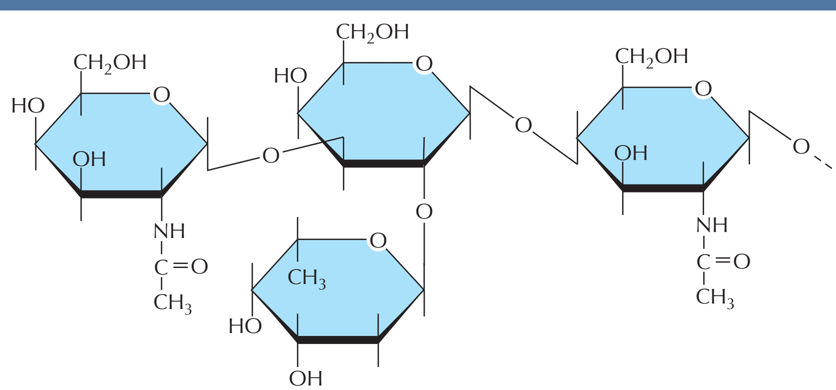
OLIGOSACÁRIDOS Y POLISACÁRIDOS

A partir de unidades sencillas repetidas se pueden formar moléculas lineales o ramificadas. Las cadenas cortas se llaman oligosacáridos, mientras que las cadenas largas se llaman polisacáridos. Por ejemplo, el glucógeno es un polisacárido formado completamente por unidades de glucosa unidas entre sí.



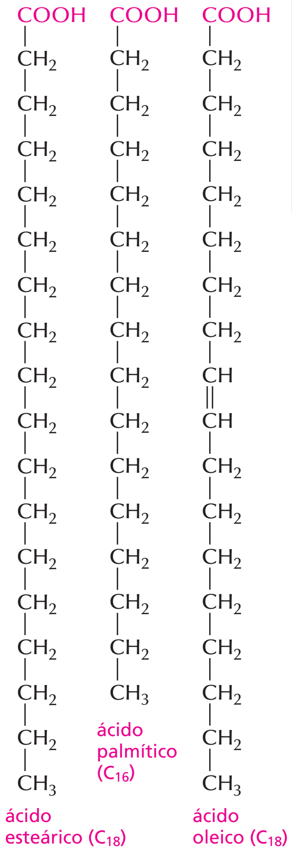
OLIGOSACÁRIDOS COMPLEJOS

En muchos casos la secuencia de azúcares no es repetitiva. Son posibles muchas moléculas diferentes. Normalmente estos oligosacáridos complejos están unidos a proteínas o a lípidos, como ocurre con este polisacárido, que pertenece a una molécula de superficie celular que define un tipo sanguíneo determinado.



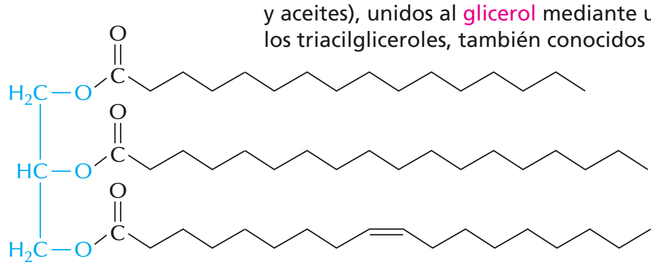
ÁCIDOS GRASOS COMUNES

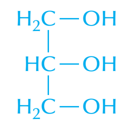
Son ácidos carboxílicos con largas colas hidrocarbonadas.



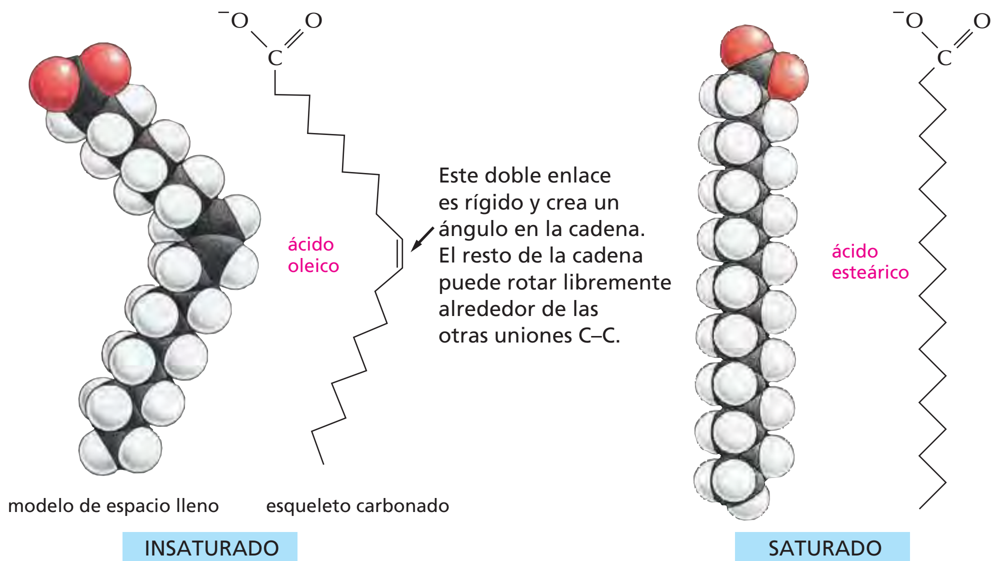
TRIACILGLICEROLES

Los ácidos grasos se almacenan como reserva energética (grasas y aceites), unidos al glicerol mediante un enlace éster, formando los triacilgliceroles, también conocidos como triglicéridos.



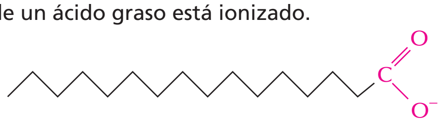


Existen cientos de tipos diferentes de ácidos grasos: si tienen uno o más dobles enlaces en sus colas hidrocarbonadas se les llama insaturados y si carecen de dobles enlaces saturados.



GRUPO CARBOXILO

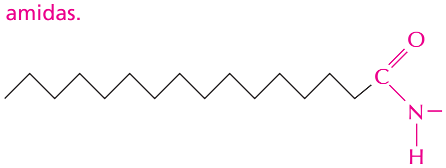
Cuando está libre, el grupo carboxilo de un ácido graso está ionizado.



Pero más habitualmente está unido a otros grupos formando ésteres

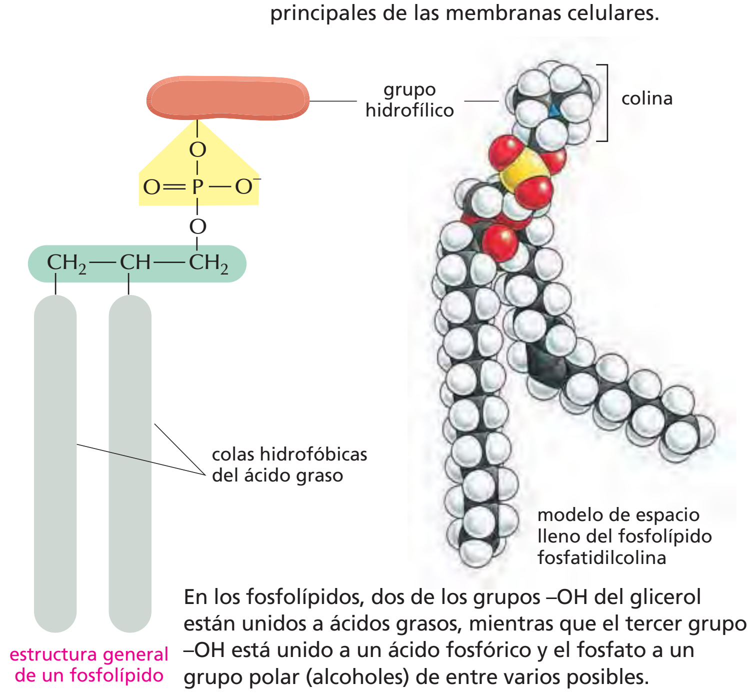


o amidas.



FOSFOLÍPIDOS

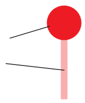
Los fosfolípidos son los constituyentes principales de las membranas celulares.

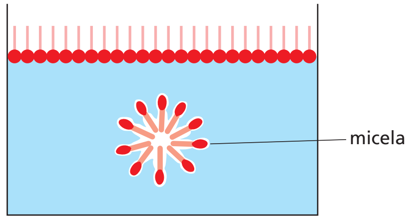


En los fosfolípidos, dos de los grupos –OH del glicerol están unidos a ácidos grasos, mientras que el tercer grupo –OH está unido a un ácido fosfórico y el fosfato a un grupo polar (alcoholes) de entre varios posibles.

AGREGADOS LIPÍDICOS

Los ácidos grasos tienen una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica.

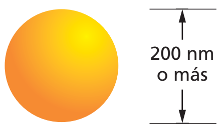




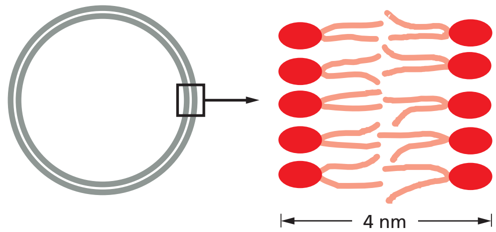
En el agua pueden formar una película superficial o pequeñas micelas.

Sus derivados pueden formar agregados mayores que se mantienen unidos entre sí por fuerzas hidrofóbicas:

Los triglicéridos pueden formar grandes gotas esféricas de grasa en el citoplasma de las células.

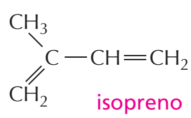


Los fosfolípidos y los glucolípidos forman bicapas lipídicas autoselladas (base de las membranas celulares).



OTROS LÍPIDOS

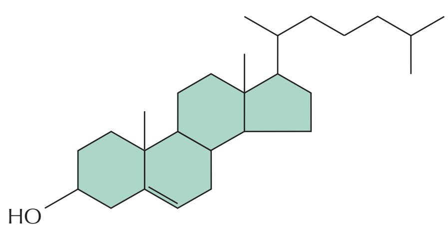
Los lípidos son las moléculas celulares insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos. Otros dos tipos comunes de lípidos son los esteroides y los poliisoprenoides. Ambos están formados a partir de unidades de isopreno.



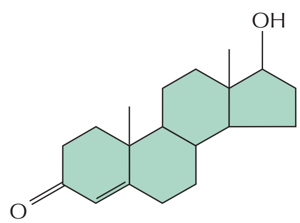
isopreno

ESTEROIDES

Los esteroides tienen una estructura característica de varios anillos.



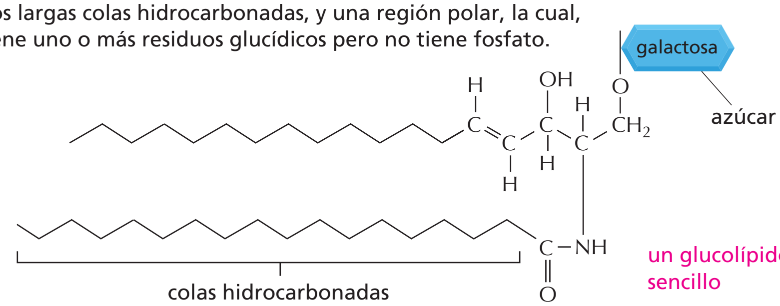
colesterol—presente en muchas membranas



testosterona—hormona esteroidea masculina

GLUCOLÍPIDOS

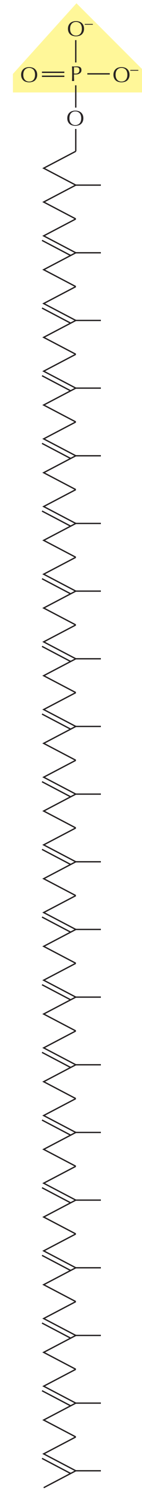
Como los fosfolípidos, estos compuestos presentan una región hidrofóbica, que contiene dos largas colas hidrocarbonadas, y una región polar, la cual, sin embargo, tiene uno o más residuos glucídicos pero no tiene fosfato.



un glucolípido sencillo

POLIISOPRENOIDES

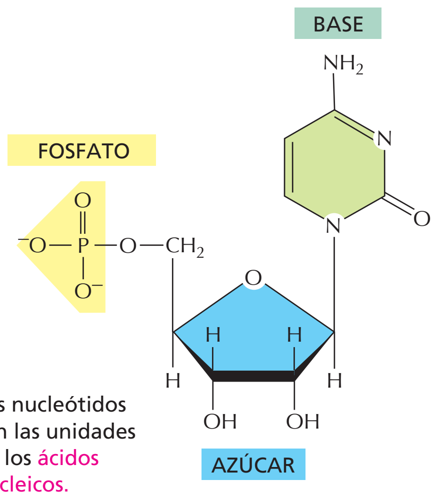
Son largas cadenas poliméricas de isopreno



dolicol fosfato—participa en el transporte de azúcares activados en la síntesis asociada a membrana de las glucoproteínas y de algunos polisacáridos

NUCLEÓTIDOS

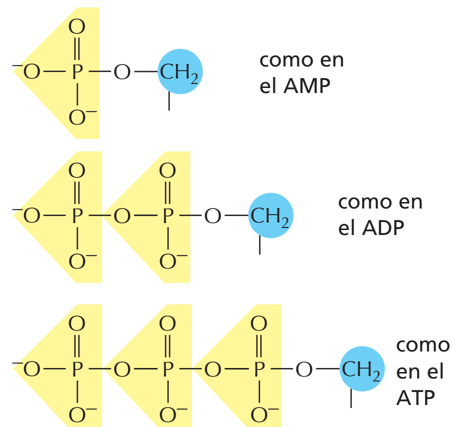
Un nucleótido está formado por una base nitrogenada, un azúcar de cinco carbonos y uno o más grupos fosfato.



Los nucleótidos son las unidades de los ácidos nucleicos.

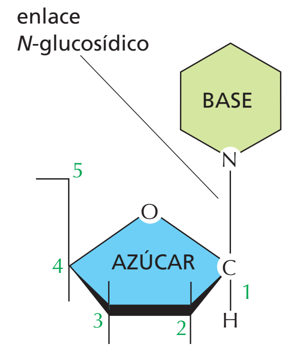
FOSFATOS

Normalmente los fosfatos se unen al hidroxilo del C5 del azúcar ribosa o desoxirribosa (se denomina 5′). Son comunes los nucleótidos mono-, di- y trifosfato.



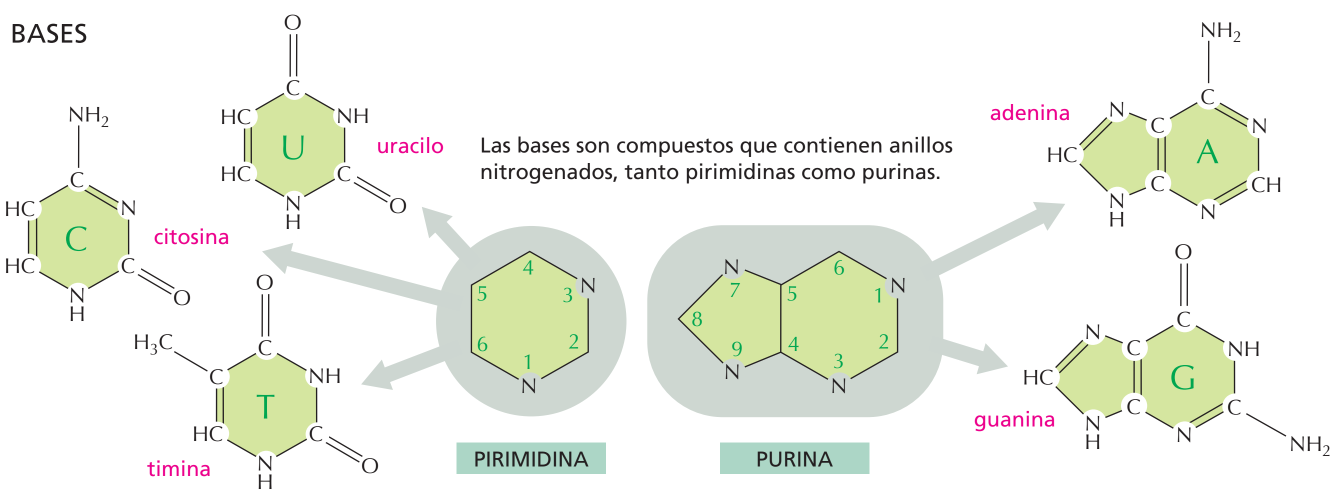
El fosfato hace que el nucleótido quede cargado negativamente.

UNIÓN BASE-AZÚCAR



La base se une al mismo carbono (C1) que participa en los enlaces azúcar-azúcar.

BASES

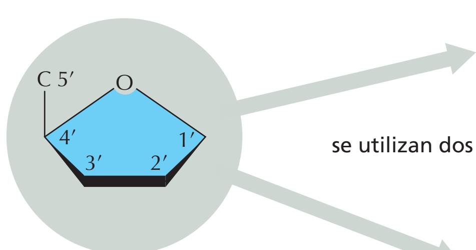


Las bases son compuestos que contienen anillos nitrogenados, tanto pirimidinas como purinas.

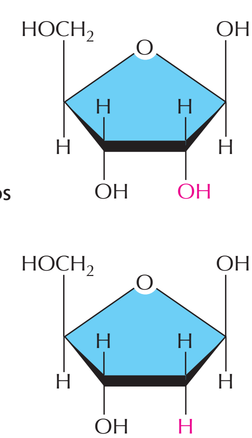
AZÚCARES

PENTOSA

un azúcar de cinco carbonos



se utilizan dos tipos



la β-D-ribosa forma parte del ácido ribonucleico

la β-D-2-desoxirribosa forma parte del ácido desoxirribonucleico

Cada uno de los carbonos numerados del azúcar de un nucleótido se indica con una comilla tras el número; así, se habla del “carbono 5-prima”, etc.

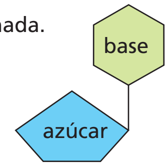
NOMENCLATURA

Los nucleósidos o nucleótidos se nombran de acuerdo con su base nitrogenada.

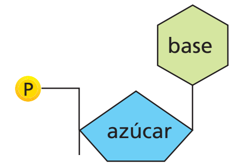
BASE	NUCLEÓSIDO	ABREV.
adenina	adenosina	A
guanina	guanosina	G
citosina	citidina	C
uracilo	uridina	U
timina	timidina	T

Las abreviaturas de una sola letra se utilizan de forma indistinta para referirse a (1) la propia base, (2) el nucleósido o (3) el nucleótido completo –normalmente, en el contexto queda claro a cuál de las tres entidades se refiere. Cuando el contexto no es suficiente, se añadirá el término “base”, “nucleósido” o “nucleótido”, o como en los ejemplos siguientes, se utilizará el código de tres letras.

AMP = adenosina monofosfato
dAMP = desoxiadenosina monofosfato
UDP = uridina difosfato
ATP = adenosina trifosfato



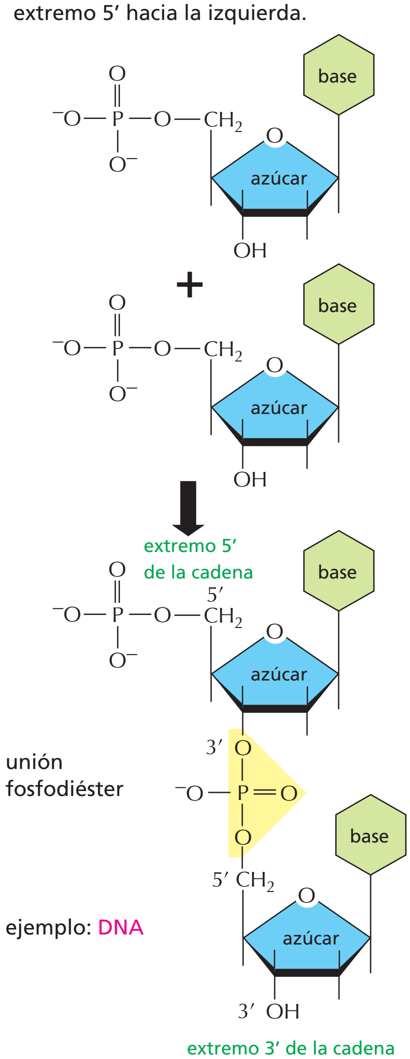
BASE + AZÚCAR = NUCLEÓSIDO



BASE + AZÚCAR + FOSFATO = NUCLEÓTIDO

ÁCIDOS NUCLEICOS

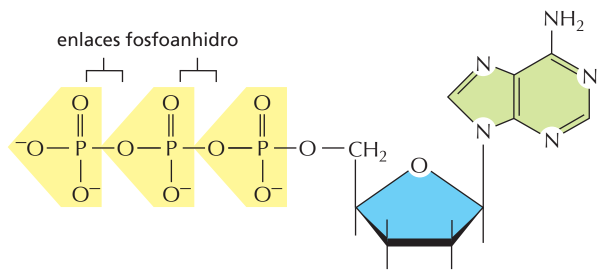
Los nucleótidos se unen mediante uniones fosfodiéster, entre los átomos de carbono 5′ y 3′, formando ácidos nucleicos. La secuencia lineal de los nucleótidos en una cadena de ácido nucleico se abrevia con un código de una sola letra, A—G—C—T—T—A—C—A, con el extremo 5′ hacia la izquierda.



ejemplo: DNA

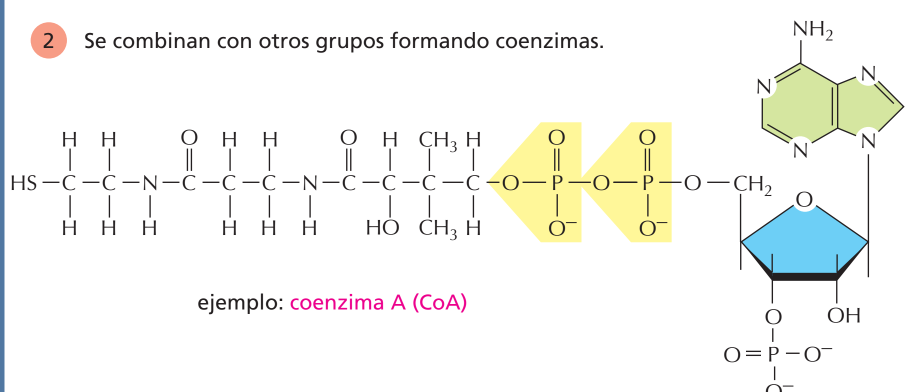
LOS NUCLEÓTIDOS DESEMPEÑAN MUCHAS OTRAS FUNCIONES

1. Transportan energía química en sus enlaces fosfoanhidro, fácilmente hidrolizables.



ejemplo: ATP (o ATP)

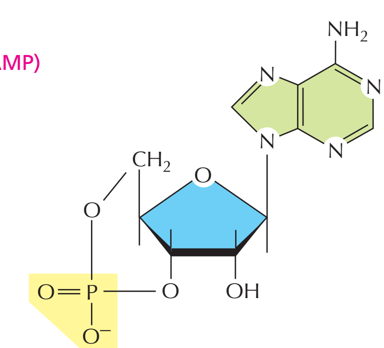
2. Se combinan con otros grupos formando coenzimas.



ejemplo: coenzima A (CoA)

3. Se utilizan como moléculas señalizadoras específicas en la célula.

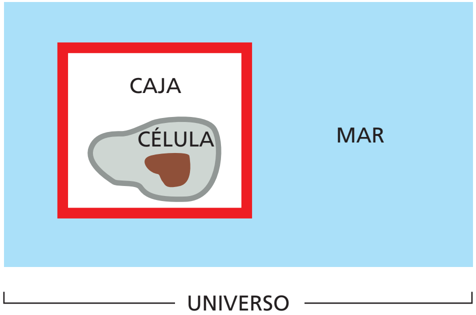
ejemplo: AMP cíclico (cAMP)



LA IMPORTANCIA DE LA ENERGÍA LIBRE PARA LAS CÉLULAS

La vida es posible gracias a las redes complejas de reacciones químicas que interaccionan y que ocurren en todas las células. Al observar las vías metabólicas que integran esta red se podría sospechar que la célula ha tenido la habilidad de obtener una enzima para llevar a cabo cada reacción necesaria. Pero no es así. Aunque las enzimas son poderosos catalizadores, solamente pueden acelerar aquellas reacciones que son termodinámicamente posibles; otras reacciones sólo se producen en las células porque están *acopladas* a reacciones muy favorables que las facilitan. Una pregunta crucial en la biología celular es si una reacción ocurre espontáneamente o necesita estar acoplada a otra reacción. La respuesta se obtiene en relación a una cantidad denominada *energía libre*: la variación total en energía libre en un conjunto de reacciones determina si puede ocurrir o no la secuencia entera de reacciones. En este panel, explicaremos algunas ideas fundamentales –derivadas de la *termodinámica*– necesarias para comprender qué es la energía libre y por qué es tan importante para las células.

LA ENERGÍA LIBERADA POR LOS CAMBIOS EN LOS ENLACES QUÍMICOS SE CONVIERTE EN CALOR



Un *sistema cerrado* se define como un conjunto de moléculas que no intercambian materia con el resto del universo (por ejemplo, la "célula en la caja" mostrada más arriba). Cualquier sistema como éste puede contener moléculas con un total de energía *E.* Esta energía puede distribuirse de distintas formas: parte como energía traslacional de las moléculas, parte como energía vibratoria y rotatoria, pero la mayoría como energía de enlace entre los átomos individuales que constituyen las moléculas. Supongamos que ocurre una reacción en el sistema. La primera ley de la termodinámica proporciona una limitación al tipo de reacciones que son posibles: establece que "en cualquier proceso, el total de energía del universo se mantiene constante". Por ejemplo, supongamos que la reacción A → B ocurre en algún lugar de la caja y libera una gran cantidad de energía química de enlace. Esta energía aumentará la intensidad de los movimientos moleculares (energía traslacional, vibratoria y rotatoria) en el sistema, que es equivalente a aumentar su temperatura. Sin embargo, este incremento de los movimientos será rápidamente transferido fuera del sistema por una serie de colisiones moleculares que calentarán las paredes de la caja y luego el mundo exterior (representado por el mar en nuestro ejemplo). Finalmente, el sistema vuelve a su temperatura inicial y en ese momento toda la energía química de enlace liberada se ha convertido en energía calorífica y transferida al exterior. De acuerdo con la primera ley, el cambio en energía en la caja (ΔE_{caja} a la que nos referiremos como ΔE) debe ser igual y de signo opuesto a la cantidad de energía calorífica transferida, que designaremos como h: esto es, $\Delta E = -h$. Así, la energía en la caja (E) disminuye cuando el calor sale del sistema.

E también puede cambiar durante una reacción a causa del trabajo que se realiza en el mundo exterior. Por ejemplo, supongamos que hay un pequeño incremento en el volumen (ΔV) de la caja durante una reacción. Como las paredes de la caja deben empujar contra la presión constante (P) que ejerce el medio para expandirse, esto supone un trabajo en el mundo exterior y requiere energía. La energía utilizada es $P(\Delta V)$ la cual según la primera ley debe disminuir la energía de la caja (E) en la misma cantidad. En la mayoría de las reacciones, la energía química de enlace se convierte tanto en trabajo como en calor. La *entalpía* (H) es una función compuesta que los incluye a ambos ($H = E + PV$). Para ser riguroso, es la variación de la entalpía (ΔH) en un sistema cerrado y no la variación de energía la que es igual al calor transferido al mundo exterior durante una reacción. Las reacciones en las que H disminuye, liberan calor al medio y se denominan "exotérmicas", mientras que las reacciones en las que H aumenta absorben calor del medio y se denominan "endotérmicas". Por lo tanto, $-h = \Delta H$. Sin embargo la variación de volumen es despreciable en la mayoría de las reacciones biológicas y una buena aproximación sería:

$$-h = \Delta H \cong \Delta E$$

LA SEGUNDA LEY DE LA TERMODINÁMICA

Consideremos un contenedor en el que hay 1000 monedas cara arriba. Si agitamos con fuerza el contenedor, sometiendo las monedas a los diversos movimientos aleatorios que todas las moléculas experimentan a causa de sus frecuentes colisiones con otras moléculas, acabaremos con más o menos la mitad de las monedas orientadas cara abajo. La causa de esta reorientación es que sólo existe una manera de restaurar el estado ordenado original de las monedas (cada moneda debe permanecer cara arriba), mientras que existen muchas maneras distintas (cerca de 10^{298}) de conseguir un estado desordenado en el que haya una mezcla equivalente de caras y de cruces; de hecho hay más maneras de alcanzar un estado al 50% (50-50) que de conseguir cualquier otra situación. Cada estado tiene una probabilidad de ocurrir que es proporcional al número de veces que se puede producir. La segunda ley de la termodinámica determina que "los sistemas cambiarán espontáneamente de estados de menor probabilidad a estados de mayor probabilidad". Como los estados de menor probabilidad son más "ordenados" que los estados de mayor probabilidad, la segunda ley puede ser reformulada de la siguiente forma: "el universo cambia constantemente en el sentido de alcanzar un mayor desorden".

LA ENTROPÍA, *S*

La segunda ley (pero no la primera ley) nos permite predecir el *sentido* de una reacción determinada. Pero para nuestro interés se necesita una medida adecuada de la probabilidad o, lo que es lo mismo, del grado de desorden de un estado. La entropía (S) es esta medida. Es una función logarítmica de la probabilidad tal que la *variación de entropía* (ΔS) que ocurre cuando la reacción A → B convierte un mol de A en un mol de B es

$$\Delta S = R \ln p_B / p_A$$

donde p_A y p_B son las probabilidades de los dos estados A y B, R es la constante de los gases (2 cal grado^{-1} mol^{-1}), y ΔS se mide en unidades de entropía (eu). En nuestro ejemplo inicial de las 1000 monedas, la probabilidad relativa de que todas estén cara arriba (estado A) en contra de que haya mitad de caras y mitad de cruces (estado B) es igual a la relación entre el número de vías a través de la cuales se puede obtener cada resultado. Se puede calcular que $p_A = 1$ y $p_B = 1000!(500! \times 500!) = 10^{299}$. Por lo tanto, el cambio de entropía para la reorientación de las monedas cuando el contenedor se agita y se obtiene una mezcla equitativa de caras y cruces es $R \ln (10^{298})$, o unos 1370 eu por mol de estos contenedores (6×10^{23} contenedores). Como ΔS es positiva para la transición del estado A al estado B ($p_B / p_A > 1$), las reacciones con un gran *incremento* de S (es decir para aquellas $\Delta S > 0$) se ven favorecidas y ocurrirán espontáneamente.

La energía calorífica provoca el movimiento aleatorio de las moléculas (véase Capítulo 2). Como la transferencia de calor de un sistema cerrado al medio aumenta el número de posibles disposiciones que las moléculas pueden tener en el mundo exterior, hay un aumento de su entropía. Se puede demostrar que la liberación de una cantidad fija de energía calorífica produce una mayor cantidad de desorden cuando la temperatura es más baja y el valor de ΔS para el medio (ΔS_{mar}) es igual a la cantidad de calor transferida al medio desde el sistema (h) dividido por la temperatura absoluta (T):

$$\Delta S_{mar} = h / T$$

LA ENERGÍA LIBRE DE GIBBS, *G*

Cuando tratamos con un sistema biológico cerrado, sería muy útil disponer de un método sencillo para predecir si una reacción determinada ocurrirá o no de forma espontánea en el sistema. Hemos visto que la cuestión crucial es si cuando se produce la reacción, el cambio de entropía del universo es positivo o negativo. En nuestro sistema ideal de la célula en una caja, la variación de entropía del universo tiene dos componentes separados –la variación de entropía para el sistema cerrado en la caja y la variación de entropía para el entorno "mar"– y para poder realizar cualquier predicción ambos deben considerarse a la vez. Por ejemplo, es posible que una reacción absorba calor y, en consecuencia, disminuya la entropía del mar ($\Delta S_{mar} < 0$) y al mismo tiempo cause tal grado de desorden dentro de la caja ($\Delta S_{caja} > 0$) que el total $\Delta S_{universo} = \Delta S_{mar} + \Delta S_{caja}$ sea mayor que 0. En este caso la reacción ocurrirá espontáneamente, aunque el mar no transmita calor a la caja durante la reacción. Un ejemplo de tal reacción es la disolución de cloruro de sodio en un recipiente que contiene agua ("la caja"), que es un proceso espontáneo aunque la temperatura del agua disminuya cuando la sal se disuelve.

Los químicos han encontrado útil definir un número de nuevas "funciones compuestas" que describan las combinaciones de las propiedades físicas de un sistema. Las propiedades que se pueden combinar incluyen la temperatura (T), la presión (P), el volumen (V), la energía (E) y la entropía (S). La entalpía (H) es una de estas funciones compuestas. Pero la función compuesta más útil para los biólogos es, con diferencia, la *energía libre de Gibbs*, *G*. Se utiliza como un instrumento que nos permite deducir la variación de entropía del universo como resultado de una reacción química en la caja, mientras que evita cualquier consideración separada del cambio de entropía en el mar. La definición de G es

$$G = H - TS$$

donde, para una caja de volumen V, H es la entalpía descrita anteriormente ($E + PV$), T es la temperatura absoluta y S es la entropía. Cada una de estas cantidades se aplica solamente en el interior de la caja. El cambio de energía libre durante una reacción en la caja (la G de los productos menos la G de los materiales de partida) se indica como ΔG y, tal como demostraremos ahora, es una medida directa de la cantidad de desorden que se genera en el universo cuando ocurre la reacción.

A temperatura constante, el cambio de energía libre (ΔG) durante una reacción es igual a $\Delta H - T\Delta S$. Recordando que $\Delta H = -h$, el calor absorbido del mar, tenemos

$$-\Delta G = -\Delta H + T\Delta S$$

$$-\Delta G = h + T\Delta S, \text{ y } -\Delta G/T = h/T + \Delta S$$

Sin embargo h/T equivale al cambio de entropía del mar (ΔS_{mar}), y el ΔS en la ecuación anterior es ΔS_{caja}. Por lo tanto

$$-\Delta G/T = \Delta S_{mar} + \Delta S_{caja} = \Delta S_{universo}$$

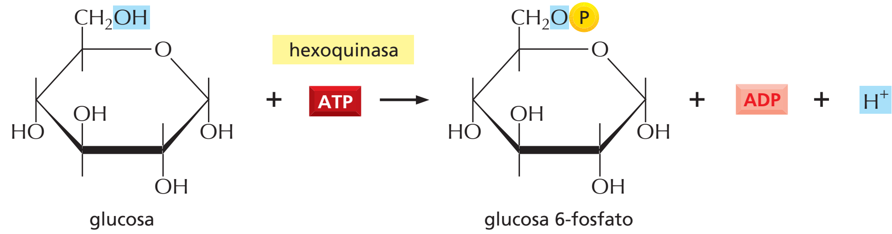
Así pues, la variación de energía libre es una medida directa del cambio de entropía del universo. Una reacción tendrá lugar en el sentido que haga que la variación de energía libre (ΔG) sea menor que cero, ya que cuando se produzca, habrá una variación de entropía positiva.

Para un conjunto complejo de reacciones acopladas que impliquen a muchas moléculas diferentes, la variación de energía libre total se puede medir simplemente sumando las energías libres de todas las especies moleculares diferentes después de la reacción, y comparando este valor con la suma de las energías totales antes de la reacción; para sustancias comunes existen tablas publicadas donde encontrar los valores de energía libre. De esta manera se puede predecir el sentido de una reacción y comprobar la posibilidad de que se produzca cualquier mecanismo. Por ejemplo, a partir de los valores para la magnitud del gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna mitocondrial y el ΔG para la hidrólisis del ATP en el interior de la mitocondria, la síntesis de ATP requiere la transferencia de más de un protón por cada una de las moléculas de ATP que se sintetizan.

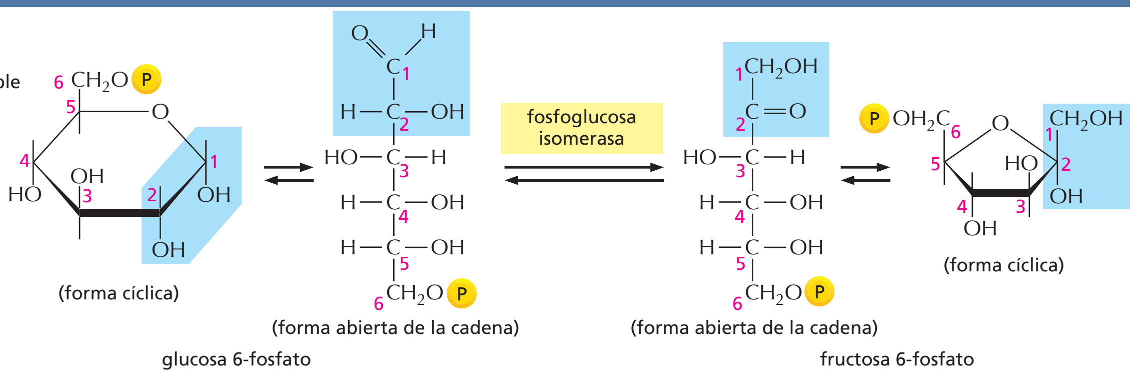
El valor de ΔG para una reacción es una medida directa de la distancia al equilibrio a la que se encuentra la reacción. El elevado valor negativo para la hidrólisis de ATP en una célula refleja simplemente el hecho de que las células mantienen la reacción de hidrólisis de ATP lejos del equilibrio, tanto como 10 órdenes de magnitud. Si una reacción alcanza el equilibrio, $\Delta G = 0$, entonces la reacción tiene lugar en ambos sentidos exactamente a la misma velocidad. Para la hidrólisis de ATP el equilibrio se alcanza cuando la gran mayoría del ATP se ha hidrolizado, tal como ocurre en una célula muerta.

En cada etapa, la parte de la molécula que sufre un cambio está sombreada en azul, y el nombre de la enzima que cataliza la reacción, en amarillo.

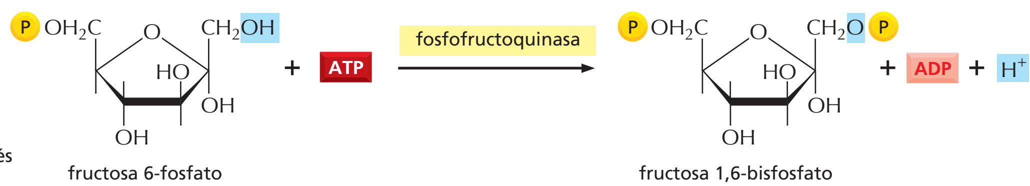
ETAPA 1 La glucosa es fosforilada por un ATP formando un azúcar fosfato. La carga negativa del fosfato evita el paso del azúcar fosfato a través de la membrana plasmática y retiene la glucosa en el interior de la célula.



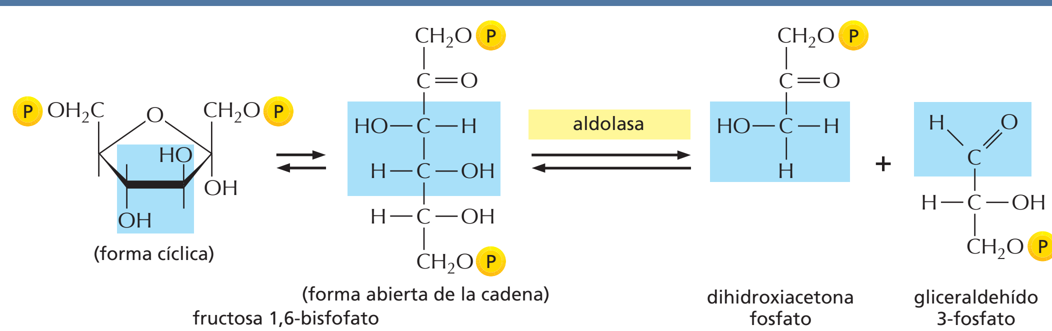
ETAPA 2 Una reordenación fácilmente reversible de la estructura química (isomerización) desplaza el oxígeno del grupo carbonilo desde el carbono 1 al carbono 2, formando una cetosa a partir de un azúcar aldosa. (Véase Panel 2-4.)



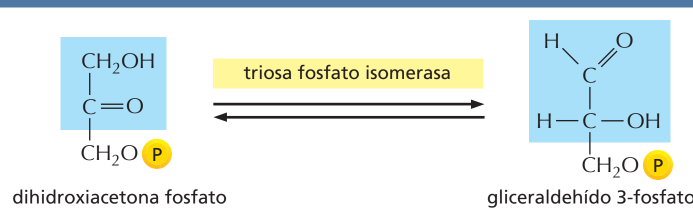
ETAPA 3 El nuevo grupo hidroxilo del carbono 1 es fosforilado por el ATP, como preparación para la formación de dos azúcares fosfato de tres carbonos cada uno. La entrada de azúcares en la glucólisis está controlada en este paso, a través de la regulación de la enzima *fosfofructoquinasa*.



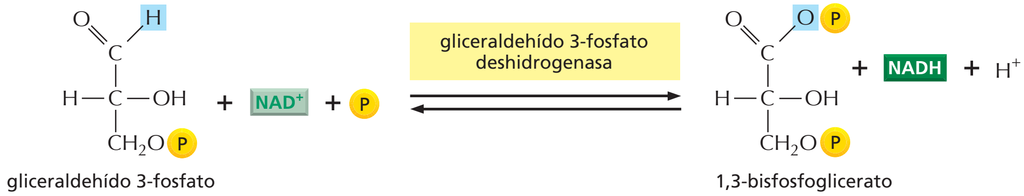
ETAPA 4 El azúcar de seis carbonos es hidrolizado, produciendo dos moléculas de tres carbonos. Sólo el gliceraldehído 3-fosfato puede continuar de inmediato a través de la glucólisis.



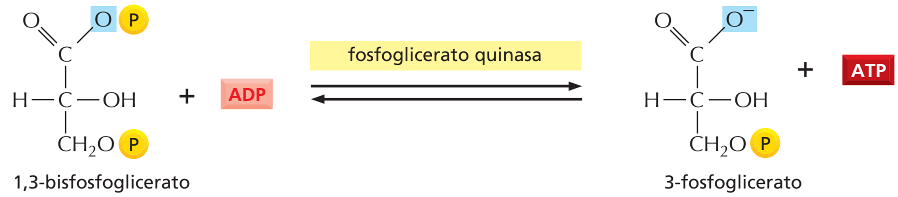
ETAPA 5 El otro producto de la etapa 4, la dihidroxiacetona fosfato, se isomeriza y forma gliceraldehído 3-fosfato.



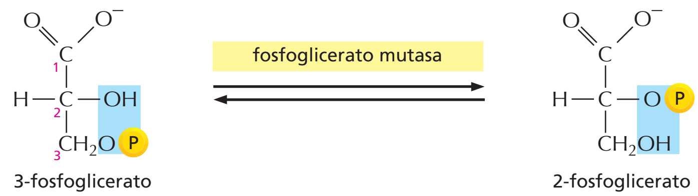
ETAPA 6 Se oxidan las dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato. Se inicia así la fase de generación de energía de la glucólisis, con la formación de NADH y un nuevo enlace anhidro rico en energía con el fosfato (véase Figura 2-73).



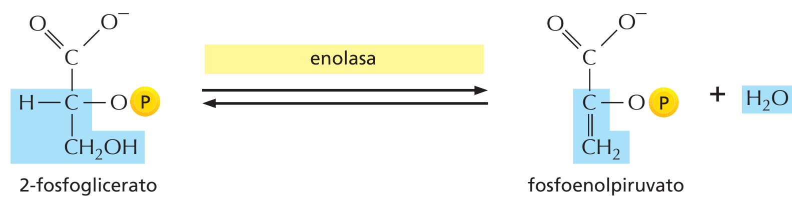
ETAPA 7
La transferencia al ADP del grupo fosfato rico en energía generado en la etapa 6, forma ATP.



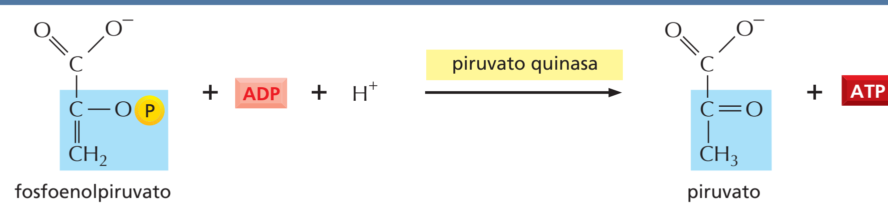
ETAPA 8 El enlace éster fosfato que queda en el 3-fosfoglicerato, cuya energía de hidrólisis es relativamente baja, es desplazado desde el carbono 3 hasta el carbono 2 y da lugar a 2-fosfoglicerato.



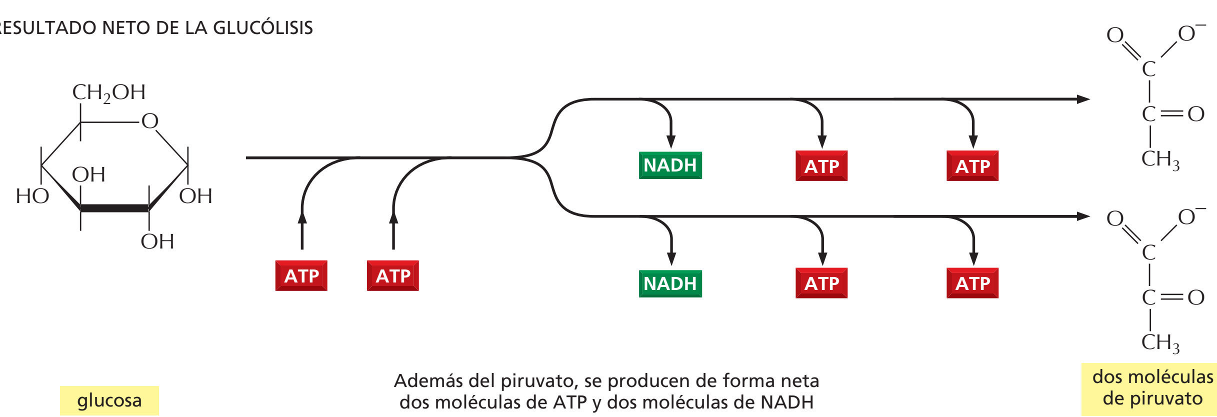
ETAPA 9 La eliminación de agua del 2-fosfoglicerato genera un enlace enol fosfato rico en energía.



ETAPA 10 La transferencia al ADP del grupo fosfato rico en energía generado en la etapa 9 produce ATP, completando la glucólisis.

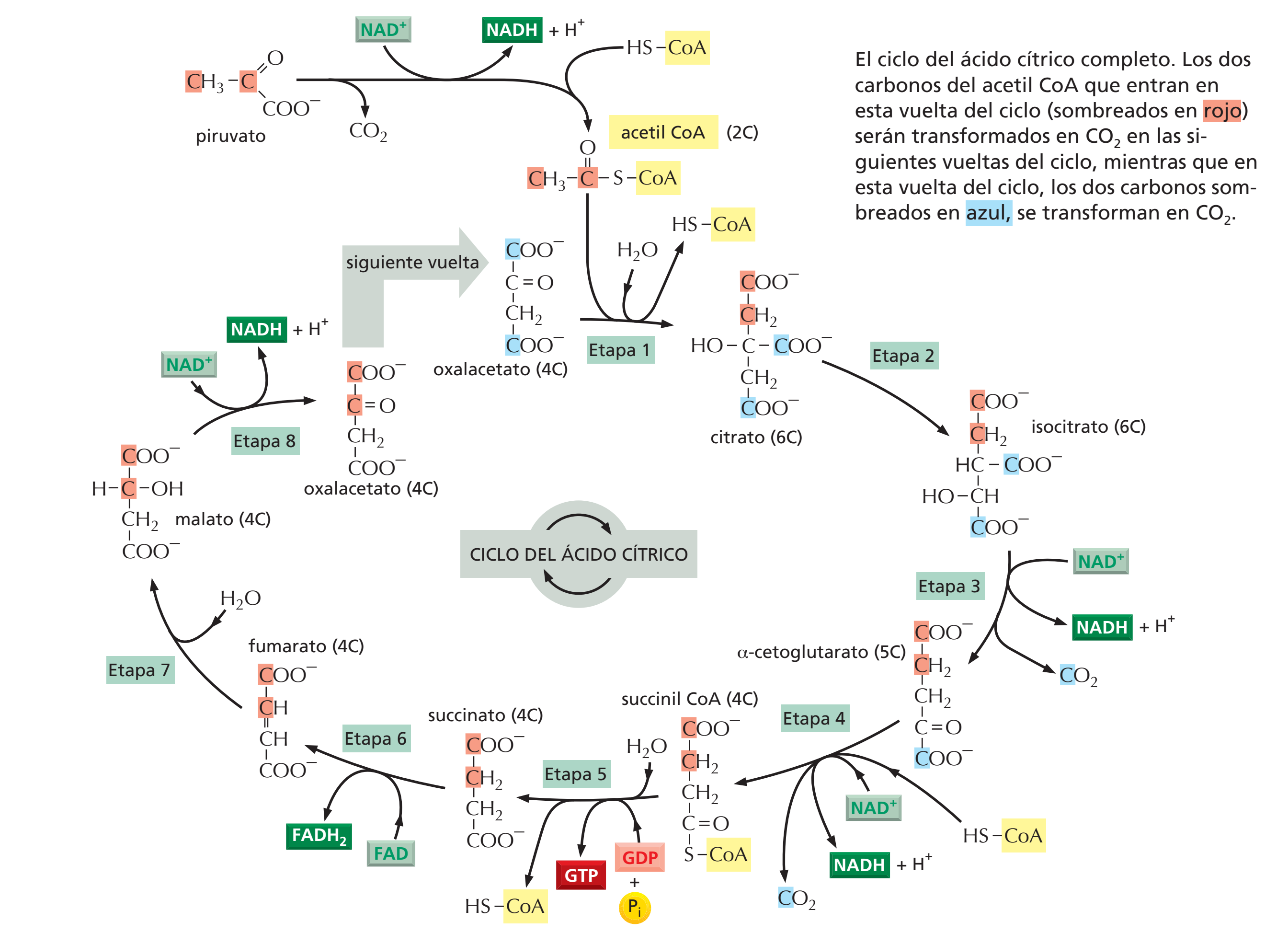


RESULTADO NETO DE LA GLUCÓLISIS



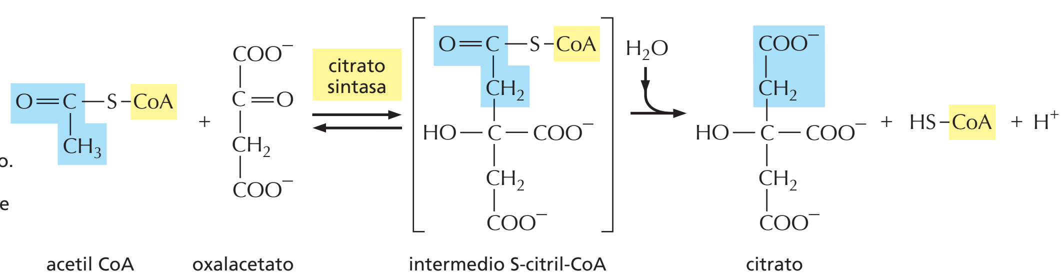
Además del piruvato, se producen de forma neta dos moléculas de ATP y dos moléculas de NADH

El ciclo del ácido cítrico completo. Los dos carbonos del acetil CoA que entran en esta vuelta del ciclo (sombreados en rojo) serán transformados en CO_2 en las siguientes vueltas del ciclo, mientras que en esta vuelta del ciclo, los dos carbonos sombreados en azul, se transforman en CO_2.

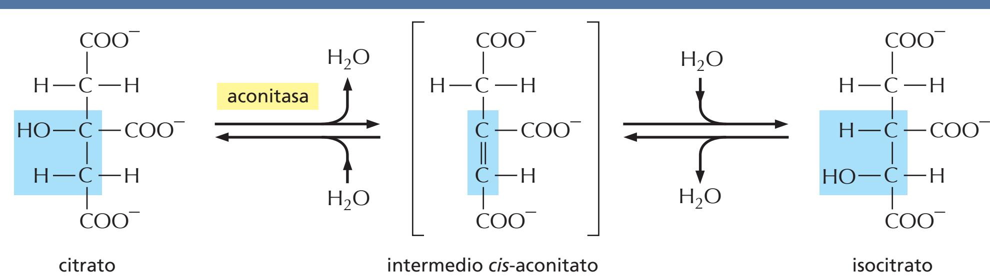


A continuación se muestran los detalles de las ocho etapas. En cada una, la parte de la molécula que sufre un cambio está sombreada en azul, y el nombre de la enzima que cataliza la reacción, sombreada en amarillo.

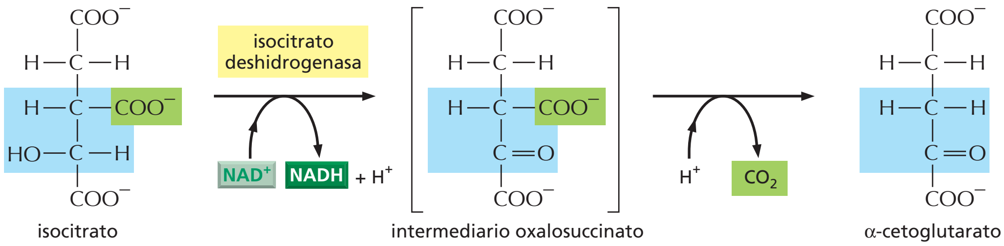
ETAPA 1 Después de que la enzima elimine un protón del grupo CH_3 del acetil CoA, el grupo CH_2^- cargado negativamente forma un enlace con el carbono del grupo carbonilo del oxalacetato. La pérdida de la coenzima A (CoA) por hidrólisis da un fuerte impulso a la reacción.



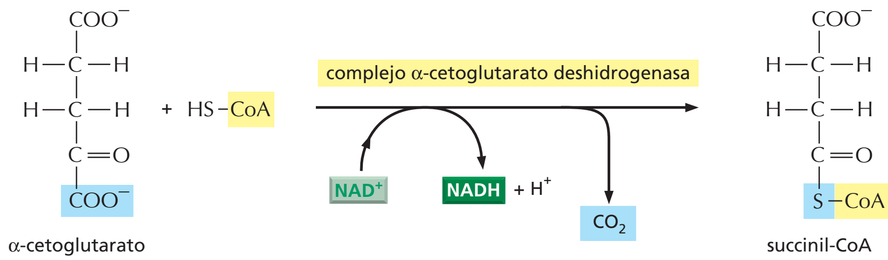
ETAPA 2 Una reacción de isomerización, en la que primero se elimina agua y posteriormente se añade de nuevo, desplaza el grupo hidroxilo de un átomo de carbono a su vecino.



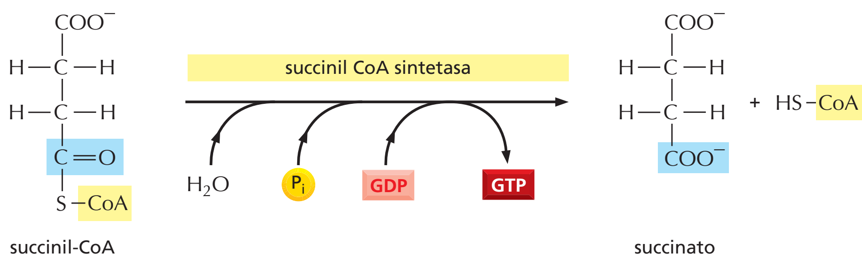
ETAPA 3 En la primera de las cuatro etapas de oxidación del ciclo, el carbono que transporta el grupo hidroxilo se transforma en un grupo carbonilo. El producto posterior es inestable, perdiendo CO_2 mientras aún está unido a la enzima.



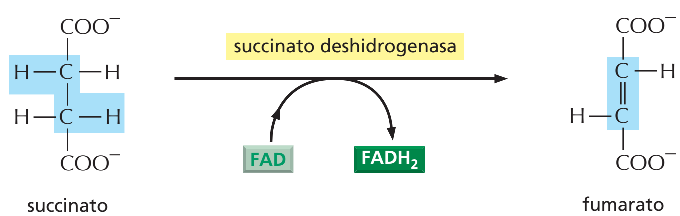
ETAPA 4 El complejo *α-cetoglutarato deshidrogenasa* es muy parecido al gran complejo enzimático que transforma el piruvato en acetil CoA *(piruvato deshidrogenasa).* También cataliza una oxidación que produce NADH, CO_2, y un enlace tioéster rico en energía unido al coenzima A (CoA).



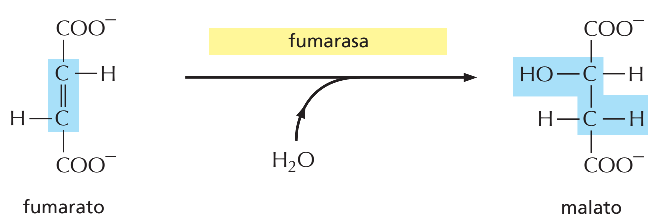
ETAPA 5 Una molécula de fosfato de la solución desplaza el CoA, formando un enlace rico en energía entre el fosfato y el succinato. A continuación, este fosfato pasa a un GDP formando GTP. (En el caso de las bacterias y las plantas, se forma ATP.)



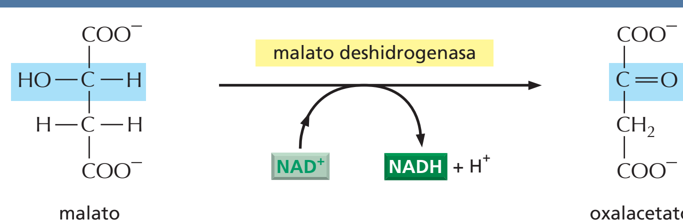
ETAPA 6 En la tercera Etapa de oxidación del ciclo, el FAD elimina dos átomos de hidrógeno del succinato.



ETAPA 7 La adición de agua al fumarato coloca un grupo hidroxilo cerca del carbono del grupo carbonilo.



ETAPA 8 En la última de las cuatro etapas de oxidación del ciclo, el carbono que tiene un grupo hidroxilo es transformado en un grupo carbonilo, regenerando el oxalacetato necesario en la primera etapa.



BIBLIOGRAFÍA

General

Berg, JM, Tymoczko, JL & Stryer L (2006) Biochemistry, 6.ª ed. New York: WH Freeman.

Garrett RH & Grisham CM (2005) Biochemistry, 3.ª ed. Philadelphia: Thomson Brooks/Cole.

Horton HR, Moran LA, Scrimgeour et al (2005) Principles of Biochemistry 4.ª ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.

Nelson DL & Cox MM (2009), Principios de bioquímica Lehninger 5.ª ed. Barcelona. Ediciones Omega.

Nicholls DG & Ferguson SJ (2002) Bioenergetics, 3.ª ed. New York: Academic Press

Mathews CK, van Holde KE & Ahern K-G (2000) Biochemistry, 3.ª ed. San Francisco: Benjamin Cummings.

Moore JA (1993) Science As a Way of Knowing. Cambridge, MA: Harvard University Press.

Voet D, Voet JG & Pratt CM (2004) Fundamentals of Biochemistry, 2.ª ed. New York: Wiley.

Los componentes químicos de la célula

Abeles RH, Frey PA & Jencks WP (1992) Biochemistry. Boston: Jones & Bartlett.

Atkins PW (1996) Molecules. New York: WH Freeman.

Branden C & Tooze J (1999) Introduction to Protein Structure, 2.ª ed. New York: Garland Science.

Bretscher MS (1985) The molecules of the cell membrane. *Sci Am* 253:100–109.

Burley SK & Petsko GA (1988) Weakly polar interactions in proteins. *Adv Protein Chem* 39:125–189.

De Duve C (2005) Singularities: Landmarks on the Pathways of Life. Cambridge: Cambridge University Press.

Dowhan W (1997) Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids? *Annu Rev Biochem* 66:199–232.

Eisenberg D & Kauzman W (1969) The Structure and Properties of Water. Oxford: Oxford University Press.

Fersht AR (1987) The hydrogen bond in molecular recognition. *Trends Biochem Sci* 12:301–304.

Franks F (1993) Water. Cambridge: Royal Society of Chemistry.

Henderson LJ (1927) The Fitness of the Environment, 1958 ed. Boston: Beacon.

Neidhardt FC, Ingraham JL & Schaechter M (1990) Physiology of the Bacterial Cell: A Molecular Approach. Sunderland, MA: Sinauer.

Pauling L (1960) The Nature of the Chemical Bond, 3.ª ed. Ithaca, NY: Cornell University Press.

Saenger W (1984) Principles of Nucleic Acid Structure. New York: Springer.

Sharon N (1980) Carbohydrates. *Sci Am* 243:90–116.

Stillinger FH (1980) Water revisited. *Science* 209:451–457.

Tanford C (1978) The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science* 200:1012–1018.

Tanford C (1980) The Hydrophobic Effect. Formation of Micelles and Biological Membranes, 2.ª ed. New York: John Wiley.

Catálisis y utilización de energía por las células

Atkins PW (1994) The Second Law: Energy, Chaos and Form. New York: Scientific American Books.

Atkins PW & De Paula JD (2006) Physical Chemistry for the Life Sciences. Oxford: Oxford University Press.

Baldwin JE & Krebs H (1981) The Evolution of Metabolic Cycles. *Nature* 291:381–382.

Berg HC (1983) Random Walks in Biology. Princeton, NJ: Princeton University Press.

Dickerson RE (1969) Molecular Thermodynamics. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings.

Dill KA & Bromberg S (2003) Molecular Driving Forces: Statistical Thermodynamics in Chemistry and Biology. New York: Garland Science.

Dressler D & Potter H (1991) Discovering Enzymes. New York: Scientific American Library.

Einstein A (1956) Investigations on the Theory of Brownian Movement. New York: Dover.

Fruton JS (1999) Proteins, Enzymes, Genes: The Interplay of Chemistry and Biology. New Haven: Yale University Press.

Goodsell DS (1991) Inside a living cell. *Trends Biochem Sci* 16:203–206.

Karplus M & McCammon JA (1986) The dynamics of proteins. *Sci Am* 254:42–51.

Karplus M & Petsko GA (1990) Molecular dynamics simulations in biology. *Nature* 347:631–639.

Kauzmann W (1967) Thermodynamics and Statistics: with Applications to Gases. In Thermal Properties of Matter Vol 2. New York: WA Benjamin, Inc.

Kornberg A (1989) For the Love of Enzymes. Cambridge, MA: Harvard University Press.

Lavenda BH (1985) Brownian Motion. *Sci Am* 252:70–85.

Lawlor DW (2001) Photosynthesis, 3.ª ed. Oxford: BIOS.

Lehninger AL (1971) The Molecular Basis of Biological Energy Transformations, 2.ª ed. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings.

Lipmann F (1941) Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Adv Enzymol* 1:99–162.

Lipmann F (1971) Wanderings of a Biochemist. New York: Wiley.

Nisbet EE & Sleep NH (2001) The habitat and nature of early life. *Nature* 409:1083–1091.

Racker E (1980) From Pasteur to Mitchell: a hundred years of bioenergetics. *Fed Proc* 39:210–215.

Schrödinger E (1944 & 1958) What is Life?: The Physical Aspect of the Living Cell and Mind and Matter, 1992 combined ed. Cambridge: Cambridge University Press.

van Holde KE, Johnson WC & Ho PS (2005) Principles of Physical Biochemistry, 2.ª ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.

Walsh C (2001) Enabling the chemistry of life. *Nature* 409:226–231.

Westheimer FH (1987) Why nature chose phosphates. *Science* 235:1173–1178.

Youvan DC & Marrs BL (1987) Molecular mechanisms of photosynthesis. *Sci Am* 256:42–49.

Cómo las células obtienen energía de los alimentos

Cramer WA & Knaff DB (1990) Energy Transduction in Biological Membranes. New York: Springer-Verlag.

Dismukes GC, Klimov VV, Baranov SV et al (2001) The origin of atmospheric oxygen on Earth: The innovation of oxygenic photosyntheis. *Proc Nat Acad Sci USA* 98:2170–2175.

Fell D (1997) Understanding the Control of Metabolism. London: Portland Press.

Flatt JP (1995) Use and storage of carbohydrate and fat. *Am J Clin Nutr* 61, 952S–959S.

Friedmann HC (2004) From *Butybacterium* to *E. coli*: An essay on unity in biochemistry. *Perspect Biol Med* 47:47–66.

Fothergill-Gilmore LA (1986) The evolution of the glycolytic pathway. *Trends Biochem Sci* 11:47–51.

Heinrich R, Melendez-Hevia E, Montero F et al (1999) The structural design of glycolysis: An evolutionary approach. *Biochem Soc Trans* 27: 294–298.

Huynen MA, Dandekar T & Bork P (1999) Variation and evolution of the citric-acid cycle: a genomic perspective. *Trends Microbiol* 7:281–291.

Kornberg HL (2000) Krebs and his trinity of cycles. *Nature Rev Mol Cell Biol* 1:225–228.

Krebs HA & Martin A (1981) Reminiscences and Reflections. Oxford/New York: Clarendon Press/Oxford University Press.

Krebs HA (1970) The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspect Biol Med* 14:154–170.

Martin BR (1987) Metabolic Regulation: A Molecular Approach. Oxford: Blackwell Scientific.

McGilvery RW (1983) Biochemistry: A Functional Approach, 3.ª ed. Philadelphia: Saunders.

Morowitz HJ (1993) Beginnings of Cellular Life: Metabolism Recapitulates Biogenesis. New Haven: Yale University Press

Newsholme EA & Start C (1973) Regulation of Metabolism. New York: Wiley.

3 Proteínas

En este capítulo

FORMA Y ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS 125

FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS 152

Cuando miramos una célula al microscopio o analizamos su actividad eléctrica o bioquímica, en esencia estamos observando proteínas. Las proteínas constituyen la mayor parte del peso seco de una célula. Sin embargo, las proteínas no son sólo los elementos estructurales de las células sino que también ejecutan prácticamente todas las funciones celulares. Por ejemplo, las enzimas proporcionan las intrincadas superficies moleculares que facilitan la gran cantidad de reacciones químicas de una célula. Algunas proteínas embebidas en la membrana plasmática forman canales y bombas que controlan el paso de pequeñas moléculas hacia dentro y hacia fuera de la célula. Otras proteínas transportan mensajes de una célula a otra, mientras que otras proteínas actúan como integradoras de señales, capaces de transmitir la información de ciertas señales desde la membrana plasmática hasta el núcleo de las células. Otras proteínas actúan como delicadas máquinas moleculares que tienen elementos móviles: la *quinesina*, por ejemplo, propulsa a los orgánulos a través del citoplasma; la *topoisomerasa* puede desenredar los enrollamientos de las moléculas de DNA. Otras proteínas especializadas actúan como anticuerpos, toxinas, hormonas, moléculas anticongelantes, fibras elásticas, cuerdas o fuentes de luminiscencia. Antes de que podamos llegar a entender cómo funcionan los genes, cómo se contraen los músculos, cómo conducen la electricidad los nervios, cómo se desarrollan los embriones o cómo funcionan nuestros cuerpos, hemos de conocer las proteínas.

FORMA Y ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS

Desde un punto de vista químico, las proteínas son, con diferencia, las moléculas estructuralmente más complejas y funcionalmente más sofisticadas que se conocen. Esto quizá no resulta sorprendente cuando nos damos cuenta de que la estructura y las propiedades químicas de cada proteína se han ido desarrollando y afinando a lo largo de miles de millones de años de historia evolutiva. Incluso para los expertos, la extraordinaria versatilidad de las proteínas resulta verdaderamente asombrosa.

En esta sección consideramos de qué manera la localización de cada aminoácido en la larga serie de aminoácidos que forma una proteína determina su forma tridimensional precisa. Al final del capítulo utilizaremos el conocimiento de la estructura de una proteína a escala atómica para describir de qué manera su forma precisa determina, a su vez, su función en la célula.

La forma de una proteína está especificada en su secuencia de aminoácidos

En las proteínas hay 20 tipos diferentes de aminoácidos, cada uno de los cuales tiene propiedades químicas diferentes. Una molécula de **proteína** está formada por una larga cadena de estos aminoácidos, cada uno de los cuales está unido a su vecino mediante un enlace covalente peptídico. Por ello, a las proteínas también se las conoce como *polipéptidos*. Cada tipo de proteína tiene una secuencia única de aminoácidos y se conocen muchos miles de proteínas diferentes, cada una de ellas con su particular secuencia de aminoácidos.

La secuencia repetida de átomos a lo largo de la cadena se conoce como el **esqueleto polipeptídico**. Unidas a esta cadena repetitiva están aquellas partes de los aminoácidos que no participan en la formación del enlace peptídico y que confieren a cada uno de los ami-

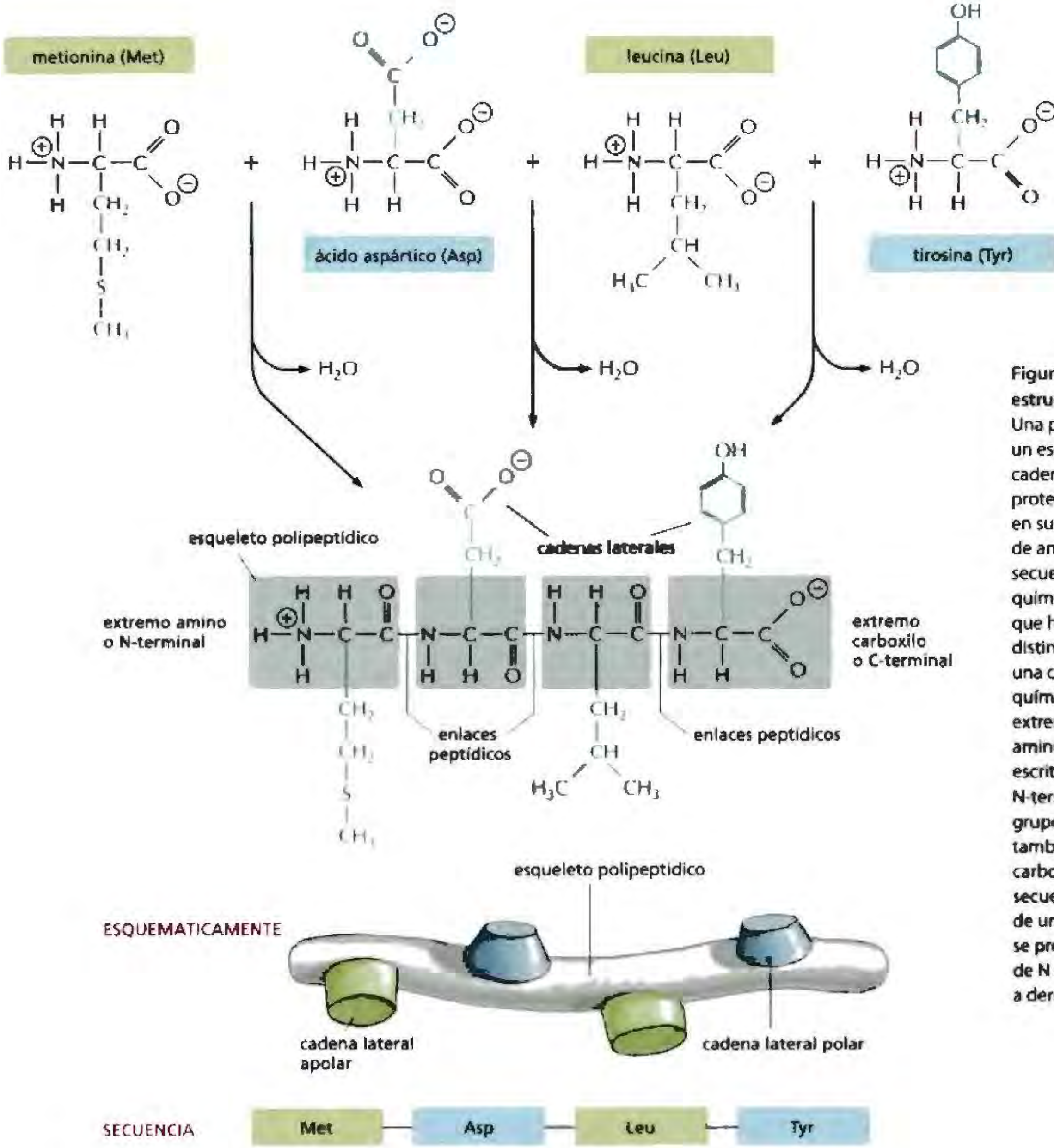


Figura 3–1 Los componentes estructurales de una proteína. Una proteína está formada por un esqueleto polipeptídico con cadenas laterales. Cada tipo de proteína difiere de las demás en su secuencia y en su número de aminoácidos; así pues, la secuencia de cadenas laterales químicamente diferentes es la que hace que cada proteína sea distinta. Los dos extremos de una cadena polipeptídica son químicamente diferentes: el extremo portador del grupo amino libre (NH_3^+, también escrito NH_2) es el amino, o N-terminal, y el portador del grupo carboxilo libre (COO^-, también escrito COOH) es el carboxilo, o C-terminal. La secuencia de aminoácidos de una proteína siempre se presenta en la dirección de N a C y se lee de izquierda a derecha.

noácidos sus propiedades características: las 20 **cadenas laterales** diferentes (**Figura 3–1**). Algunas de estas cadenas laterales son apolares e hidrofóbicas ("odian el agua"), otras están cargadas positiva o negativamente, algunas forman enlaces covalentes, etc. En el **Panel 3–1** (pp. 128-129) se presentan sus estructuras atómicas y en la **Figura 3–2** se presenta una lista de sus abreviaturas.

Como se explicó en el Capítulo 2, los átomos se comportan casi como si fueran pesadas esferas de un radio determinado (su *radio de van der Waals*). El requerimiento de que dos átomos no pueden solaparse limita claramente el número posible de ángulos de enlace en una cadena polipeptídica (**Figura 3–3**). Estas fuerzas y otras interacciones estéricas reducen en gran medida el número de disposiciones tridimensionales posibles (o *conformaciones*). A pesar de ello, una larga cadena flexible, como por ejemplo la de una proteína, puede plegarse en un número enorme de posibilidades diferentes.

Sin embargo, el plegamiento de una cadena proteica también está condicionado por muchos tipos diferentes de *enlaces no-covalentes* débiles, formados entre partes de la propia cadena. Esto implica átomos del esqueleto polipeptídico así como átomos de las cadenas laterales de los aminoácidos. Existen tres tipos diferentes de enlaces débiles: los *enlaces de hidrógeno*, las *atracciones electrostáticas* y las *atracciones de van der Waals*, como se describe en el Capítulo 2 (véase p. 54). Cada uno de los enlaces no-covalentes son de 30 a 300 veces

...NOÁCIDO			CADENA LATERAL
...pártico	Asp	D	negativa
...glutamico	Glu	E	negativa
...	Arg	R	positiva
...	Lys	K	positiva
...	His	H	positiva
...gina	Asn	N	polar no cargada
...ina	Gln	Q	polar no cargada
...	Ser	S	polar no cargada
...	Thr	T	polar no cargada
...	Tyr	Y	polar no cargada

AMINOÁCIDOS POLARES

AMINOÁCIDO			CADENA LATERAL
Alanina	Ala	A	apolar
Glicina	Gly	G	apolar
Valina	Val	V	apolar
Leucina	Leu	L	apolar
Isoleucina	Ile	I	apolar
Prolina	Pro	P	apolar
Fenilalanina	Phe	F	apolar
Metionina	Met	M	apolar
Triptófano	Trp	W	apolar
Cisteína	Cys	C	apolar

AMINOÁCIDOS APOLARES

Figura 3-2 Los 20 aminoácidos que forman las proteínas. Cada aminoácido se puede representar mediante las abreviaturas de una o de tres letras. El número de cadenas laterales polares es igual al de cadenas laterales apolares; sin embargo, alguna de las cadenas laterales representadas son suficientemente grandes para tener ciertas propiedades apolares (p. ej. Tyr, Thr, Arg, Lys). Para conocer sus estructuras atómicas, véase el Panel 3-1 (pp. 128-129).

...s que los típicos enlaces covalentes de las moléculas biológicas. Sin embargo mu... ...es débiles actúan en paralelo unos con otros y mantienen fuertemente unidas dos ... de una cadena polipeptídica. De esta forma, la fuerza combinada de un gran nú... ...estos enlaces determina la estabilidad de cada forma plegada (**Figura 3–4**).

... una cuarta fuerza débil que también desempeña un papel central en la determi... ...de la forma de una proteína. Como se describe en el Capítulo 2, las moléculas hidró... ...cluyendo las cadenas laterales apolares de algunos aminoácidos, tienden a unirse ...tras cuando se hallan en un entorno acuoso, minimizando el efecto disruptor de la ...moléculas de agua unidas entre sí por enlaces de hidrógeno (véase p. 54 y el Panel 2-2, ...). Por lo tanto, un factor importante que condiciona el plegamiento de cualquier ... es la distribución de sus aminoácidos polares y apolares. Las cadenas laterales apo... ...hidrófobas) de una proteína –correspondientes a aminoácidos tales como la fenilalani... ...ucina, la valina o el triptófano– tienden a aglutinarse en el interior de la molécula (de ... parecida a como las gotitas de aceite coalescen formando una sola gota grande). Es... ...ad les permite evitar el contacto con el agua que las rodea en el interior de la célu... ... contrario, los grupos polares –como los correspondientes a la arginina, la glutamina ...ina– tienden a disponerse cerca de la superficie exterior de la molécula, donde pue... ...r enlaces de hidrógeno con el agua y con otras moléculas polares (**Figura 3–5**). Ge-

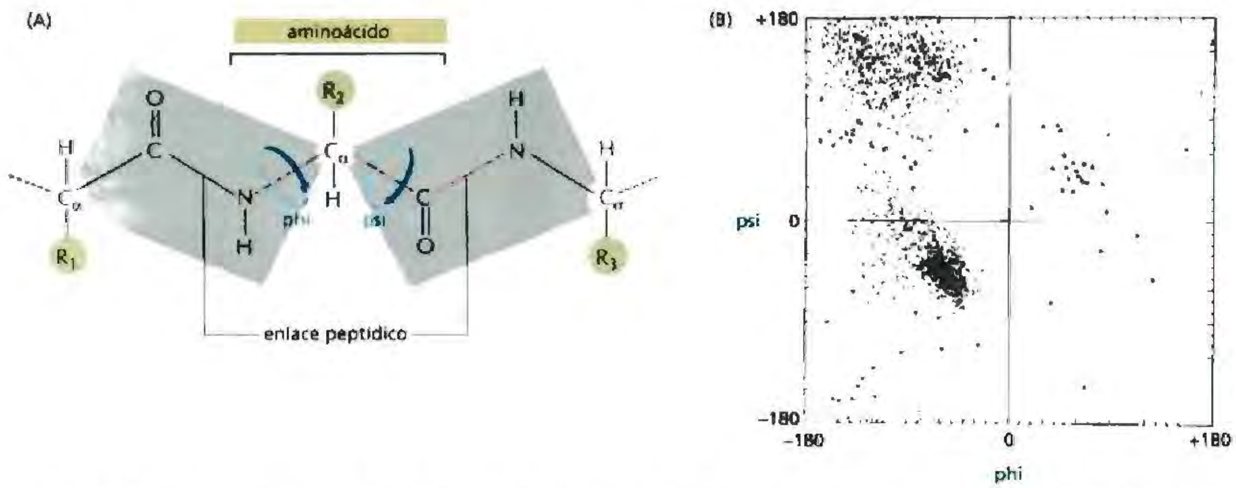
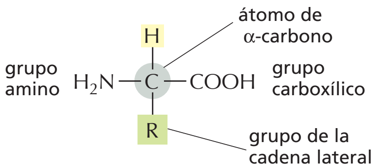


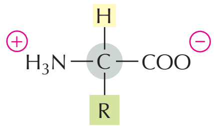
Figura 3–3 **Limitaciones estéricas de los ángulos de enlace en una cadena polipeptídica.** (A) Cada aminoácido contribuye con tres enlaces (en *rojo*) al esqueleto de la cadena. El enlace peptídico es plano (*sombreado en gris*) y no permite rotación. Por el contrario, se puede producir rotación sobre el enlace C_α–C, a este ángulo de rotación se le denomina psi (ψ), y sobre el enlace N–C_α , a este ángulo de rotación se le denomina phi (ϕ). Por convenio, el grupo R representa una cadena lateral de un aminoácido (*círculos verdes*). (B) La conformación de los átomos principales de una cadena proteica viene determinada por un par de ángulos ϕ y ψ para cada aminoácido; debido a las colisiones estéricas entre los átomos de los aminoácidos, la mayoría de los pares de ángulos ϕ y ψ no son posibles. En este gráfico, llamado de Ramachandran, cada punto representa un par de ángulos observados en proteínas. El grupo de puntos en el cuadrante inferior izquierdo representa todos los aminoácidos localizados en estructura de hélice α (véase Figura 3–7A). (B, de J. Richardson, *Adv. Prot. Chem.* 34:174-175, 1981. Con la autorización de Academic Press.)

EL AMINOÁCIDO

La fórmula general de un aminoácido es

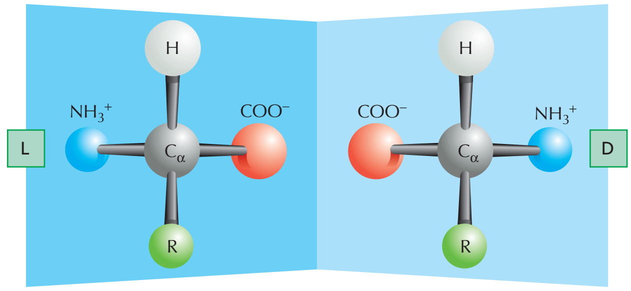


R es una de las 20 cadenas laterales diferentes. A pH 7 tanto el grupo amino como el carboxilo están ionizados.



ISÓMEROS ÓPTICOS

El carbono α es asimétrico, lo cual permite tener dos imágenes especulares (o esteroisómeros), L y D.



Las proteínas contienen exclusivamente L-aminoácidos.

FAMILIAS DE AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos comunes se agrupan en función de si sus cadenas laterales son

- ácidas
- básicas
- polares sin carga
- no polares

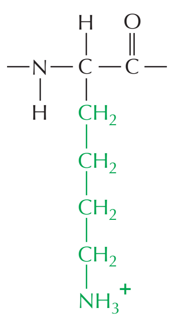
Los nombres de estos 20 aminoácidos tienen abreviaturas de tres letras y también de una letra.

Así: alanina = Ala = A

CADENAS LATERALES BÁSICAS

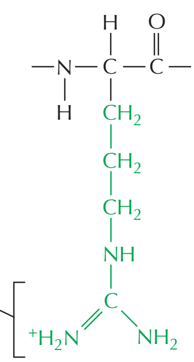
lisina

(Lys o K)



arginina

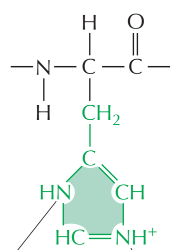
(Arg o R)



Este grupo es muy básico debido a que su carga positiva está estabilizada por resonancia.

histidina

(His o H)

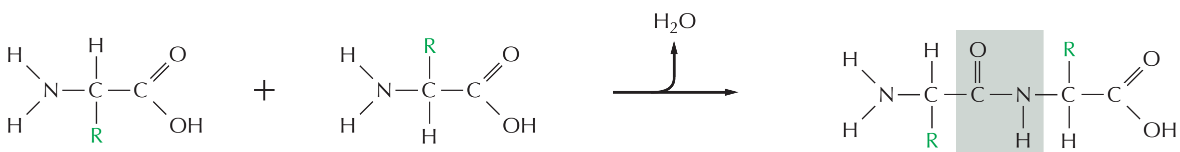


Estos nitrógenos tienen una afinidad relativamente débil por un H^+ y a pH neutro son sólo parcialmente positivos.

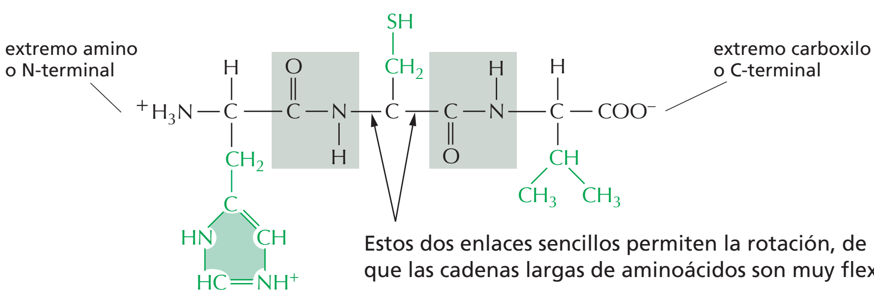
ENLACES PEPTÍDICOS

Generalmente los aminoácidos se unen entre sí mediante una unión amida, que recibe el nombre de enlace peptídico.

Enlace peptídico: Los cuatro átomos de cada *casilla gris* forman una unidad plana rígida. Sin rotación alrededor del enlace C–N.



Las proteínas son grandes polímeros de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos y siempre se representan con el extremo N-terminal hacia la izquierda. La secuencia de este tripéptido es histidina-cisteína-valina.

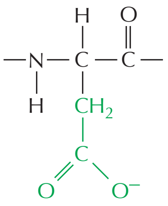


Estos dos enlaces sencillos permiten la rotación, de modo que las cadenas largas de aminoácidos son muy flexibles.

CADENAS LATERALES ÁCIDAS

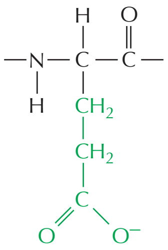
ácido aspártico

(Asp o D)



ácido glutámico

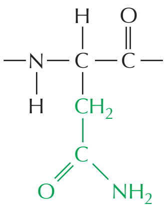
(Glu o E)



CADENAS LATERALES POLARES SIN CARGA

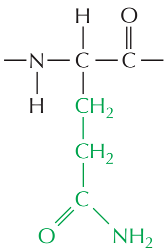
asparagina

(Asn o N)



glutamina

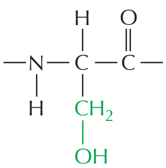
(Gln o Q)



A pesar de que el N de la amida no está cargado a pH neutro, la molécula es polar.

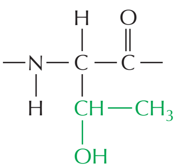
serina

(Ser o S)



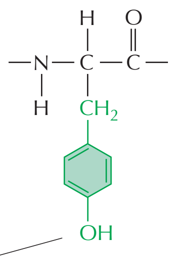
treonina

(Thr o T)



tirosina

(Tyr o Y)

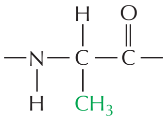


El grupo –OH es polar.

CADENAS LATERALES NO-POLARES

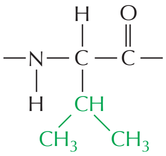
alanina

(Ala o A)



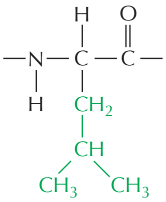
valina

(Val o V)



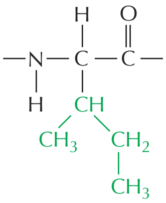
leucina

(Leu o L)



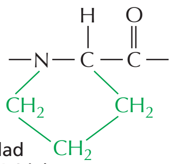
isoleucina

(Ile o I)



prolina

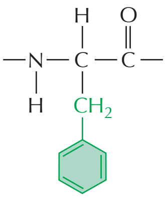
(Pro o P)



(en realidad un iminoácido)

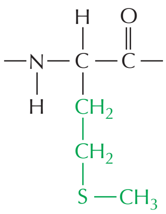
fenilalanina

(Phe o F)



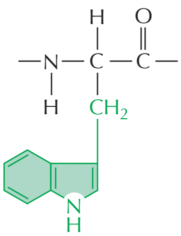
metionina

(Met o M)



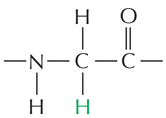
triptófano

(Trp o W)



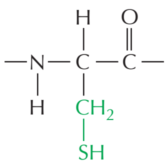
glicina

(Gly o G)



cisteína

(Cys o C)



En las proteínas se pueden formar enlaces disulfuro entre las cadenas laterales de dos cisteínas.

$$- -CH_2-S-S-CH_2- -$$

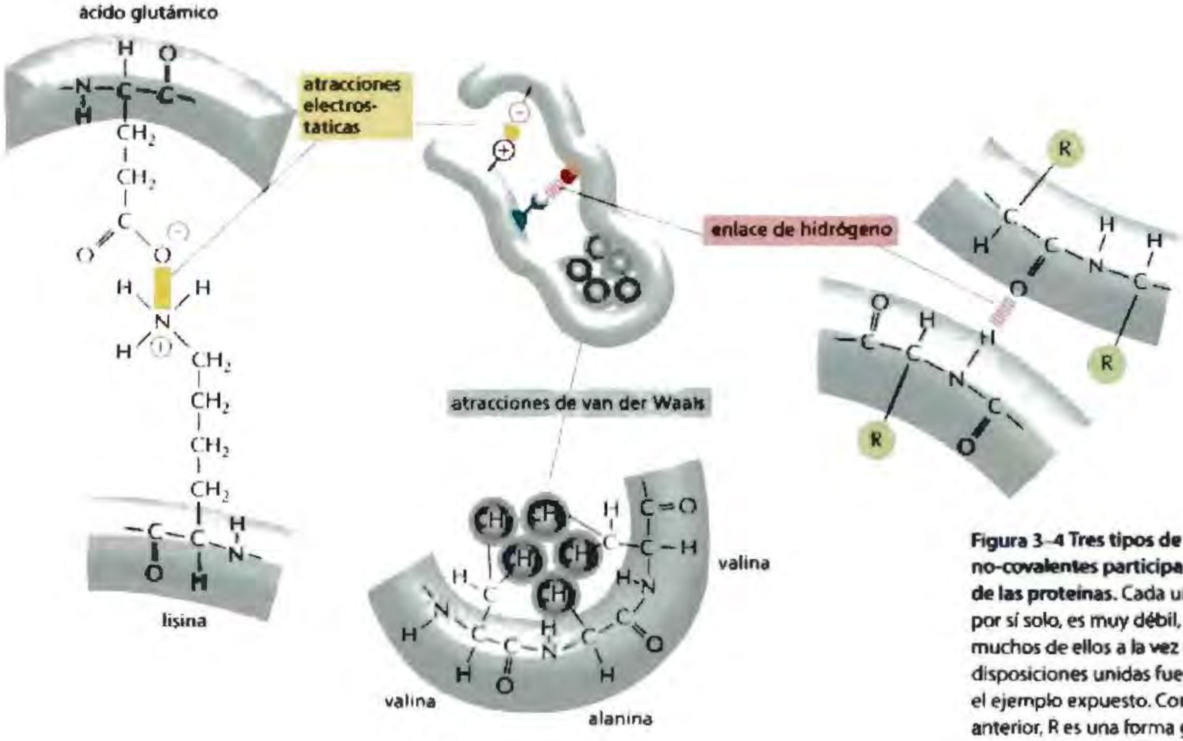


Figura 3-4 Tres tipos de enlaces no-covalentes participan en el plegamiento de las proteínas. Cada uno de estos enlaces, por sí solo, es muy débil, pero si se forman muchos de ellos a la vez dan lugar a disposiciones unidas fuertemente, como en el ejemplo expuesto. Como en la figura anterior, R es una forma general de designar una cadena lateral de un aminoácido.

neralmente, los aminoácidos polares escondidos dentro de una proteína establecen enlaces de hidrógeno con otros aminoácidos polares o con el esqueleto polipeptídico.

Las proteínas se pliegan adoptando la conformación de menor energía

Como resultado de todas estas interacciones, la mayoría de proteínas tienen una estructura tridimensional particular, determinada por el orden de los aminoácidos de su cadena. Por lo general, la estructura plegada final, o **conformación**, de cualquier cadena polipeptídica es aquella que minimiza su cantidad de energía libre. Los biólogos han estudiado el plegamiento de las proteínas en tubos de ensayo utilizando proteínas altamente purificadas. El tratamiento con ciertos solventes, que rompen las interacciones no-covalentes que mantienen plegada la cadena, despliega o *desnaturaliza* la proteína. Este tratamiento transforma la proteína en una cadena polipeptídica flexible que ha perdido su forma natural. A menudo, cuando se elimina el solvente desnaturalizante la proteína se vuelve a plegar espontáneamente, se *renaturaliza*, en su conformación original (**Figura 3-6**). Este fenómeno indica que la secuencia de aminoácidos de la cadena contiene toda la información necesaria para especificar la forma tridimensional de las proteínas, lo cual constituye un punto crítico para poder entender la función celular.

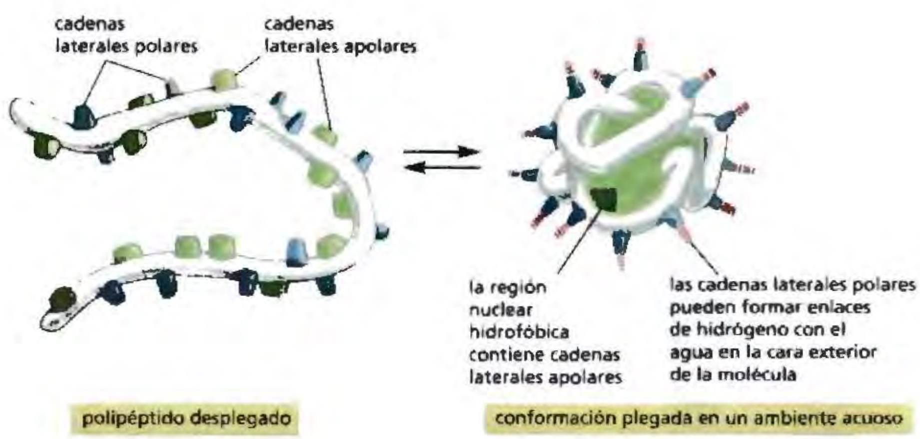


Figura 3-5 Cómo se pliega una proteína y da lugar a una conformación compacta. Las cadenas laterales de los aminoácidos polares tienden a colocarse en la cara exterior de la proteína, donde pueden interactuar con el agua; las cadenas apolares se esconden en el interior de la proteína, formando un núcleo hidrofóbico de átomos altamente empaquetados que se mantienen alejados del agua. En este esquema, la proteína sólo contiene unos 30 aminoácidos.

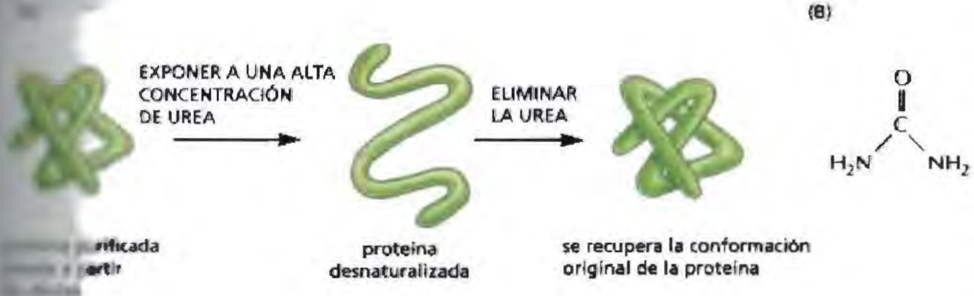


Figura 3–6 **Nuevo plegamiento de una proteína desnaturalizada.** (A) Este experimento, realizado por primera vez hace más de 40 años, demuestra que la conformación de las proteínas está determinada sólo por su secuencia de aminoácidos. (B) Estructura de la urea. La urea es una sustancia muy soluble en agua, y a elevadas concentraciones de aproximadamente una molécula de urea por cada seis moléculas de agua, despliega las proteínas.

…malmente cada proteína se pliega en una sola conformación estable. Sin embargo, …rmación a menudo cambia ligeramente cuando la proteína interactúa con otras … de la célula. Este cambio de forma suele ser crucial para la función de la proteína, …remos más adelante en este capítulo.

…que la cadena proteica puede plegarse en su conformación correcta sin ninguna …terior, en la célula viva normalmente el plegamiento de las proteínas está auxiliado … proteínas especiales llamadas *chaperonas moleculares*. Se trata de proteínas que se … cadenas parcialmente plegadas y les ayudan a plegarse, siguiendo la vía energéti… más favorable para ese plegamiento. En las condiciones de abigarramiento del cito… las chaperonas evitan temporalmente que las zonas hidrofóbicas de las cadenas … recién sintetizadas se asocien unas con otras y formen agregados (véase p. 388). Sin …, la forma tridimensional final de la proteína está especificada por su secuencia de …idos: las chaperonas simplemente hacen que este proceso sea más fiable.

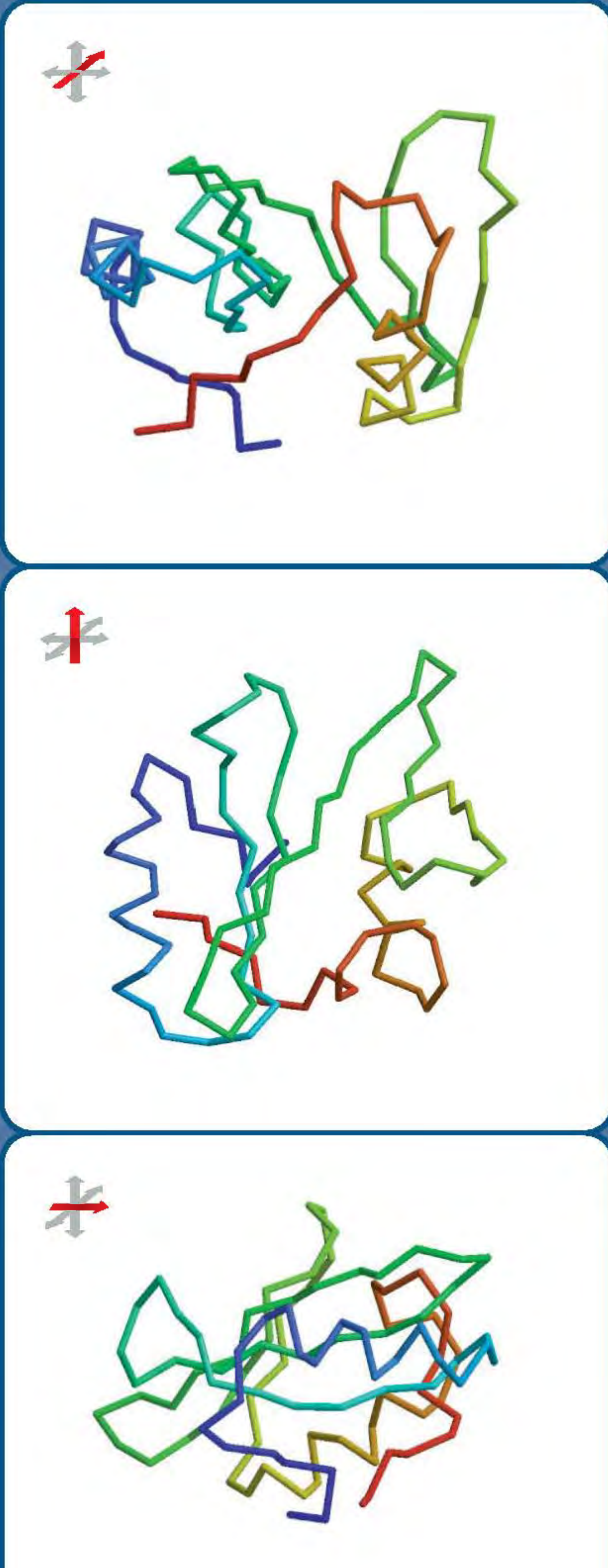
… proteínas presentan una amplia variedad de formas y por lo general tienen entre 50 … aminoácidos. Habitualmente, las proteínas grandes se componen de varios *dominios* … diferentes –unidades estructurales que se pliegan más o menos independiente… unas de otras, como se expone más adelante. La estructura detallada de cualquier … es complicada, por lo que para simplificarla se utilizan diferentes tipos de repre…ones cada uno de los cuales destaca diferentes aspectos de la proteína.

…**Panel** 3–2 (pp. 132–133) presenta cuatro representaciones diferentes del dominio … llamado SH2, que cumple importantes funciones en las células eucariotas. Está …ido por una cadena de 100 aminoácidos, su estructura se presenta como (A) un mo… esqueleto polipeptídico, (B) un modelo de cinta, (C) un modelo de cable que inclu… cadenas laterales de los aminoácidos y (D) un modelo espacial compacto. En cada fila …tra la proteína en una orientación diferente; la imagen está coloreada de manera que … seguir la cadena polipeptídica desde su extremo N-terminal (*púrpura*) a su extremo …nal (*rojo*). <GTGA>

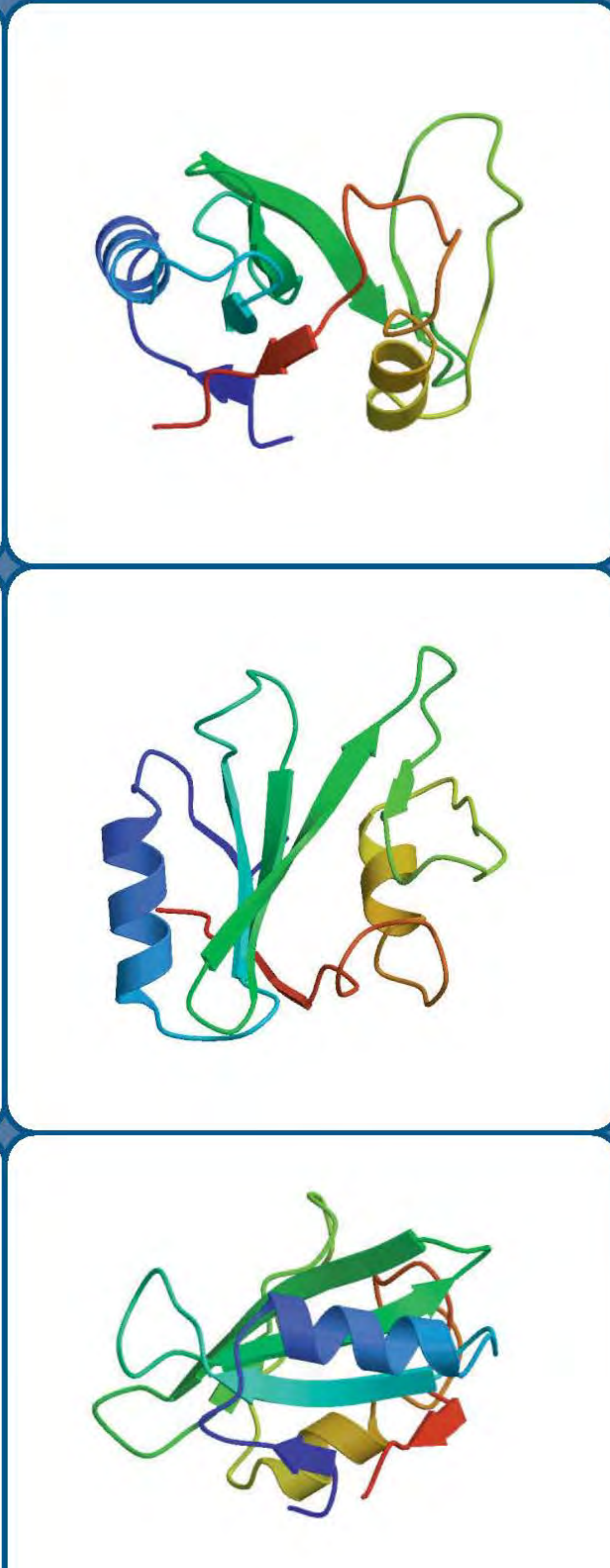
El Panel 3–2 muestra que la conformación de una proteína es sorprendentemente com… incluso para una proteína tan pequeña como el dominio SH2. Pero, como comentare… adelante, la descripción de las estructuras proteicas puede simplificarse ya que … algunos motivos estructurales comunes que subyacen a estas conformaciones.

…lice α y la lámina β son patrones comunes de plegamiento

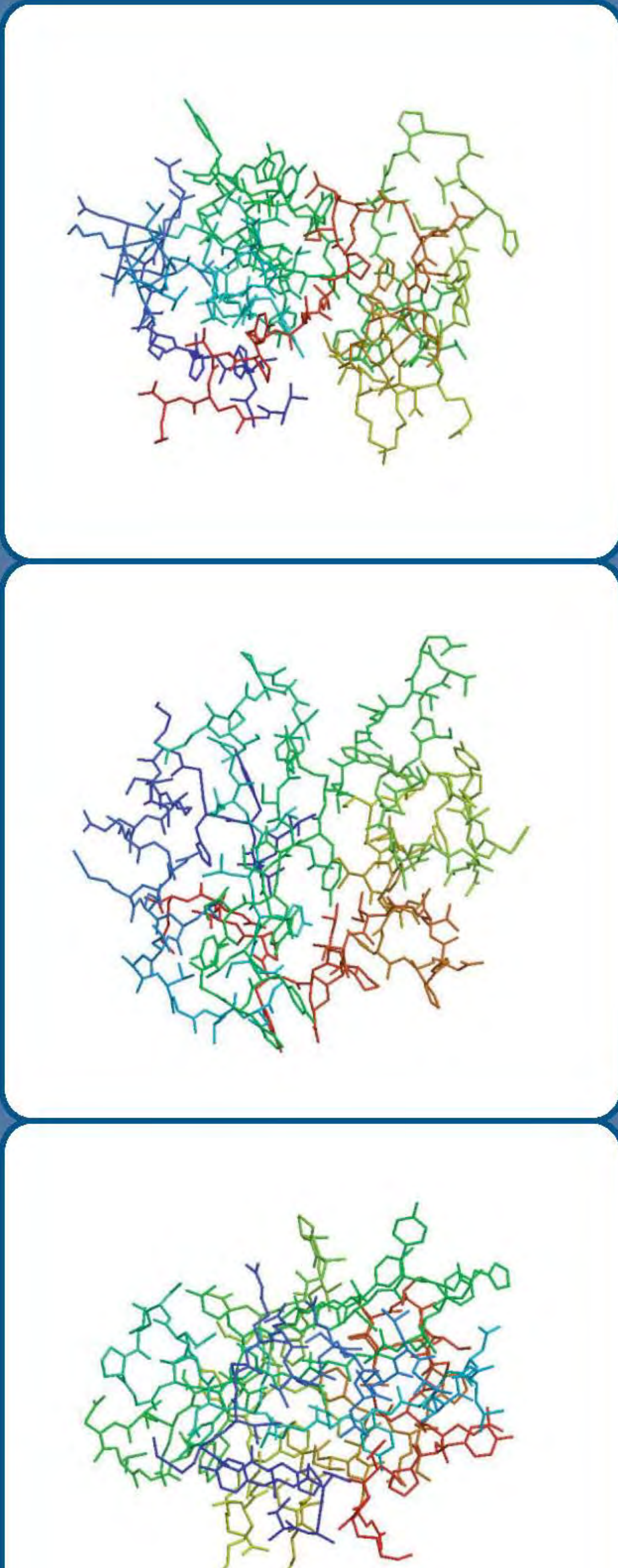
… comparamos las estructuras tridimensionales de muchas moléculas proteicas dife…, se hace evidente que, aunque la conformación global de cada proteína es única, a me… se encuentran dos patrones de plegamiento regulares en algunas zonas de las proteínas. … patrones fueron descubiertos hace más de 50 años, estudiando el pelo y la seda. El pri… patrón de plegamiento descubierto, llamado la **hélice α**, fue hallado en la proteína *α-que…*, que es muy abundante en la piel y sus derivados –como el pelo, las uñas y los cuernos. … después del descubrimiento de la hélice α, se halló una segunda estructura plegada, … lámina β, en la proteína *fibroína*, el principal constituyente de la seda. Estos dos pa… son particularmente comunes porque resultan de la unión de los grupos N–H y C=O … esqueleto polipeptídico mediante enlaces de hidrógeno, sin que intervengan las cadenas … de los aminoácidos. Por lo tanto, muchas secuencias diferentes de aminoácidos pue… formar estas estructuras. En cada caso, la cadena proteica adopta una conformación re… repetitiva. En la **Figura** 3–7 se presentan estas dos conformaciones, así como las …turas que se utilizan para destacarlas en los modelos de cinta de las proteínas.



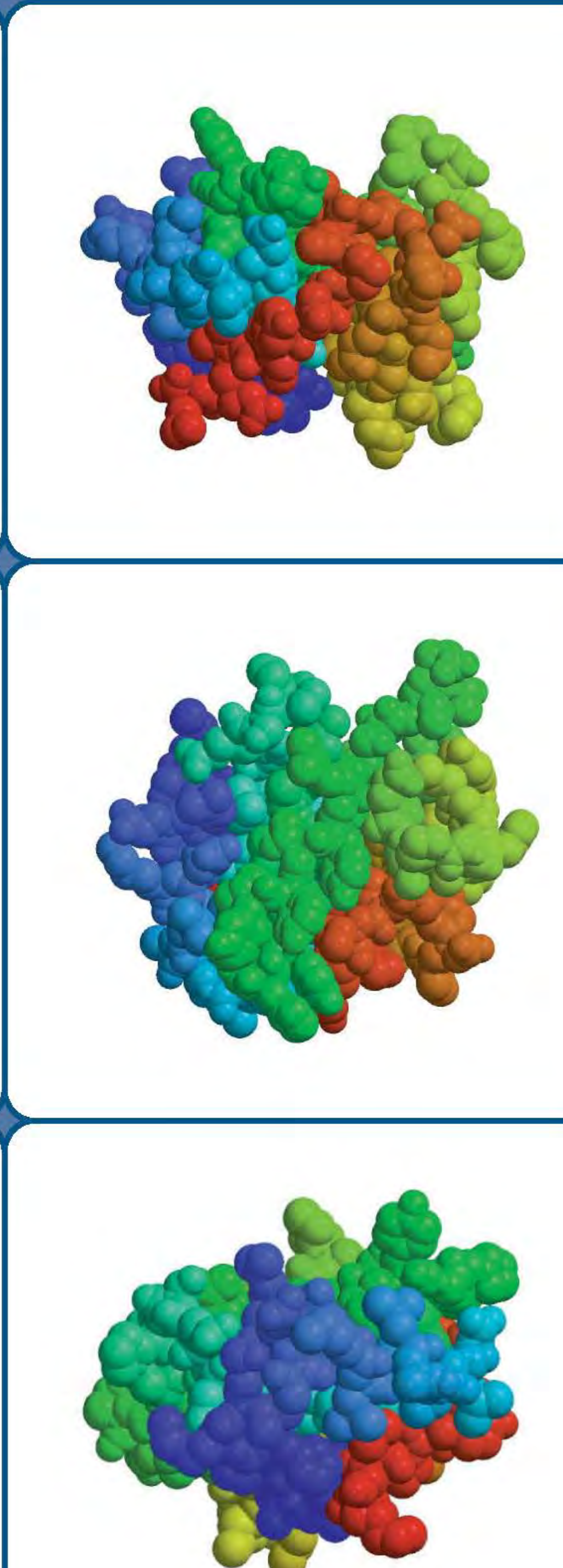
(A) Esqueleto: Representa la organización completa de la cadena polipeptídica; una manera clara para comparar estructuras de proteínas relacionadas.



(B) Cinta: Es una forma sencilla que permite visualizar estructuras secundarias, como hélices α y láminas β.



(C) Cable: Se destacan las cadenas laterales y su proximidad relativa; es útil para predecir qué aminoácido podría estar relacionado con la actividad de la proteína, especialmente si la proteína es una enzima.



(D) Modelo espacial compacto: Proporciona un mapa de la proteína; visualiza su forma y señala qué aminoácidos de las cadenas laterales quedan expuestos. Muestra cómo quedaría expuesta la proteína a una molécula pequeña, como el agua, o a otra proteína.

(Por cortesía de David Lawson.)

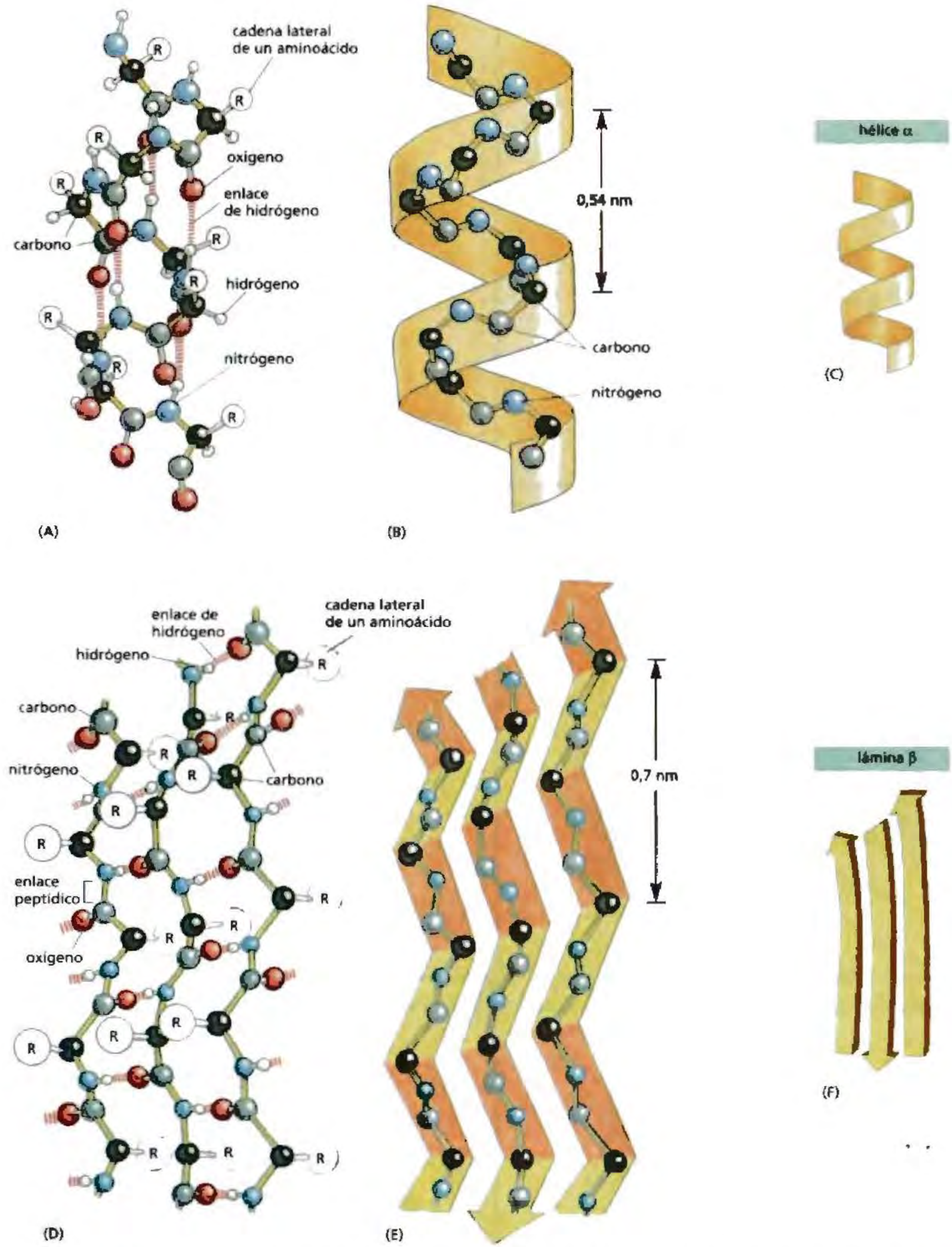


Figura 3–7 La conformación regular del esqueleto polipeptídico que se presenta en la hélice α y en la lámina β. <GTAG> <TGCT> (A, B y C) La hélice α. El N–H de cada enlace peptídico está unido por enlaces de hidrógeno al C=O de un enlace peptídico vecino, situado cuatro enlaces peptídicos más adelante en la misma molécula. Obsérvese en este esquema que todos los grupos N–H quedan en la parte superior y todos los grupos C=O en la parte inferior (hacia el extremo C-terminal); esto proporciona una polaridad a la hélice, con una carga parcialmente negativa en C-terminal y parcialmente positiva en N-terminal. (D, E y F) La lámina β. En este ejemplo, las cadenas peptídicas adyacentes están dispuestas en direcciones opuestas (antiparalelas). Los enlaces de hidrógeno entre los enlaces peptídicos de las diferentes hebras mantienen unidas entre sí las cadenas polipeptídicas (hebras) en una lámina β, mientras que las cadenas laterales de los aminoácidos de cada hebra se proyectan alternativamente por encima y por debajo del plano de la lámina β. En (A) y (D) se muestran todos los átomos del esqueleto polipeptídico, pero las cadenas laterales están truncadas y representadas por una R. Como comparación, en (B) y (E) sólo se muestran los átomos del esqueleto, mientras que en (C) y (F) se esquematizan los símbolos utilizados para la hélice α y la lámina β, mediante las representaciones de cintas de las proteínas (véase el Panel 3-2B).

El núcleo de muchas proteínas contiene extensas regiones de lámina β. Como se mues- a en la **Figura 3–8**, estas láminas β pueden estar formadas tanto por cadenas polipeptídicas cinas dispuestas en la misma dirección (es decir, cadenas paralelas) o por una cadena que pliega una y otra vez sobre sí misma, de modo que cada sección de la cadena se dispone dirección contraria a sus vecinas inmediatas (es decir, cadenas antiparalelas). Ambos ti- os de lámina β proporcionan una estructura muy rígida, que se mantiene unida por los laces de hidrógeno que conectan los enlaces peptídicos de cadenas vecinas (véase la gura 3–7D).

Cuando una cadena polipeptídica se enrolla sobre sí misma formando un cilindro rígi- , se genera una hélice α. Entre cada cuatro enlaces peptídicos se establece un enlace de drógeno, uniendo el C=O de un enlace peptídico con el N–H de otro (véase la Figura 3–7A). o da lugar a una hélice regular con una vuelta completa cada 3,6 aminoácidos. Obsérve- que el dominio proteico que se muestra como ejemplo en el Panel 3–2 contiene dos héli- α y una lámina β formada por tres cadenas antiparalelas.

En las proteínas localizadas en las membranas celulares, como las proteínas transpor- doras y los receptores, son especialmente abundantes las regiones de hélice α. En el Capí- lo 10, veremos que generalmente los segmentos de proteínas transmembrana que aviesan la bicapa lipídica lo hacen en forma de una hélice α compuesta mayoritariamen- por aminoácidos de cadenas laterales apolares. En la hélice α, el esqueleto polipeptídico, e es hidrofílico, está unido a sí mismo mediante enlaces de hidrógeno y se separa del en- no lipídico hidrofóbico de la membrana mediante sus protuberantes cadenas laterales olares (véase la Figura 3–7B).

En otras proteínas, las hélices α se enrollan una sobre la otra formando una estructura rticularmente estable, conocida como una **superhélice** o **hélice sobreenrollada** (en in- s, *coiled-coil*). Esta estructura se forma cuando dos (o en algunos casos, tres) hélices α tie- n la mayor parte de sus cadenas laterales apolares (hidrófobas) hacia un lado, de manera e pueden enrollarse una en torno a la otra colocando estas cadenas laterales hacia el inte- r (**Figura 3–9**). El armazón estructural de muchas proteínas alargadas está formado por as superhélices fibrosas. Ejemplos de estas proteínas son la α-queratina, que forma las fi- s intracelulares que refuerzan la capa exterior de la piel y sus apéndices, y las moléculas miosina responsables de la contracción muscular.

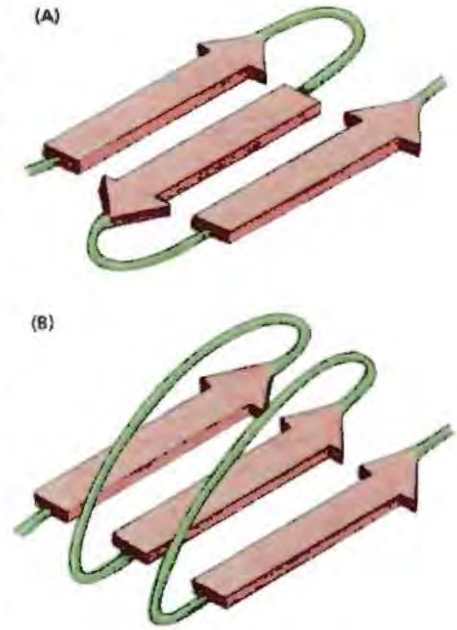


Figura 3–8 Dos tipos de estructura en lámina β. (A) Una lámina β antiparalela (véase Figura 3-7D). (B) Una lámina β paralela. Ambas estructuras son habituales en las proteínas.

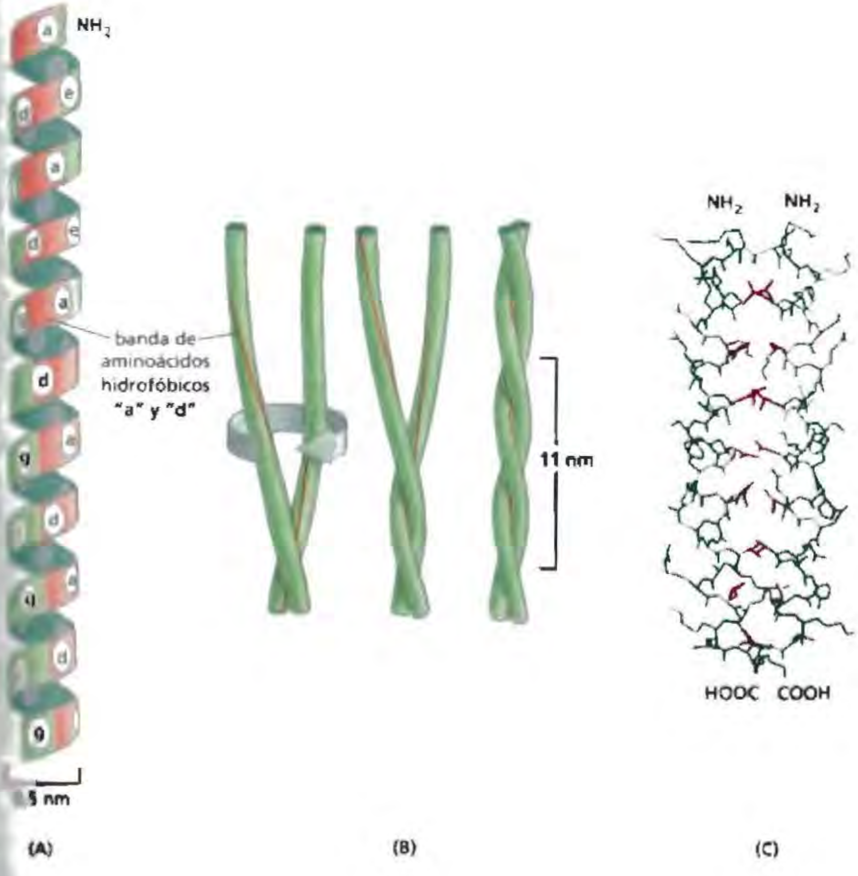


Figura 3–9 Estructura de una hélice sobreenrollada. <CGGA> En (A) se presenta una hélice α sencilla, con las cadenas laterales de los aminoácidos sucesivos señaladas siguiendo la secuencia de siete elementos "abcdefg" *(de abajo a arriba)*. En esta secuencia, los aminoácidos "a" y "d" coinciden sobre la superficie del cilindro formando una "banda" (en *rojo*) que gira lentamente alrededor de la hélice α. Típicamente, las proteínas que forman hélices sobreenrolladas tienen aminoácidos hidrofóbicos en las posiciones "a" y "d". Por lo tanto, como se muestra en (B), las dos hélices α pueden enroscarse una sobre la otra de forma que las cadenas laterales hidrofóbicas de una hélice α interaccionen con las cadenas laterales hidrofóbicas de la otra, mientras que las otras cadenas laterales, más hidrofílicas, quedan expuestas libremente al entorno acuoso. (C) La estructura atómica de una hélice sobreenrollada, determinada por cristalografía de rayos X. Las cadenas laterales en *rojo* son apolares.

Los dominios proteicos son unidades modulares a partir de los que se construyen las proteínas grandes

Incluso las moléculas proteicas más pequeñas están formadas por miles de átomos unidos entre sí por enlaces covalentes y no-covalentes orientados de una manera precisa, por lo que es extremadamente difícil visualizar estas complicadas estructuras sin una representación tridimensional. Por esta razón, los biólogos utilizan diversas herramientas gráficas e informáticas. El DVD que acompaña este libro contiene imágenes generadas por ordenador, en diferentes formatos, de proteínas seleccionadas, que pueden verse y rotarse en pantalla.

Los biólogos distinguen cuatro niveles de organización en la estructura de una proteína. La secuencia de aminoácidos es la **estructura primaria**. Los segmentos de una cadena polipeptídica que forman hélices α o láminas β constituyen la **estructura secundaria**. La conformación tridimensional que forma la cadena polipeptídica, se denomina habitualmente la **estructura terciaria**, y si una molécula proteica particular está constituida por un complejo de más de una cadena polipeptídica, la estructura completa se designa como **estructura cuaternaria**.

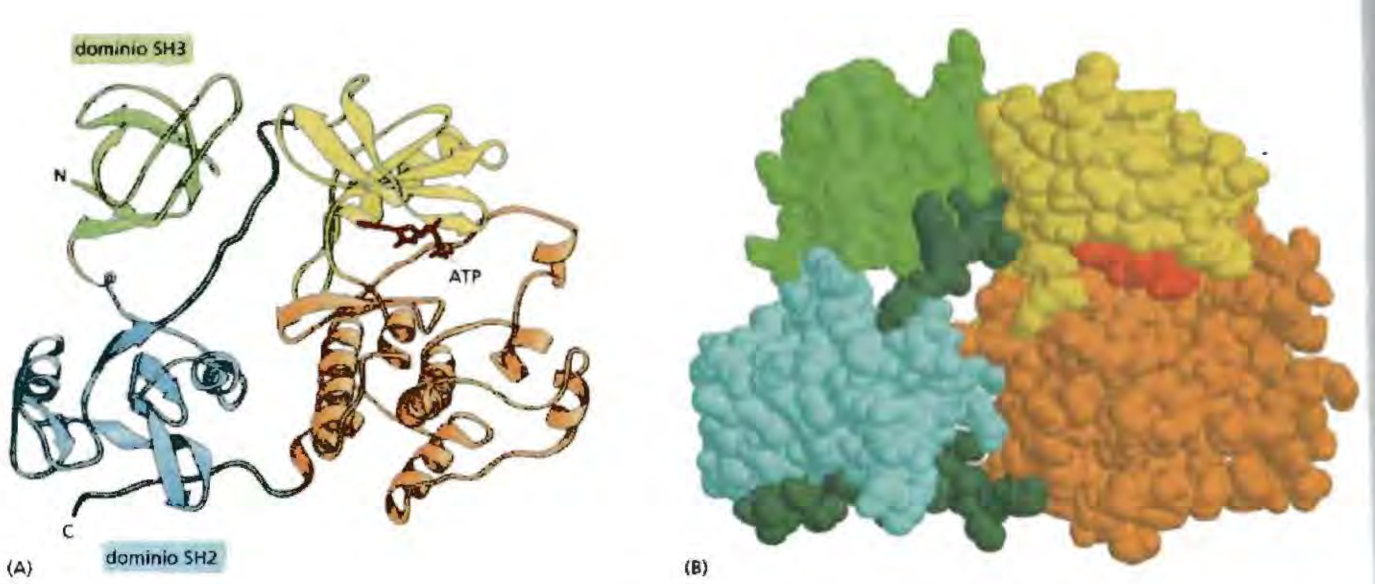
Estudios sobre la conformación, la función y la evolución de las proteínas también han revelado la importancia de un nivel de organización distinto de estos cuatro. Se trata del **dominio proteico**, que está formado por cualquier parte de la cadena polipeptídica que pueda plegarse independientemente del resto, dando lugar a una estructura compacta y estable. Un dominio generalmente contiene de 40 a 350 aminoácidos y es la unidad modular a partir de la cual se construyen muchas de las proteínas mayores.

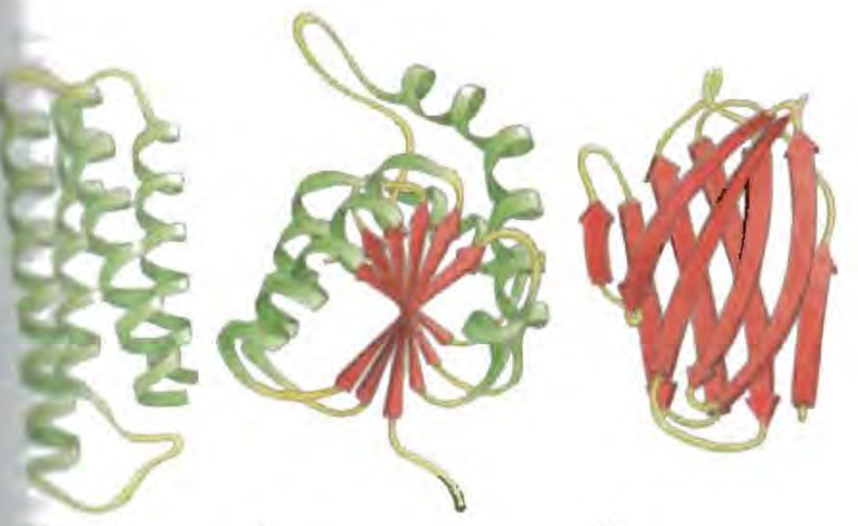
A menudo, los diferentes dominios de una proteína están asociados con las diferentes funciones de esta proteína. En la **Figura 3–10** se muestra un ejemplo, la proteína quinasa Src, que actúa en vías de señalización en el interior de las células de los vertebrados (Src se pronuncia "sarc"). Se considera que esta proteína tiene tres dominios: los dominios SH2 y SH3 tienen una función reguladora, mientras que el dominio C-terminal es responsable de la actividad catalítica quinasa. Más adelante, en este capítulo, volveremos sobre esta proteína para explicar cómo las proteínas pueden formar interruptores moleculares que transmiten la información a través de las células.

En la **Figura 3–11** se presentan modelos de cinta de tres dominios proteicos organizados de diferentes formas. Como ilustran estos ejemplos, la cadena polipeptídica tiende a cruzar todo el dominio antes de dar una vuelta cerrada sobre la superficie. El núcleo central de un dominio puede estar formado por hélices α, láminas β o diferentes combinaciones de estos dos elementos fundamentales del plegamiento. <CAGT>

Las proteínas más pequeñas contienen un solo dominio, mientras que las mayores pueden llegar a contener hasta varias docenas de dominios, que habitualmente están conectados entre sí mediante segmentos cortos de cadena polipeptídica relativamente desestructurados.

Figura 3–10 Proteína formada por múltiples dominios. En la proteína Src mostrada, el dominio C-terminal con dos lóbulos *(amarillo y naranja)* forma una enzima proteína quinasa, mientras que los dominios SH2 y SH3 desempeñan funciones reguladoras. (A) Modelo en cinta, con el sustrato ATP en *rojo*. (B) Modelo espacial compacto, con el sustrato ATP en *rojo*. Obsérvese que el lugar de unión al ATP se sitúa en la interfase de los dos lóbulos que forman la quinasa. La estructura detallada del dominio SH2 se ilustra en el Panel 3-2 (pp. 132-133).





(A) (B) (C)

Figura 3-11 Modelos de cinta de tres dominios proteicos diferentes. (A) Citocromo b_{562}, una proteína de un solo dominio implicada en el transporte electrónico en la mitocondria. Esta proteína está compuesta casi exclusivamente de hélices α. (B) Dominio de unión al NAD^+ de la enzima lactato deshidrogenasa, compuesta por una mezcla de hélices α y láminas β paralelas. (C) Dominio variable de la cadena ligera de una clase de inmunoglobulina (anticuerpo), compuesta por un sándwich de dos láminas, antiparalelas. En estos ejemplos, las hélices α se muestran en *verde*, mientras que las hebras organizadas en láminas β, se representan por *flechas rojas*.

Obsérvese que generalmente la cadena polipeptídica atraviesa de lado a lado el dominio proteico varias veces, haciendo giros bruscos sólo en la superficie de la proteína. A menudo, las regiones curvadas protuberantes (*amarillo*) constituyen los lugares de unión para otras moléculas. (Dibujos cortesía de Jane Richardson.)

De entre la gran cantidad de cadenas polipeptídicas posibles, sólo unas cuantas son útiles para las células

Los 20 aminoácidos son químicamente distintos y, en principio, cualquiera de ellos puede ubicarse en cualquier posición de una cadena proteica, por lo que hay 20 × 20 × 20 × 20 = 160.000 posibles cadenas polipeptídicas diferentes de cuatro aminoácidos de longitud, o 20^n cadenas polipeptídicas diferentes posibles de una longitud de *n* aminoácidos. Para el caso de una proteína típica de 300 aminoácidos de longitud, una célula teóricamente podría fabricar más de 10^{390} (20^{300}) cadenas polipeptídicas diferentes. Este es un número tan enorme, que para poder producir una sola molécula de cada tipo se requerirían muchos más átomos de los que existen en el universo.

Sólo una pequeña fracción de este casi inimaginable número de cadenas polipeptídicas posibles adoptaría una conformación tridimensional estable –según algunas estimaciones, menos de una entre un billón. La inmensa mayoría de las proteínas presentes en las células adoptan conformaciones únicas y estables. ¿Cómo es esto posible? La respuesta es que una proteína con muchas conformaciones diferentes y propiedades variables no resultaría biológicamente útil. Por lo tanto, tales proteínas habrían sido eliminadas por la selección natural en el curso del largo proceso de ensayo y error que subyace bajo la evolución celular.

El mecanismo de la evolución ha seleccionado funciones proteicas de los organismos vivos, por lo que la secuencia de aminoácidos de la mayoría de las proteínas actuales es tal que favorece una sola conformación extremadamente estable. Además, esta conformación tiene las propiedades químicas exactas que capacitan a la proteína para realizar una función catalítica o estructural particular en la célula. Las proteínas están construidas de manera tan precisa que a veces el cambio de tan sólo unos cuantos átomos de un aminoácido puede desorganizar la estructura de la proteína causándole una pérdida de función irreparable.

Las proteínas pueden clasificarse en muchas familias

Cuando una proteína evolucionó de manera que pudo plegarse adoptando una conformación estable con propiedades útiles, su estructura se modificó ligeramente durante la evolución posterior, permitiéndole asumir nuevas funciones. Este proceso se ha acelerado en gran medida por los mecanismos genéticos que ocasionalmente han duplicado genes, permitiendo a una copia evolucionar independientemente y generar una nueva función (como se describe en el Capítulo 4). Sabemos que esto ha ocurrido muy a menudo, porque muchas de las proteínas actuales pueden agruparse en familias proteicas, en las que cada uno de los miembros de la familia tiene una secuencia de aminoácidos y una conformación tridimensional muy semejante a las de los otros miembros de la familia.

Consideremos, por ejemplo, las *serinas proteasa*, una familia de enzimas degradadoras de proteínas (enzimas proteolíticas) que incluye las enzimas digestivas quimotripsina, tripsina y elastasa, y algunas de las proteasas implicadas en la coagulación de la sangre. Cuando

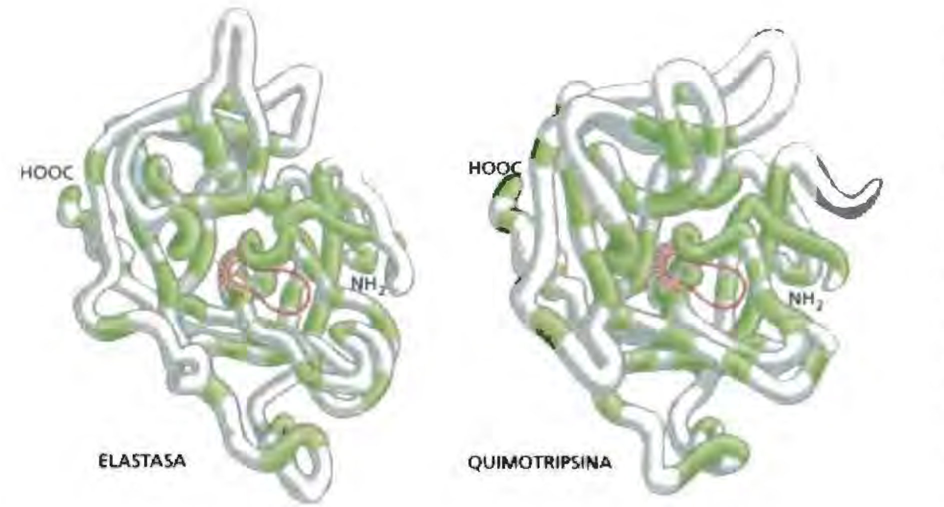


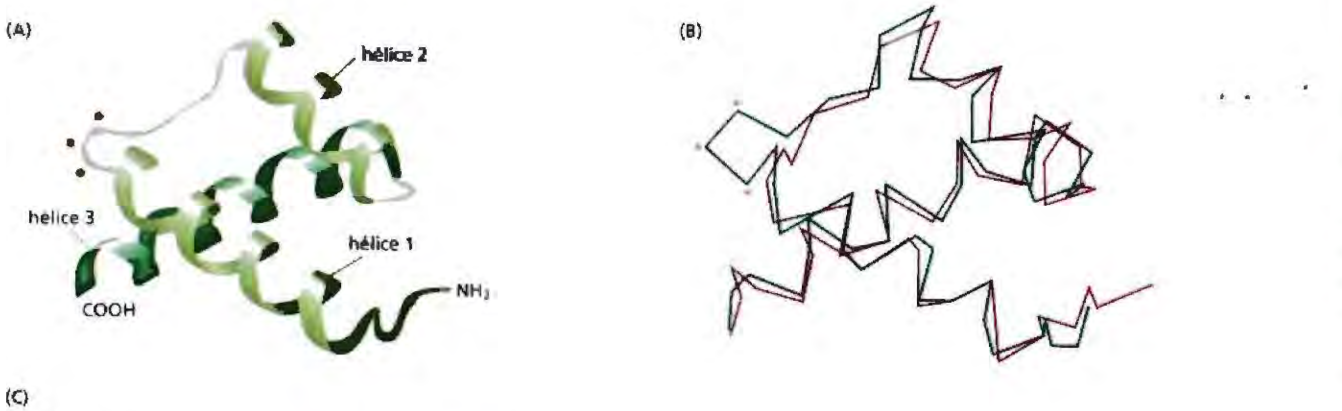
Figura 3–12 Comparación entre las conformaciones de dos serinas proteasa. Conformaciones del esqueleto de la elastasa y de la quimotripsina. Sólo los aminoácidos sombreados en *verde* de la cadena polipeptídica son los mismos en las dos proteínas, pero las dos conformaciones son muy similares entre sí en cualquier región de la proteína. El lugar activo de cada enzima está marcado en *rojo*; en este lugar es donde se produce la unión y la rotura por hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas que actúan como sustrato. El nombre de las serinas proteasa deriva del aminoácido serina, cuya cadena lateral es parte del centro activo de cada enzima y participa directamente en la reacción de rotura.

se comparan las porciones proteasa de dos cualesquiera de estas enzimas, se observa que algunas regiones de sus secuencias de aminoácidos son prácticamente iguales. La similitud de sus conformaciones tridimensionales es incluso más sorprendente: la mayoría de los plegamientos y giros detallados en sus cadenas polipeptídicas, formadas por varios cientos de aminoácidos, son casi idénticos (**Figura 3–12**). No obstante, las diferentes serinas proteasa tienen distintas actividades enzimáticas, ya que cada una de ellas rompe diferentes proteínas o los enlaces peptídicos entre diferentes tipos de aminoácidos. De esta manera, cada una realiza una función distinta en el organismo.

El caso de las serinas proteasa se repite en centenares de otros casos de familias proteicas. En general, la estructura de los diferentes miembros de una familia proteica se ha conservado en las secuencias de sus aminoácidos. En muchos casos, las secuencias de aminoácidos han divergido tanto que no podemos estar seguros de la relación familiar que existe entre dos proteínas sin determinar sus estructuras tridimensionales. Por ejemplo, las proteínas α2 de levadura y la proteína angrelada de *Drosophila* son dos proteínas reguladoras de genes que pertenecen a la familia homeodominio (se expone en el Capítulo 7). Como que sólo son iguales en 17 de sus 60 residuos de aminoácidos, la relación que existe entre ambas únicamente se pone de manifiesto cuando se comparan sus estructuras tridimensionales (**Figura 3–13**). Muchos ejemplos similares muestran que dos proteínas que tengan más del 25% de similitud en sus secuencias de aminoácidos, generalmente comparten la misma estructura global.

A menudo, los diferentes miembros de una gran familia de proteínas tienen funciones bastante diferentes. Sin duda, algunos de los cambios de aminoácidos que diferencian estas enzimas fueron seleccionados en el transcurso de la evolución porque daban lugar a cambios en la actividad biológica, confiriendo a los distintos miembros de la familia las diversas

Figura 3–13 Comparación de una clase de dominios de unión al DNA, llamados homeodominios, de dos organismos separados por más de mil millones de años de evolución. (A) Modelo en cinta de la estructura común entre ambas proteínas. (B) Localización de las posiciones de los carbonos α. Las estructuras tridimensionales mostradas se determinaron mediante cristalografía de rayos X de la proteína α2 de la levadura (*verde*) y de la proteína angrelada de *Drosophila* (*rojo*). (C) Comparación de las secuencias de aminoácidos de la región de las proteínas mostradas en (A) y (B). Los *puntos negros* señalan los lugares con el mismo aminoácido. Los *puntos naranja* señalan la posición de un inserto de tres aminoácidos de la proteína α2. (Adaptado de C. Wolberger et al., *Cell* 67:517-528, 1991. Con la autorización de Elsevier.)



(C)

levadura
H_2N G H R F T K E N V R I L E S W F A K N I E N P Y L D T K G L E N L M K N T S L S R I Q I K N W V S N R R R K E K T I COOH
R T A F S S E Q L A R L K R E F N E N - - - R Y L T E R R R Q Q L S S E L G L N E A Q I K I W F Q N K R A K I K K S
Drosophila

ciones que presentan en la actualidad. Otros cambios de aminoácidos parecen ser "neu-", es decir, no tienen efectos ni beneficiosos ni perjudiciales para la estructura y la fun- n básicas de una proteína. Puesto que la mutación es un proceso aleatorio, también ieron producirse muchos cambios deletéreos que alteraron la estructura tridimensional estas proteínas lo suficiente como para que resultaran inactivas. Estas proteínas inactivas ieron perderse en cuanto cada uno de los organismos que las producían se encontró en a situación de desventaja y fueron eliminados por la selección natural.

Cuando el genoma de cualquier organismo es secuenciado es posible reconocer las fa- as proteicas; por ejemplo, la determinación de la secuencia completa del DNA de todo el oma humano, ha revelado que tenemos unos 24.000 genes que codifican proteínas. Me- nte comparación de secuencias, podemos asignar los productos de aproximadamente 40% de estos genes a estructuras proteicas conocidas que pertenecen a más de 500 fami- proteicas diferentes. La mayoría de las proteínas de cada familia han evolucionado en el tido de producir funciones diferentes, como en el caso de las enzimas elastasa y quimo- ina ilustrados previamente en la Figura 3–12. A veces se dice que estas proteínas son *pa- gas*, para diferenciarlas de las correspondientes proteínas de diferentes organismos nominadas *ortólogas*, como es el caso de la elastasa de ratón y humana).

Como se describe en el Capítulo 8, gracias a las poderosas técnicas de cristalografía de s X y de resonancia magnética nuclear (NMR: ***nuclear magnetic resonance***), ahora cono- os las formas tridimensionales o conformaciones de más de 20.000 proteínas. <GGCC>. nparando detalladamente las conformaciones de estas proteínas, los biólogos estructu- es (esto es, los expertos en la estructura de las moléculas biológicas) han concluido que ste un número limitado de maneras en las que se pliegan los dominios proteicos –quizás o unas 2000. Hasta el momento se ha determinado la estructura de unos 800 de estos ple- ntos proteicos. Estos plegamientos conocidos tienden a ser los más representados en niverso de las estructuras proteicas: por ejemplo, 50 plegamientos constituyen cerca de tres cuartas partes de las familias de dominios con estructuras predichas. Parece, pues, e podría estar a nuestro alcance un catálogo completo de los plegamientos proteicos más nificativos que existen en los seres vivos.

a búsqueda de secuencias puede identificar parentescos

base actual de datos de secuencias conocidas de proteínas contiene más de diez millones entradas; este número crece rápidamente a medida que se van secuenciando más y más omas –revelando números enormes de nuevos genes que codifican proteínas. Los pode- os programas de búsqueda disponibles de ordenador permiten comparar cada nueva teína descubierta con la base de datos completa y buscar posibles parentescos. Median- el descubrimiento de similitudes estadísticamente significativas en las secuencias de ami- ácidos se pueden identificar muchas proteínas cuyos genes evolucionaron a partir de un n ancestral común.

Con este gran número de proteínas en la base de datos, los programas de búsqueda en- ntran muchas similitudes no-significativas, lo cual produce un elevado nivel de ruido de ido que hace muy difícil discernir los parentescos más cercanos. En términos generales, necesita una identidad del 30% en la secuencia de dos proteínas para considerar que he- s encontrado una similitud. Sin embargo, conocemos la función de muchas pequeñas uencias "firma" (como huellas dactilares), que son utilizadas ampliamente para encon- r relaciones más distantes (**Figura 3–14**).

Las comparaciones entre proteínas son importantes debido a que normalmente una re- ión estructural supone una relación funcional. Así, el descubrir una homología entre la uencia de aminoácidos de una proteína nueva y la de una proteína de función conocida, ede suponer el ahorro de muchos años de investigación. Por ejemplo, tales similitudes tre secuencias inicialmente indicaron que ciertos genes que inducen la transformación células de mamífero en células cancerosas son proteínas quinasa. Del mismo modo, mu-

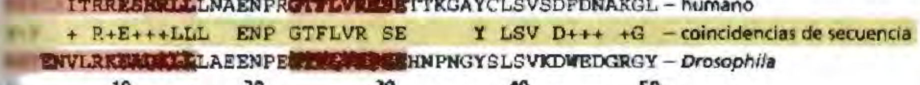


Figura 3–14 Utilización de cortas secuencias de identidad para encontrar dominios proteicos relacionados. Las dos secuencias cortas de 15 y 9 aminoácidos mostradas (*verde*) pueden utilizarse para buscar en grandes bases de datos un dominio proteico que se encuentra en muchas proteínas: el dominio SH2. Aquí se comparan los primeros 50 aminoácidos del dominio SH2, de 100 aminoácidos, para la proteína Src humana y de *Drosophila* (véase Figura 3-10). En la comparación generada por ordenador de las secuencias (*amarillo*), las coincidencias exactas entre la proteína humana y la de *Drosophila* se señalan con la abreviación de una sola letra correspondiente al aminoácido; las posiciones con un aminoácido similar pero no idéntico se señalan con el símbolo + y las posiciones no coincidentes están en blanco. En este esquema, los lugares en los que una o ambas proteínas contienen una coincidencia exacta, con una posición de las secuencias en *verde*, se destacan en *rojo*.

chas de las proteínas que controlan el patrón de formación, durante el desarrollo embrionario, de la mosca del vinagre *Drosophila*, fueron rápidamente identificadas como proteínas reguladoras de genes.

Algunos dominios proteicos forman parte de muchas proteínas diferentes

Como ya se indicó, la mayoría de proteínas se componen de una serie de dominios, en los cuales diferentes regiones de la cadena polipeptídica se han plegado independientemente formando estructuras compactas. Parece que estas proteínas con múltiples dominios se originaron por la unión accidental de las secuencias de DNA que codifican cada dominio, generando un nuevo gen. A menudo, se han generado nuevas superficies de unión mediante la yuxtaposición de dominios y muchos de los lugares funcionales en los que las proteínas se unen a pequeñas moléculas pertenecen a este tipo. En un proceso denominado *barajado de dominios*, las proteínas grandes han evolucionado a través de la unión de dominios preexistentes generando nuevas combinaciones de ellos (**Figura 3–15**).

Un subconjunto de dominios proteicos ha sido especialmente móvil durante la evolución: parece que contienen estructuras especialmente versátiles, y habitualmente se denominan *módulos proteicos*. La estructura de uno de estos módulos, el dominio SH2, se ilustra en el Panel 3–2 (pp. 132-133). En la **Figura 3–16** se presentan algunos otros dominios proteicos abundantes.

Cada uno de los dominios que mostramos tiene un núcleo con una estructura estable formado por hebras de láminas β, del que salen asas de cadenas polipeptídicas menos ordenadas (mostradas en *verde*). Idealmente las asas forman lugares de unión para otras moléculas, como se ha demostrado para el plegado de las inmunoglobulinas; este fenómeno se detectó primero en las moléculas de anticuerpo (véase la Figura 3–41). Lo más probable es que el éxito evolutivo de estos módulos basados en láminas β, se debiera a que proporcionaron unidades adecuadas para la generación de nuevos lugares de unión para sus ligandos, a través de variaciones en estas asas que sobresalen.

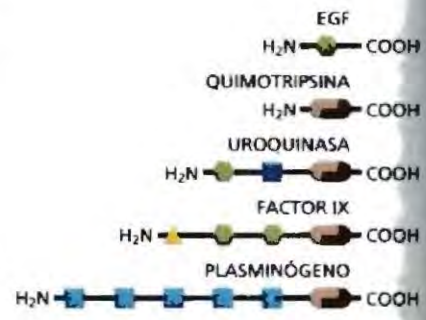


Figura 3–15 Barajado de dominios. Durante la evolución de las proteínas, se produjo un extenso barajado de bloques de secuencias de proteína (dominios proteicos). En esta figura, las zonas señaladas con marcas de la misma forma y color están relacionadas evolutivamente entre sí. Las serinas proteasa semejantes a quimotripsina están formadas por dos dominios (*marrón*). En las otras tres proteasas mostradas, que están fuertemente reguladas y más especializadas, estos dos dominios proteasa se conectan a uno o más dominios similares a dominios encontrados en el factor de crecimiento epidérmico (EGF; *verde*), a la proteína que une calcio (*amarillo*) o al dominio "kringle" (*azul*) que contienen tres enlaces disulfuro internos. La quimotripsina se ilustra en la Figura 3-12.

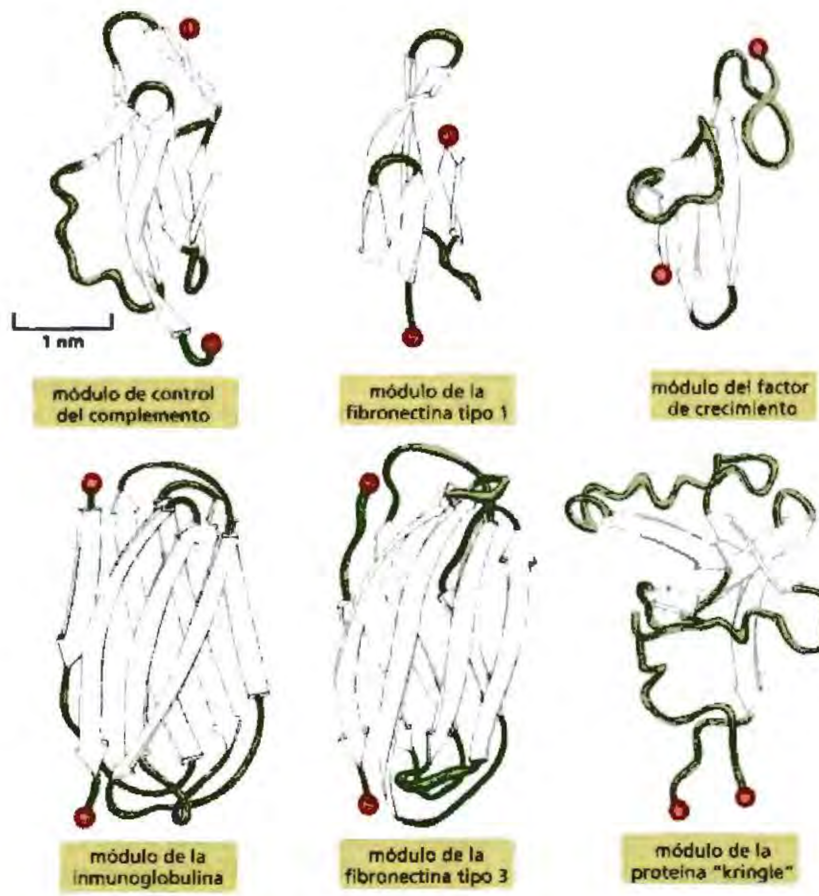


Figura 3–16 Estructuras tridimensionales de algunos módulos proteicos. En los esquemas en cinta, las cadenas de lámina β se muestran como *flechas*, y tanto los extremos C- como los N-terminales se indican como *esferas rojas*. (Adaptado de M. Baron, D.G. Norman e I.D. Campbell, *Trends Biochem. Sci.* 16:13-17, 1991, con la autorización de Elsevier, y D.J. Leahy et al., *Science* 258:987-991, 1992, con la autorización de AAAS.)

característica de estos dominios proteicos que explica su utilidad es la fa-
que pueden ser integrados en otras proteínas. Cinco de los seis dominios que
la Figura 3–16 tienen sus extremos N- y C-terminales en polos opuestos del
ando un DNA que codifica un dominio de este tipo se duplica en tándem, lo
al en la evolución de los genes (como se explica en el Capítulo 4), los módulos
on estas distribuciones "en línea" pueden unirse en serie formando largas es-
nto consigo mismos como con otros dominios en línea (**Figura 3–17**). Habi-
encuentran estructuras rígidas y largas compuestas por series de dominios,
léculas de la matriz extracelular como en regiones de proteínas receptoras
superficie celular. Otros dominios, como el SH2 y el "kringle" que se muestra
-16, son del tipo "enchufe", en los cuales sus extremos N y C se encuentran jun-
tribuciones genómicas, estos módulos normalmente se acomodan con facili-
de inserción en una región lazo de una segunda proteína.

paración de las frecuencias relativas de la utilización de dominios en diferentes
vela que, para el caso de muchos dominios habituales como son los de proteínas
frecuencia es similar en organismos tan diversos como las levaduras, los gusa-
s y los humanos (**Figura 3–18**). Sin embargo existen algunas notables ex-
omo el dominio de reconocimiento de antígeno de complejo mayor de
ibilidad (MHC: ***major histocompatibility complex***; véase Figura 25–52) que en
presenta en 57 copias y que es ausente en los otros cuatro tipos de organismos
de mencionar. Probablemente estos dominios tienen funciones especializa-
artidas con los otros eucariotas, por lo que han sido fuertemente seleccionados
olución hasta producir el elevado número de copias observado. De forma simi-
asumir que un dominio parecido a SH2 que muestra un número muy elevado
iotas superiores, es especialmente útil para la pluricelularidad (compárense los
pluricelulares con las levaduras en la Figura 3–18).

parejas de dominios se encuentran juntos has proteínas

struir una gran tabla que muestre la utilización de dominios de los organismos
conocemos. Por ejemplo, se ha estimado que el genoma humano contiene
ninios de inmonoglobulinas, 500 dominios de proteínas quinasa, 250 homeo-
unión al DNA, 300 dominios SH3 y 120 dominios SH2. Comparando las fre-
tribuciones de dominios en los genomas de más de 100 eucariotas, bacterias y
han sido secuenciados completamente, se obtiene una importante informa-
al. Por ejemplo, encontramos que más de dos terceras partes de las proteínas
dos o más dominios, y que en muchas proteínas se presentan las mismas parejas
y distribuidos de la misma forma relativa. A pesar de que la mitad de todas las



Figura 3–17 Larga estructura formada a partir de series de módulos en línea. Se muestran cuatro módulos de fibronectina tipo 3 (véase Figura 3-16) de la molécula de fibronectina que se encuentra en la matriz extracelular, como modelo en cinta (A) y como modelo espacial compacto (B). (Adaptado de D.J. Leahy, I. Aukhil y H.P. Erickson, *Cell* 84:155-164, 1996. Con la autorización de Elsevier.)

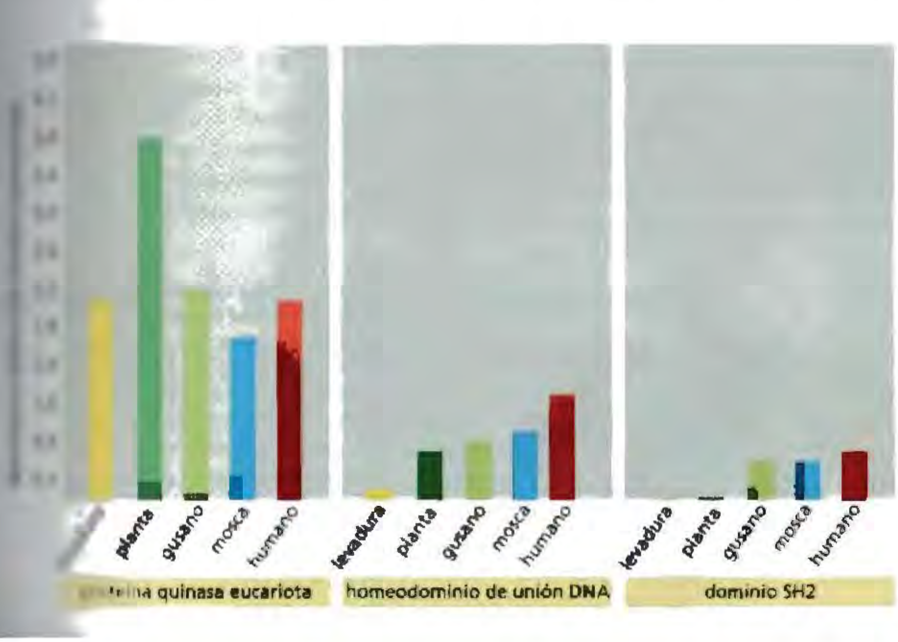


Figura 3–18 Frecuencias relativas de tres dominios proteicos en cinco organismos eucariotas. Los porcentajes aproximados se han calculado dividiendo el número de copias de cada dominio por el número total de proteínas distintas que puede codificar cada organismo, determinadas por la secuencia del genoma. Así, la frecuencia relativa para el dominio SH2 en humanos es 120/24.000 = 0,005.

familias de dominios son comunes a arqueas, bacterias y eucariotas, sólo el 5 por ciento de combinaciones de dos dominios tienen una distribución similar. Este patrón sugiere que la mayoría de las proteínas que contienen combinaciones especialmente útiles de dos dominios, aparecieron relativamente tarde en la evolución.

Las 200 combinaciones más abundantes de dos dominios se presentan en aproximadamente una cuarta parte de todas las proteínas con dominios reconocibles en el conjunto completo de datos. Por lo tanto, resultaría muy útil determinar la estructura tridimensional precisa, al menos en una proteína, de cada una de las combinaciones habituales de dos dominios, ya que revelaría de qué forma interactúan los dominios en este tipo de estructuras proteicas.

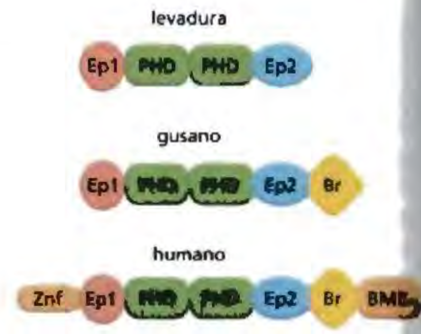


Figura 3–19 Estructura de dominio en grupos de proteínas relacionadas evolutivamente, que tienen una función similar. En general, las proteínas de la mayoría de los organismos complejos, como los humanos, tienen tendencia a tener dominios adicionales –como es el caso de las proteínas que unen DNA que se comparan.

El genoma humano codifica un complejo conjunto de proteínas, muchas de las cuales siguen siendo desconocidas

El resultado de la secuenciación del genoma humano ha sido sorprendente, porque revela que nuestros cromosomas sólo contienen unos 25.000 genes. Sobre la base del número de genes, parecería que no somos más complejos que la pequeña planta de la mostaza, *Arabidopsis*, y únicamente 1,3 veces más complejos que un gusano nematodo. Las secuencias genómicas también revelan que casi todos los dominios proteicos de los vertebrados proceden de los invertebrados –sólo un 7% de los dominios humanos identificados pertenecen específicamente a los vertebrados.

Sin embargo, por regla general, cada una de nuestras proteínas es más compleja (**Figura 3–19**). El barajado de dominios ocurrido durante la evolución de los vertebrados impulsó muchas combinaciones nuevas de dominios proteicos, dando como resultado que en las proteínas humanas hay cerca de dos veces más combinaciones de dominios que en un gusano o una mosca. Así por ejemplo, en las proteínas humanas el dominio serina proteasa parecido a tripsina se encuentra unido, al menos, a 18 dominios de otro tipo, mientras que en el gusano sólo está unido covalentemente a 5 dominios diferentes. Esta variedad extra en nuestras proteínas incrementa enormemente el rango de interacciones posibles proteína-proteína (véase Figura 3–82), pero se desconoce como contribuyen a hacer de nosotros seres humanos.

La complejidad de los seres vivos es asombrosa; es bastante sensato reconocer que en la actualidad carecemos de la más mínima indicación sobre la función que deben tener más de 10.000 de las proteínas identificadas hasta ahora en el genoma humano. La siguiente generación de biólogos celulares tiene ante sí enormes retos que afrontar y fascinantes misterios por resolver.

Es frecuente que cada una de las moléculas proteicas de mayor tamaño contenga más de una cadena polipeptídica <GCCT>

Los mismos enlaces débiles no-covalentes que permiten que una cadena proteica se pliegue en una conformación específica, también permiten que en la célula las proteínas se unan unas a otras y generen estructuras mayores. La región de la superficie de una proteína que interactúa con otra molécula a través de una serie de enlaces no-covalentes es denominada **lugar de unión**. Una proteína puede contener lugares de unión para muchas moléculas grandes y pequeñas. Si el lugar de unión reconoce la superficie de una segunda proteína, la unión estrecha de dos cadenas polipeptídicas plegadas en este lugar puede generar una mo-



Figura 3–20 Dos subunidades proteicas idénticas se unen formando una proteína dimérica simétrica. La proteína represora Cro del bacteriófago lambda se une al DNA inhibiendo los genes virales. Sus dos subunidades idénticas se unen cabeza con cabeza mediante una combinación de fuerzas hidrofóbicas (*azul*) y un conjunto de enlaces de hidrógeno (región *amarilla*). (Adaptado de D.H. Ohlendorf, D.E. Tronrud, y B.W. Matthews, *J. Mol. Biol.* 280:129-136, 1998. Con la autorización de Academic Press.)

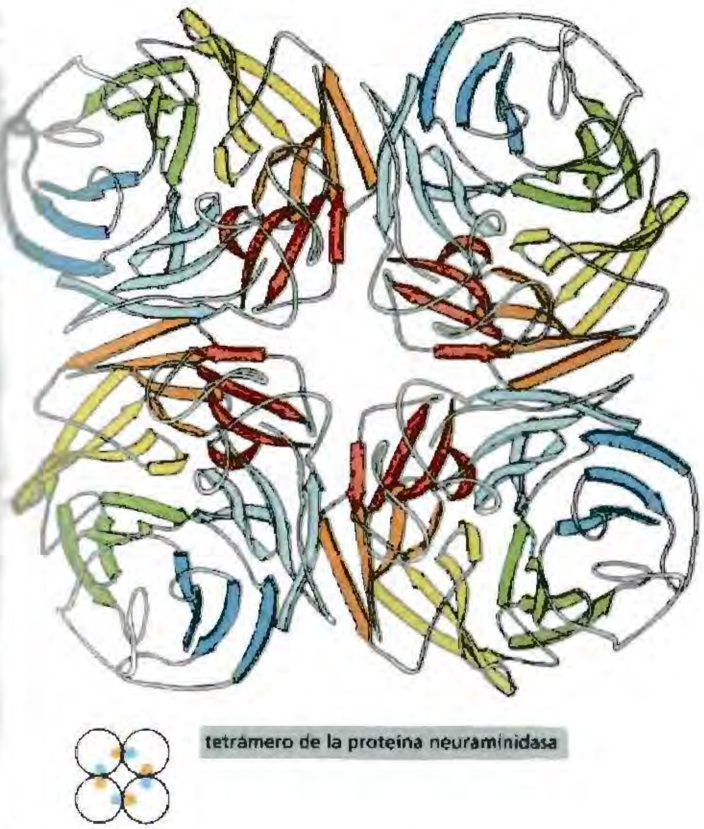


Figura 3–21 **Molécula proteica que contiene varias copias de una subunidad proteica sencilla.** La enzima neuraminidasa consta de un anillo formado por cuatro cadenas polipeptídicas idénticas. Cada una de estas cadenas está formada por seis repeticiones de cuatro cadenas en lámina β, como se indica con las flechas coloreadas. El esquema pequeño muestra cómo se forma la estructura mediante la utilización repetida de una misma interacción de unión.

…ca mayor, con una geometría definida de forma precisa. En una proteína como … cadena polipeptídica se denomina **subunidad proteica**.

… caso más sencillo, dos cadenas polipeptídicas plegadas idénticas se unen una a … ndo una disposición "cabeza con cabeza", formando un complejo simétrico de … idades proteicas (llamado un *dímero*) que se mantiene unido por interacciones … ugares de unión idénticos. La *proteína represora Cro* –una proteína reguladora de … cos, que se une al DNA silenciando los genes víricos de una bacteria infectada– … un ejemplo de ello (**Figura 3–20**). Las células contienen muchos otros tipos de … proteicos simétricos, formados por varias copias de una misma cadena polipep… …ejemplo, la enzima *neuraminidasa* está formada por un anillo de cuatro subuni… …cas idénticas, cada una de las cuales se une a la siguiente, siguiendo un patrón … (**Figura 3–21**).

… de las proteínas celulares contienen dos o más tipos de cadenas polipeptídicas. …*bina*, la proteína de los glóbulos rojos que transporta el oxígeno, contiene dos … idénticas de α-globina y dos subunidades idénticas de β-globina, dispuestas …nte (**Figura 3–22**). Estas proteínas formadas por varias subunidades son nume… … células y pueden ser muy grandes. En la **Figura 3–23** se presenta una muestra de … cuyas estructuras exactas son conocidas, y se compara los tamaños y las formas de …tas proteínas grandes con algunas de las proteínas relativamente pequeñas que …entado como modelos hasta ahora.

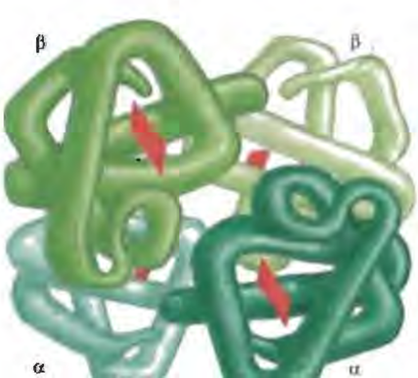


Figura 3–22 **Proteína formada por una disposición simétrica de dos subunidades diferentes.** La hemoglobina es una proteína abundante en los glóbulos rojos de la sangre, que contiene dos copias de la α-globina y dos copias de la β-globina. Cada una de estas cuatro cadenas polipeptídicas contiene una molécula hemo (en *rojo*), que es el lugar donde se une el oxígeno (O_2). Así, cada molécula de hemoglobina de la sangre transporta cuatro moléculas de oxígeno.

…as proteínas forman largos filamentos helicoidales

… moléculas proteicas se ensamblan y forman filamentos que pueden medir toda la … de una célula. En su forma más sencilla, si el lugar de unión de una proteína es …ntario a otra región de la superficie de la misma proteína, se puede generar una … moléculas proteicas idénticas (**Figura 3–24**). Por ejemplo, un filamento de actina … larga estructura helicoidal formada por muchas moléculas de la proteína *actina* …**25**). La actina es muy abundante en las células eucariotas, donde constituye uno …cipales sistemas filamentosos del citoesqueleto (Capítulo 16).

… qué la hélice es una estructura tan común en biología? Como hemos visto, a me… … estructuras biológicas están formadas por la unión de subunidades similares –co-

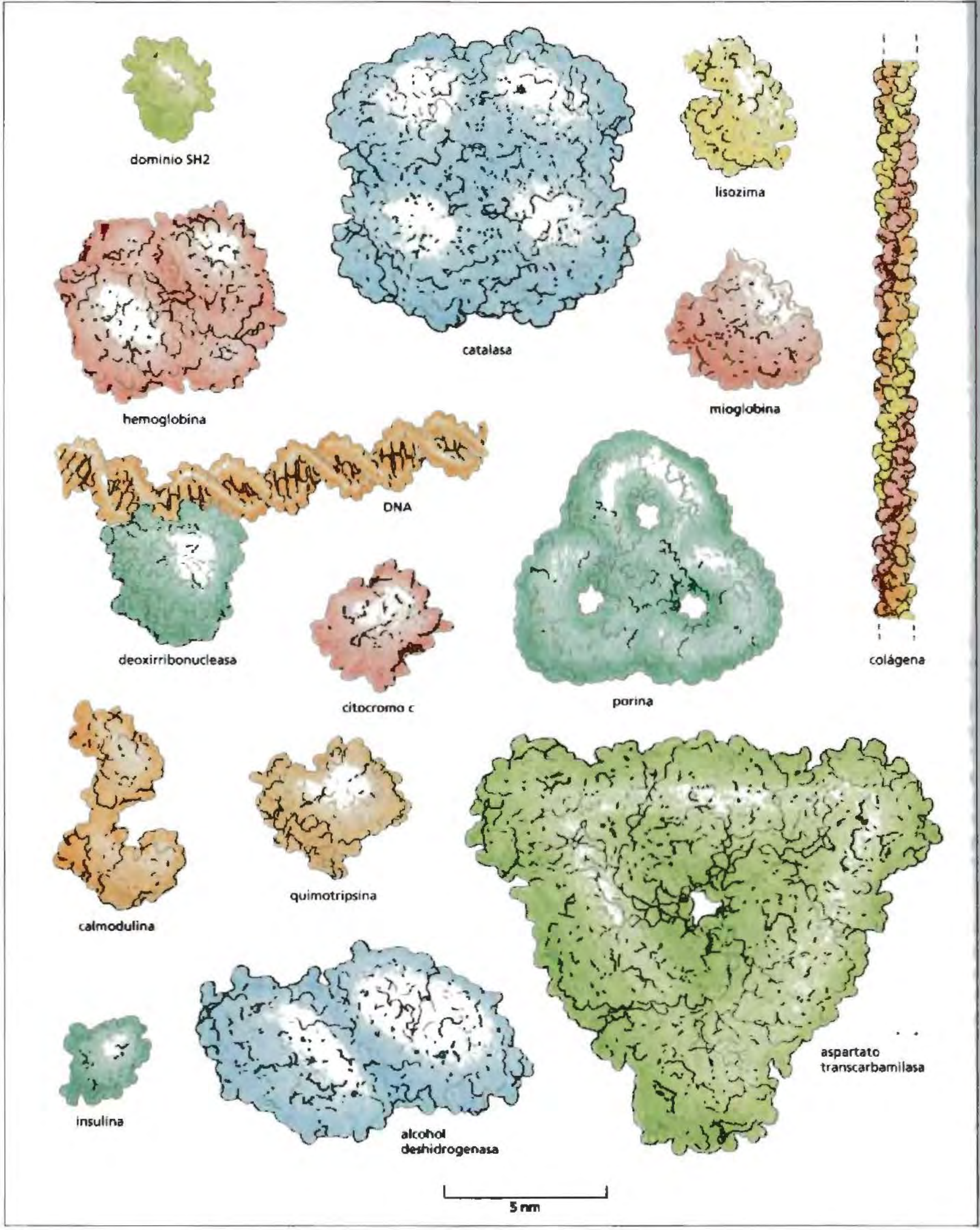


Figura 3–23 Colección de moléculas proteicas, representadas a la misma escala. Para poder comparar, se ilustra también una molécula de DNA unida a una proteína. Estos modelos espaciales compactos representan un rango de formas y tamaños. La hemoglobina, la catalasa, la porina, la alcohol deshidrogenasa y la aspartato transcarbamilasa están formadas por múltiples copias de subunidades. El dominio SH2 (*arriba a la izquierda*) se representa con detalle en el Panel 3-2 (pp. 132-133). (Adaptado de David S. Goodsell, Our Molecular Nature. New York: Springer-Verlag, 1996. Con la autorización de Springer Science y Business Media.)

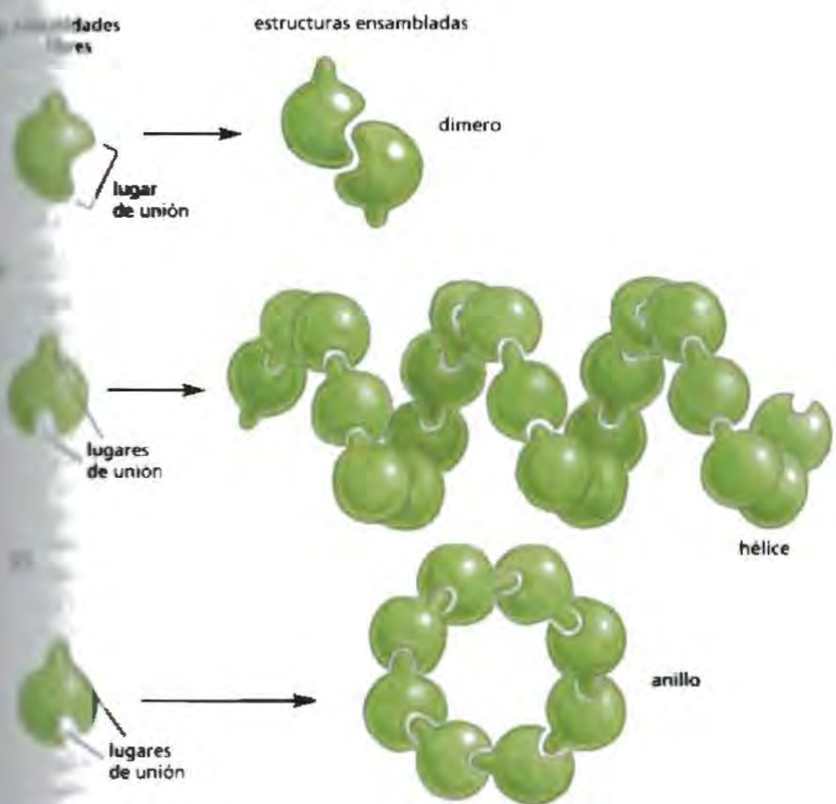


Figura 3–24 Ensamblajes proteicos. (A) Una proteína con un solo lugar de unión puede formar un dímero con otra proteína idéntica. (B) Proteínas idénticas con dos lugares de unión diferentes, a menudo forman un largo filamento helicoidal. (C) Si los dos lugares de unión están colocados apropiadamente el uno respecto al otro, las subunidades proteicas pueden formar un anillo cerrado en lugar de una hélice. (Para un ejemplo de A, véase la Figura 3-20; para un ejemplo de C, véase la Figura 3-21.)

ácidos o moléculas proteicas– formando largas cadenas repetitivas. Si todas las ...des son idénticas, probablemente las subunidades vecinas sólo encajarán unas ... de una cierta manera, ajustando sus posiciones relativas de forma que minimicen ... libre del contacto entre ellas. En este caso, cada subunidad se dispondrá exacta... la misma manera en relación con las subunidades vecinas, de modo que la sub... encaje en la subunidad 2 de la misma manera que la subunidad 2 encaja en la ... 3 y así sucesivamente. Es muy raro que las subunidades se unan formando una lí... por lo que normalmente esta disposición da lugar a una hélice –una estructura ... recuerda a una escalera de caracol, como se ilustra en la **Figura 3–26**. Depen... giro de la escalera, una hélice puede ser dextrógira o levógira (Figura 3–26E). El ... giro no queda afectado por invertir la hélice de arriba abajo, pero se invierte si la ... refleja en un espejo.

... hélices son comunes en las estructuras biológicas, tanto si las subunidades son mo... pequeñas unidas entre sí covalentemente (p. ej., los aminoácidos en una hélice α) ... son grandes moléculas proteicas unidas por fuerzas no-covalentes (p. ej., las molé... actina en los filamentos de actina). Esto no debe resultar sorprendente. Una hélice ... estructura excepcional y se genera sencillamente disponiendo muchas subunida... una a continuación de otra, de forma que la relación de cada una respecto a la ... se repita de forma estricta –es decir, con una rotación fija seguida de un avance fijo ... del eje de la hélice, como en una escalera de caracol.

Muchas moléculas de proteína tienen una forma fibrosa y alargada

... parte de las proteínas que hemos comentado hasta ahora son *proteínas globulares*, ... la cadena polipeptídica se pliega de una forma compacta, como una pelota, con ... superficie irregular. Las enzimas suelen ser proteínas globulares: a pesar de que muchas ... son grandes y complicadas, formadas por múltiples subunidades, la mayoría tiene ... forma global redondeada (véase la Figura 3–23). Por el contrario, otras proteínas de... papeles en la célula que requieren que cada molécula proteica se extienda a una ... distancia. Por lo general estas proteínas tienen una estructura tridimensional bastante ... alargada; habitualmente se las denomina *proteínas fibrosas*.



Figura 3–25 Filamentos de actina. (A) Electromicrografías de transmisión de filamentos de actina teñidos negativamente. (B) Disposición helicoidal de las moléculas de actina en el filamento. (A, por cortesía de Roger Craig.)

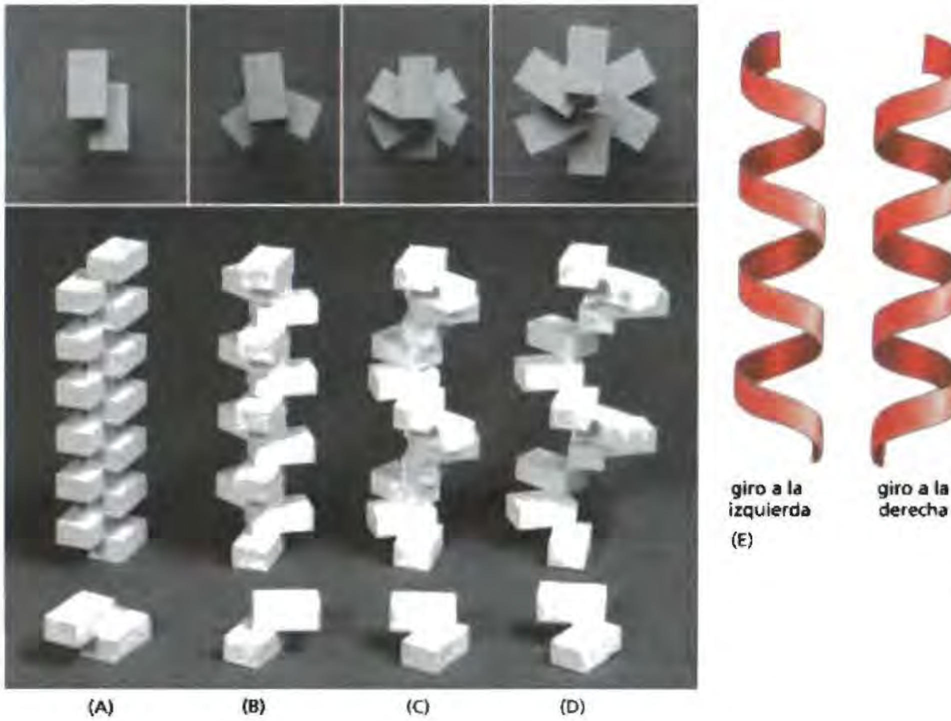
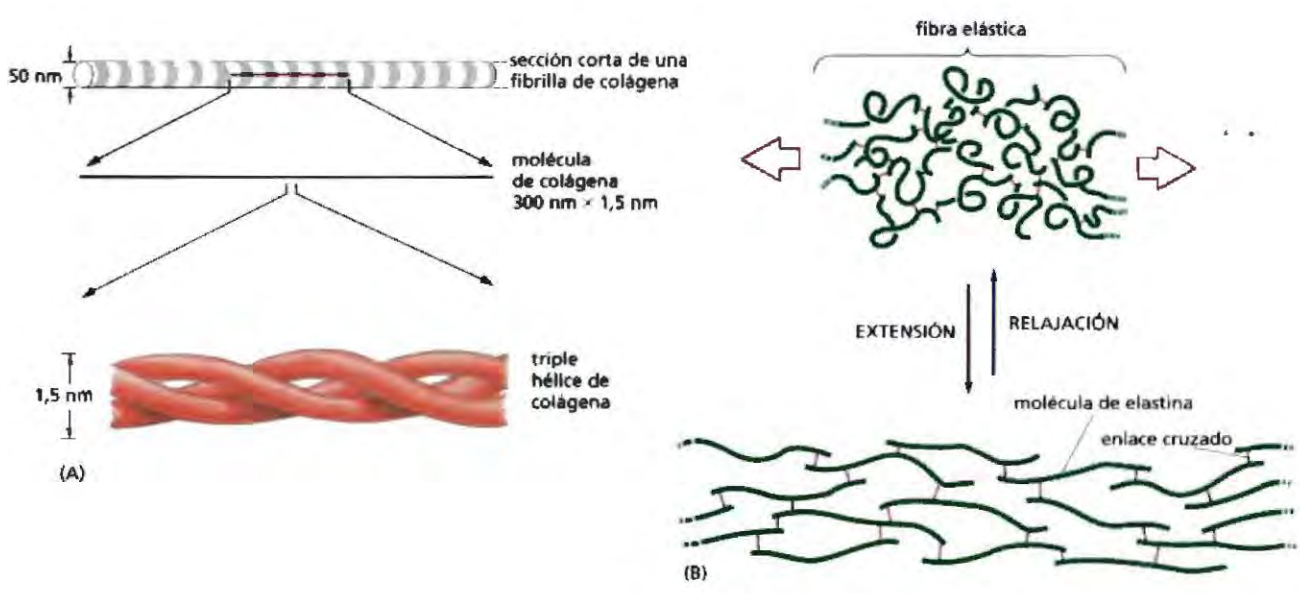


Figura 3-26 Algunas propiedades de una hélice. (A-D) Cuando varias subunidades se unen entre sí de una forma regular, se genera una hélice. En la parte inferior de la figura se presenta la interacción entre dos subunidades y detrás aparecen las hélices que resultan de esta interacción. Las hélices que se presentan aquí son de dos (A), tres (B) o seis unidades por vuelta (C y D). En las fotografías se puede ver la disposición de las subunidades observada desde la parte superior de cada hélice. Nótese que la hélice (D) tiene un paso de vuelta más ancho que la hélice (C), pero el mismo número de subunidades por vuelta. (E) Una hélice puede ser dextrógira o levógira. Como referencia, es útil recordar que los tornillos habituales, que avanzan cuando se les hace girar en el sentido de las agujas de un reloj, son dextrógiros. Nótese que cualquier hélice conserva el mismo sentido de giro aunque se la coloque boca abajo.

Una gran familia de proteínas fibrosas intracelulares consiste en la α-queratina, que hemos presentado cuando se describió la hélice α y las proteínas relacionadas con ella. Los filamentos de queratina son muy estables y constituyen los componentes principales de las estructuras longevas, como el cabello, los cuernos y las uñas. Una molécula de α-queratina es un dímero de dos subunidades idénticas, con las dos largas hélices α de cada subunidad formando una superhélice (véase la Figura 3-9). Los extremos de sus regiones sobreenrolladas están cubiertos por dominios globulares que contienen los lugares de unión. Esto permite que las moléculas de esta clase se ensamblen formando elementos en forma de cuerda, denominados *filamentos intermedios* –un componente importante del citoesqueleto que constituye el armazón estructural en el interior de la célula (véase Figura 16-19).

Las proteínas fibrosas son especialmente abundantes fuera de la célula, donde forman la estructura gelificada conocida como *matriz extracelular* que permite asociar grupos de células independientes y formar tejidos. Las células secretan proteínas de la matriz a su entorno, donde a menudo se ensamblan formando láminas o largas fibrillas. La *colágena* es la más abundante de estas proteínas fibrosas en los tejidos animales. La molécula de colágena

Figura 3-27 La colágena y la elastina. (A) La colágena es una triple hélice formada por tres cadenas proteicas extendidas que se enroscan entre sí (*abajo*). En el espacio extracelular muchas moléculas de colágena, en forma de varilla, se entrelazan mediante enlaces cruzados formando fibrillas de colágena inextensibles (*arriba*) con una resistencia a la tracción semejante a la del acero. La estriación en la fibra de colágena se debe a la disposición regular repetida de las moléculas de colágena en la fibra. (B) Las cadenas polipeptídicas de *elastina* están unidas entre sí mediante enlaces cruzados y forman fibras elásticas. Cuando la fibra es estirada, cada molécula de elastina se desenrolla y adopta una conformación más extendida y se vuelve a enrollar espontáneamente en cuanto cesa la fuerza de extensión.



…tres largas cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales contiene el aminoácido …licina cada tres posiciones. Esta estructura permite que las cadenas se enrollen …rno a las otras para formar una larga hélice regular triple (Figura 3–27A). Muchas … de colágena se unen unas a otras, lado a lado, por sus extremos, dando lugar a …mas solapados que generan las extraordinariamente resistentes fibrillas de colá… mantienen los tejidos unidos, como se describe en el Capítulo 19.

…s proteínas contienen una cantidad sorprendentemente …a de su cadena polipeptídica desestructurada

…ce mucho tiempo se sabe que, en completo contraste con la colágena, otra abun… de la matriz extracelular, la *elastina*, está formada por cadenas polipeptídicas …nte laxas y poco estructuradas. Este desorden es esencial para la función de la … cadena polipeptídica relativamente laxa y poco estructurada está entrecruzada … covalentes formando una especie de malla elástica que puede desplazarse rever… de una conformación a otra, como se ilustra en la Figura 3–27B. Las fibras elásti…ntes capacitan a la piel y a otros tejidos, como las arterias y los pulmones, a …encogerse sin romperse.

…giones intrínsecamente desestructuradas de las proteínas son bastante frecuentes …leza y desempeñan importantes funciones en el interior de la célula. Como he… las proteínas utilizan pequeñas asas de cadena polipeptídica, que sobresalen de la …tral de los dominios proteicos, para unirse a otras proteínas. De forma similar, …oteínas tienen regiones desestructuradas de secuencias de aminoácidos muy lar…teraccionan con otras moléculas (generalmente DNA u otra proteína) y que cuan…n a la otra molécula sufren una transición estructural hacia un plegamiento …l determinado. Otras proteínas se parecen a la elastina en que su función requiere …nezcan muy desestructuradas. Por ejemplo, las abundantes nucleoporinas que … la superficie interna del complejo de poro nuclear, forman una malla enrollada al …está íntimamente involucrada en el transporte nuclear (véase Figura 12–10). Final…mo trataremos más adelante en este mismo capítulo (véase Figura 3–80C), las re…estructuradas de las cadenas polipeptídicas a menudo se utilizan para conectar … de unión de proteínas que actúan conjuntamente catalizando una reacción bio…, por ejemplo, para facilitar la señalización celular grandes *proteínas de armazón* …giones flexibles de este tipo como "ataduras" que sujetan grupos de proteínas que …nan entre sí, a menudo confinándolas en determinadas regiones de la célula (se …n el Capítulo 15).

…os reconocer las regiones desestructuradas de muchas proteínas por su compo…da de aminoácidos: contienen muy pocos de los aminoácidos hidrofóbicos que …nte forman el núcleo de una proteína plegada, mientras que presentan una ele…porción de los aminoácidos Gln, Ser, Pro, Glu y Lys. Estas regiones "nativamente no …" también contienen con frecuencia secuencias repetidas de aminoácidos.

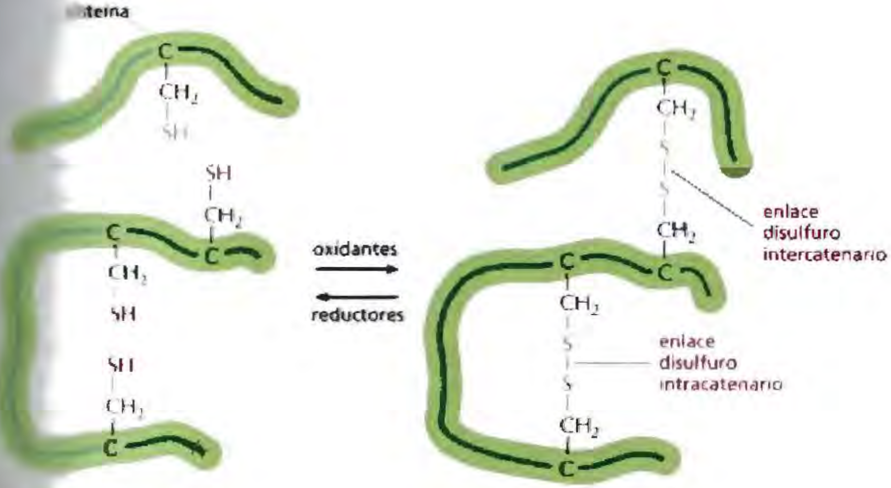


Figura 3–28 Enlaces disulfuro. ‹ATAC›
Este esquema ilustra cómo se forman enlaces disulfuro covalentes entre cadenas laterales adyacentes de cisteína. Como se indica, estos enlaces pueden unir dos partes de una misma cadena polipeptídica o dos cadenas polipeptídicas diferentes. Dado que la energía necesaria para romper un enlace covalente es mucho mayor que la energía necesaria para romper varios enlaces no-covalentes (véase la Tabla 2-1, p. 53), un enlace disulfuro puede tener un efecto estabilizador mayor en una proteína.

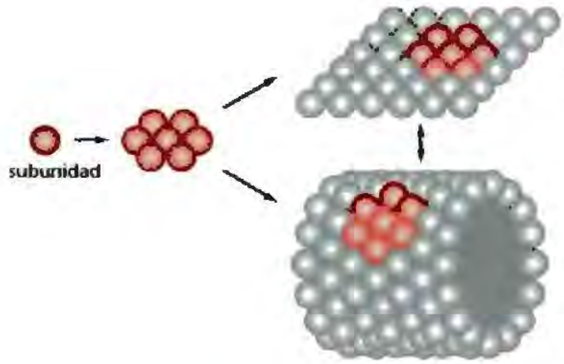


Figura 3-29 Ejemplo de ensamblaje de una sola subunidad proteica que requiere varios contactos proteína-proteína. Las subunidades proteicas globulares empaquetadas de forma hexagonal pueden generar tanto una lámina plana como un tubo.

Las uniones covalentes cruzadas suelen estabilizar las proteínas extracelulares

Muchas moléculas proteicas están unidas a la cara exterior de la membrana plasmática celular o son secretadas como parte de la matriz extracelular. Para ayudar a mantener sus estructuras, las cadenas polipeptídicas de estas proteínas están estabilizadas mediante entrecruzamientos covalentes. Estas uniones enlazan dos aminoácidos de la misma proteína o conectan diferentes cadenas polipeptídicas de una proteína de varias subunidades. Los entrecruzamientos más comunes en las proteínas son los enlaces covalentes azufre–azufre. Estos *enlaces disulfuro* (también llamados *enlaces S–S*) se forman mientras las células se preparan para la exportación a las proteínas acabadas de sintetizar. Como se describe en el Capítulo 12, su formación está catalizada en el retículo endoplasmático por una enzima especial que une dos grupos –SH de las cadenas laterales de cisteína que quedan adyacentes en la proteína plegada (**Figura 3–28**). Los enlaces disulfuro no cambian la conformación de la proteína, sino que actúan como grapas atómicas que refuerzan la conformación más favorecida. Por ejemplo, la lisozima –una enzima de las lágrimas que disuelve las paredes de las células bacterianas– retiene su actividad antibacteriana durante mucho tiempo porque está estabilizada por estos entrecruzamientos.

Los enlaces disulfuro no se suelen formar en el citosol celular, donde una elevada concentración de agentes reductores convierten estos enlaces de nuevo en cisteínas con grupos –SH. Aparentemente, las proteínas no requieren este tipo de refuerzo en el ambiente relativamente protegido del interior de la célula.

A menudo las moléculas proteicas actúan como subunidades que dan lugar a grandes estructuras

Los mismos principios que permiten a una molécula asociarse consigo misma formando anillos o filamentos, también permiten la formación en la célula de estructuras mucho mayores –estructuras supramoleculares como complejos enzimáticos, ribosomas, filamentos proteicos, virus y membranas. Estas grandes estructuras no se sintetizan en forma de moléculas gigantes unidas covalentemente. En lugar de ello, se forman por el ensamblaje no-covalente de muchas moléculas que actúan de subunidades de la estructura final.

La utilización de subunidades pequeñas para construir grandes estructuras presenta varias ventajas:

1. La construcción de una gran estructura a partir de una o algunas subunidades menores repetidas reduce la cantidad de información genética necesaria.
2. Las subunidades se asocian a través de enlaces de energía relativamente baja, por lo que tanto su ensamblaje como su disgregación resultan fáciles de controlar.
3. El ensamblaje de subunidades minimiza los errores en la síntesis de la estructura ya que en el transcurso del ensamblaje pueden actuar mecanismos de corrección que excluyan las subunidades defectuosas.

Algunas subunidades proteicas se ensamblan formando láminas planas en las que las subunidades se disponen siguiendo un patrón hexagonal. A veces, las proteínas especializadas de membranas presentan una disposición de este tipo en el interior de la bicapa lipídica. Un pequeño cambio de la geometría individual de las subunidades puede hacer que una lámina hexagonal se convierta en un tubo (**Figura 3–29**) o, si se producen más cambios, en

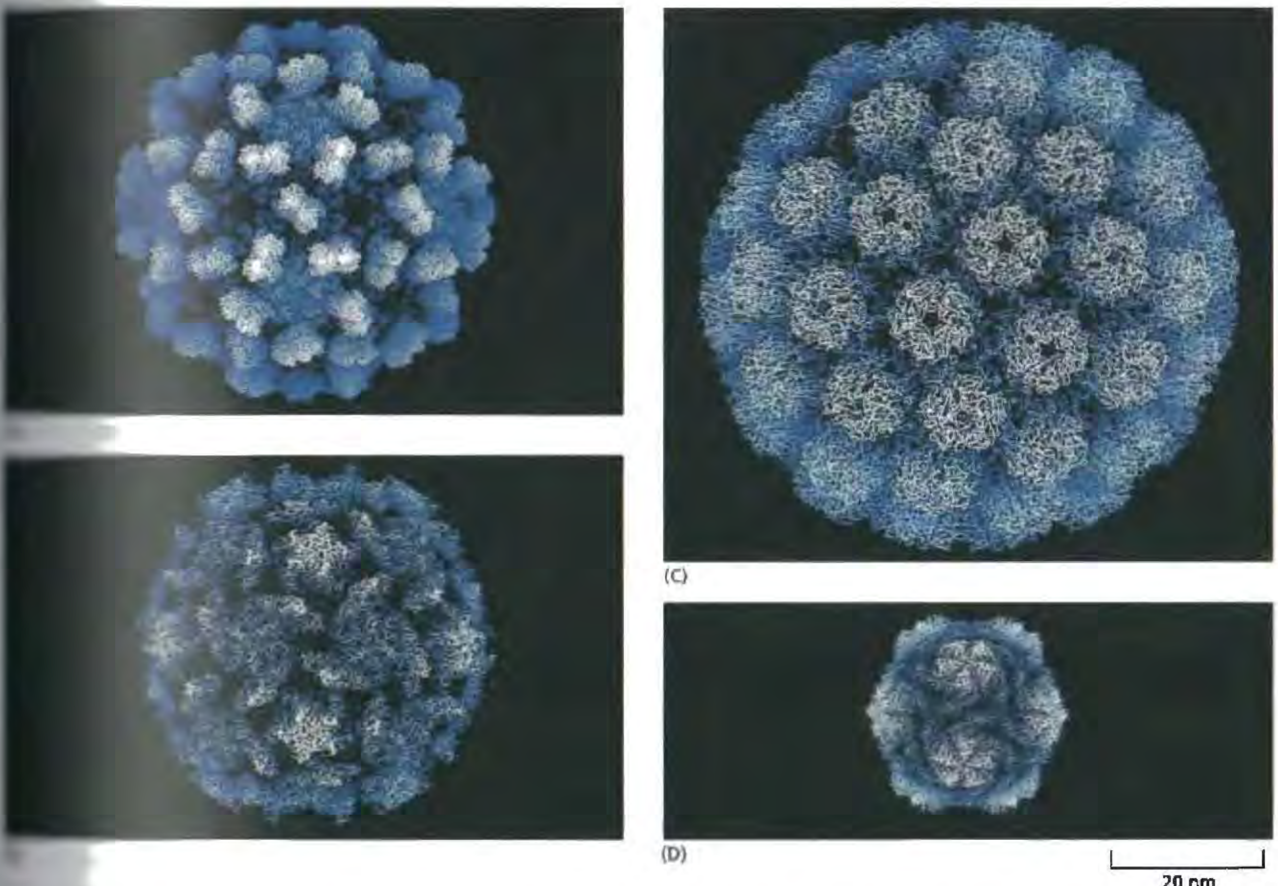


Figura 3–30 Cápsides de algunos virus, todas ellas mostradas a la misma escala. (A) Virus del tomate achaparrado; (B) virus de la polio; (C) virus 40 del mono (SV40: simian virus 40); (D) virus satélite de la necrosis del tabaco. La estructura de todas estas cápsides se ha determinado por cristalografía de rayos X y se obtienen con una resolución de orden atómico. (Por cortesía de Robert Grant, Stephan Crainic y James M. Hogle.)

... hueca. Tubos y esferas proteicas, que unen específicamente en su interior molé- ...NA y de DNA, forman la cubierta de los virus.

...mación de estructuras cerradas como anillos, tubos y esferas proporcionan una ... adicional al incrementar el número de enlaces que se pueden formar entre las ...s proteicas. Además, debido a que estructuras como éstas se forman por inte- ... cooperativas mutuamente dependientes entre subunidades, cambios relativa- ...ños que afecten a cada una de las subunidades pueden inducir su ensamblaje ...amblaje. Estos principios quedan ilustrados en las proteínas de cubiertas pro- ... de muchos virus sencillos que adoptan la forma de una esfera hueca basa- ...cosaedro (**Figura 3–30**). A menudo, las cápsides están formadas por cientos ...dades proteicas idénticas que envuelven y protegen el ácido nucleico vírico ...**31**). La proteína de estas cápsides debe tener una estructura particularmente ... para dar lugar a la esfera no sólo tiene que establecer muchos tipos diferentes de ... sino que también debe poder modificar esta disposición para permitir la salida ...ucleico y así poder iniciar la multiplicación vírica cuando el virus ha entrado en el ... la célula.

...as estructuras celulares son capaces de autoensamblarse

...ión necesaria para el ensamblaje de muchos agregados macromoleculares celu- ... hallarse en las propias subunidades, ya que en condiciones adecuadas las subu- ...ladas pueden ensamblarse espontáneamente dando lugar a la estructura final. ...gregado macromolecular del que se demostró que era capaz de autoensamblar- ... de sus elementos constituyentes fue el *virus del mosaico del tabaco* (*TMV: tobac-* *...virus*). Este virus es una larga varilla en la que un cilindro de proteína se halla ...alrededor de un núcleo helicoidal de RNA (**Figura 3–32**). Si se mezclan en solución ... subunidades proteicas disociadas, se observa que se recombinan formando par- ...as completamente activas. El proceso de ensamblaje es sorprendentemente ... incluye la formación de anillos dobles de proteína que actúan como intermedia- ... añaden a la cubierta vírica en crecimiento.

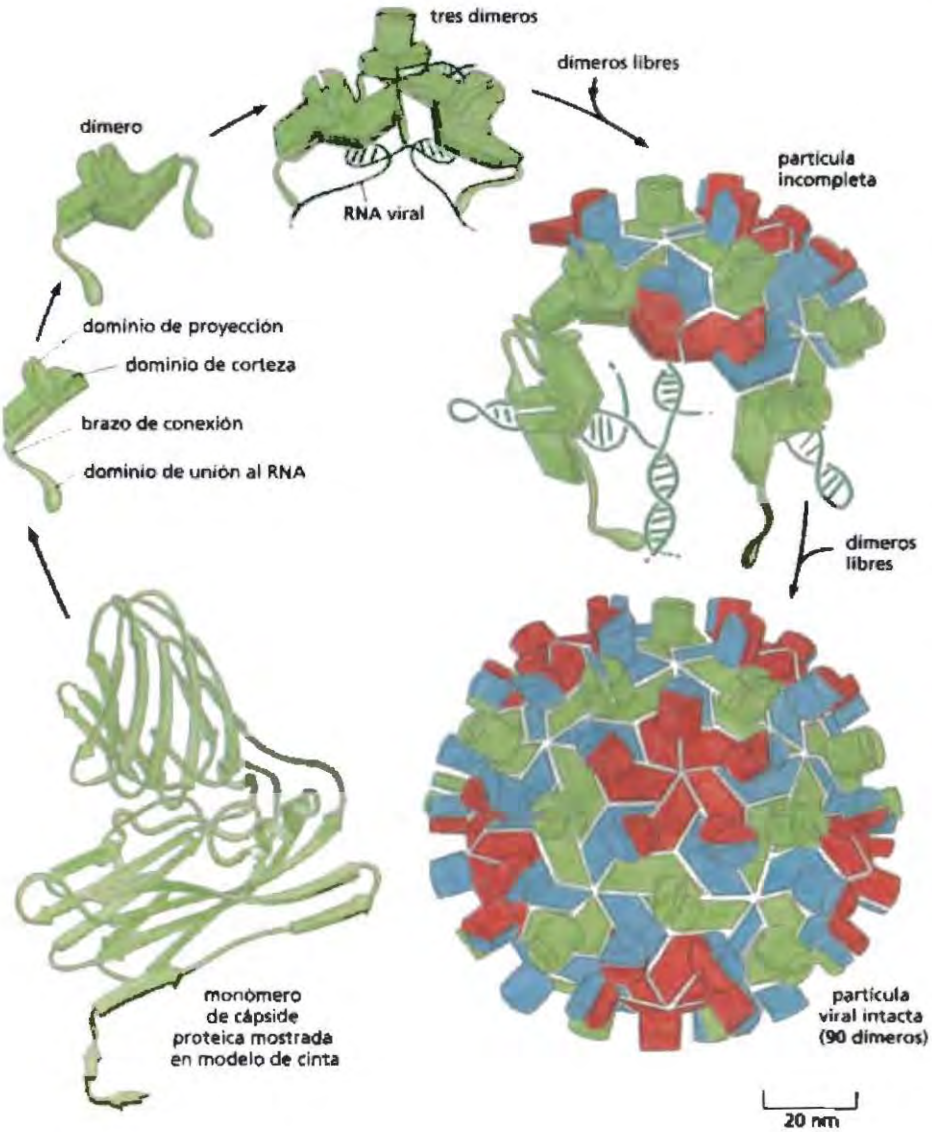
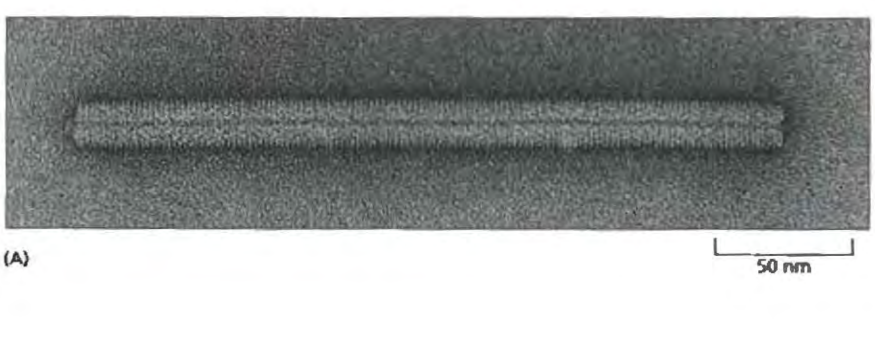
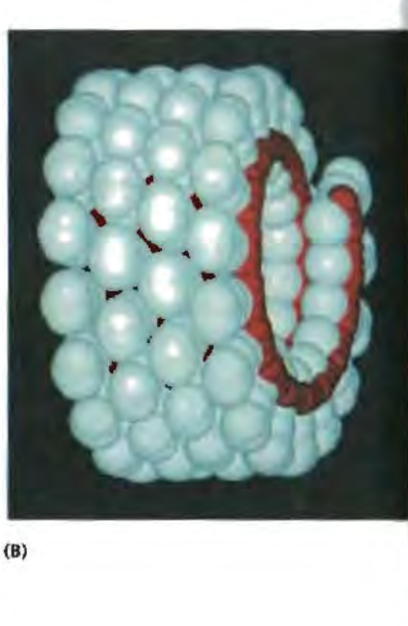


Figura 3-31 Estructura de un virus esférico. En muchos virus, subunidadades proteicas idénticas se empaquetan entre sí generando un caparazón esférico (una cápside) que contiene el genoma viral compuesto de RNA o de DNA (véase también Figura 3-30). Por razones geométricas, no se pueden empaquetar de una forma simétrica precisa más de 60 subunidades idénticas. Sin embargo, cuando existen pequeñas irregularidades estructurales, se puede generar una cápside mayor utilizando un número mayor de subunidades, manteniendo la simetría icosaédrica. Por ejemplo, el virus del tomate achaparrado (TBSV: *tomato bushy stunt virus*) es una esfera de unos 33 nm de diámetro formada por 180 copias idénticas de una proteína de la cápside de 386 aminoácidos y un genoma de RNA de 4500 nucleótidos. Para formar una cápside tan grande, la proteína debe poder colocarse en tres ambientes algo diferentes, cada uno de los cuales se presenta en un color diferente. También se muestra una propuesta sobre el proceso de ensamblaje; la estructura tridimensional precisa se ha determinado por difracción de rayos X. (Ilustraciones por cortesía de Steve Harrison.)

Figura 3-32 Estructura del virus del mosaico del tabaco (TMV: *tobacco mosaic virus*). (A) Electromicrografía de la partícula viral formada por una sola molécula larga de RNA encerrada por una cubierta proteica cilíndrica compuesta por una densa disposición helicoidal de subunidades proteicas idénticas. (B) Modelo que muestra parte de la estructura del TMV. Una molécula de RNA de una sola hebra, de 6395 nucleótidos de longitud, se empaqueta formando una cubierta helicoidal construida a partir de 2130 copias de una proteína de cubierta de 158 residuos de aminoácido de longitud. En el tubo de ensayo a partir de RNA purificado y de moléculas de proteína se pueden autoensamblar partículas del virus con plena capacidad de infección. (A, por cortesía de Robley Williams; B, por cortesía de Richard J. Feldmann.)



(A)



(B)

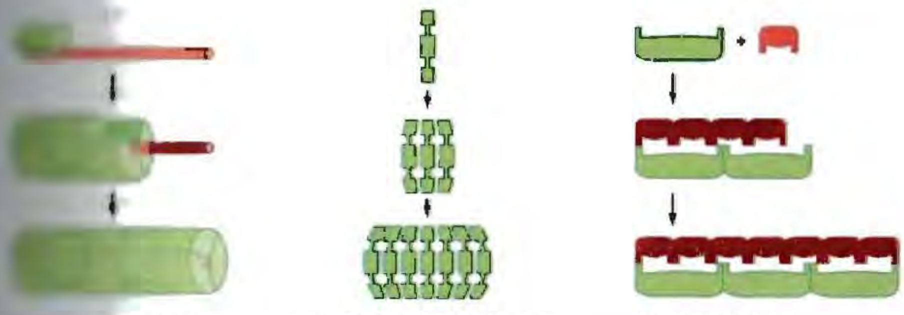


Figura 3–33 Tres posibles sistemas a través de los que se forma un agregado proteico de una longitud determinada. (A) Coensamblaje a lo largo de un núcleo proteico alargado o de otra macromolécula, que actúan como dispositivo de medida de longitud. (B) El final del ensamblaje se produce debido a la tensión que se acumula en la estructura polimérica a medida que se van añadiendo más subunidades, de forma que a partir de una cierta longitud, la energía necesaria para añadir otra subunidad a la cadena es excesiva. (C) Ensamblaje tipo "pie de rey", en el cual dos tipos de moléculas semejantes a un rodillo, de longitud diferente, forman un complejo escalonado que crece hasta que sus finales coinciden exactamente.

...gado macromolecular complejo que se puede reensamblar a partir de sus ele... ...ituyentes es el ribosoma bacteriano. Estos ribosomas están compuestos por ...culas proteicas diferentes y 3 moléculas diferentes de rRNA. Si se incuban los ... individuales en condiciones apropiadas en el tubo de ensayo, espontánea... ...n a formar la estructura original y, lo que es más importante, estos ribosomas ... son capaces de catalizar la síntesis proteica. Como cabía esperar, el proceso de ... de los ribosomas sigue una vía específica: después de que ciertas proteínas se ... otras proteínas se unen a este complejo, y así sucesivamente hasta que la es... ... completa.

... no se sabe cómo se regulan algunos de los procesos más complicados de auto... Por ejemplo, parece que muchas estructuras de la célula tienen una longitud ... definida, que es muchas veces superior a la de las macromoléculas que las ... En muchos casos todavía constituye un enigma cómo se consigue esta determi... ... longitud. En la **Figura 3–33** se ilustran tres posibles mecanismos de este proce... ...o más sencillo, un núcleo proteico u otra macromolécula proporciona un ... determina el tamaño final del ensamblaje. Éste es el mecanismo que determina ... la partícula TMV en la que el núcleo está constituido por la cadena de RNA. De ... se ha demostrado que es una proteína de núcleo la que determina la longitud ...ntos finos del músculo y de las largas colas de algunos virus bacterianos ...

...o la presencia de factores de ensamblaje colabora ...nación de estructuras biológicas complejas

...structuras celulares mantenidas por enlaces no-covalentes se autoensamblan. ... una mitocondria, un cilio o una miofibrilla de una fibra muscular no pueden ...ontáneamente a partir de una solución de sus componentes macromolecula... ... casos, parte de la información necesaria para el ensamblaje es suministrada ... especiales y por otras proteínas que realizan la función de plantilla guiando la ... y que, en la estructura final, una vez ensamblada, no aparecen.

... algunas estructuras pequeñas carecen de alguno de los ingredientes necesarios ...mblaje. Por ejemplo en la formación de un pequeño virus bacteriano, la estruc... ...eza, compuesta por un solo tipo de subunidad proteica, se ensambla sobre un ...itorio compuesto por una segunda proteína. Puesto que esta segunda proteína ... la partícula vírica final, la estructura de la cabeza no puede reensamblarse es... ...te después de haber sido disgregada. Se conocen otros ejemplos en los que la ... proteolítica es un paso esencial e irreversible del proceso de ensamblaje. Este es ...mos agregados proteicos pequeños, incluyendo la colágena y la hormona insu... ...3-35). Sobre la base de estos ejemplos relativamente sencillos, parece cierto que ... de una estructura tan compleja como una mitocondria o un cilio implique una ... espacial y temporal suministrada por otros componentes celulares.



Figura 3–34 Electromicrografía del bacteriófago lambda. La punta de la cola del virus se une específicamente a una proteína determinada de la superficie de una célula bacteriana y, a continuación, un DNA densamente empaquetado, situado en la cabeza del virus, es inyectado a la célula a través de la cola del virus. La cola tiene una longitud precisa, determinada por el mecanismo que se muestra en la Figura 3-33A.

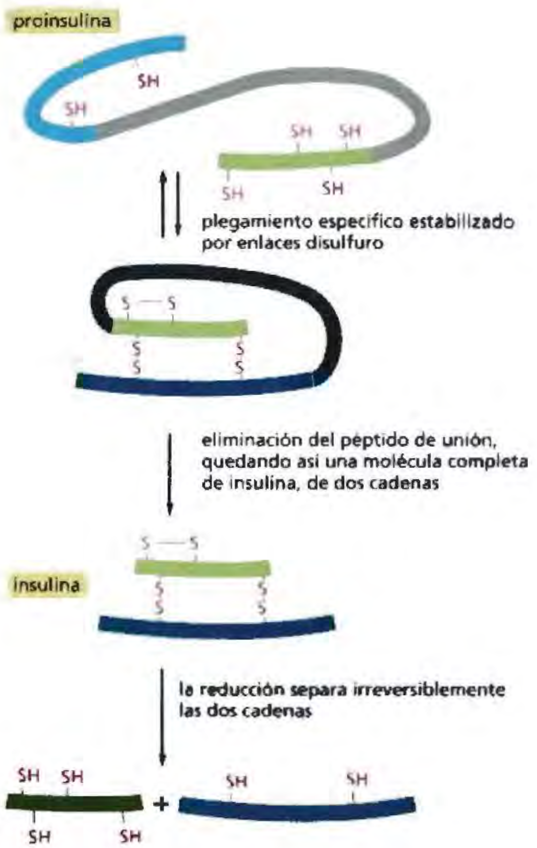


Figura 3-35 Rotura proteolítica en el ensamblaje de la insulina. La hormona polipeptídica insulina no puede formarse de nuevo espontáneamente de forma eficiente si se rompen sus enlaces disulfuro. Se sintetiza como una gran proteína (*proinsulina*), la cual es dividida por una enzima después de que la cadena polipeptídica se haya plegado adoptando una forma específica. La escisión de parte de la cadena polipeptídica de la proinsulina supone una pérdida irreparable de la información necesaria para que la proteína se pliegue espontáneamente adoptando su conformación normal. Una vez la insulina ha sido desnaturalizada y sus dos cadenas polipeptídicas se han separado, pierde la capacidad de volverse a ensamblar.

Resumen

La secuencia de aminoácidos de las moléculas de proteína determina su conformación tridimensional. Las interacciones no-covalentes entre diferentes zonas de la cadena polipeptídica estabilizan su estructura plegada. Los aminoácidos cuyo residuo es hidrofóbico tienden a agruparse en el interior de la molécula y las interacciones locales por enlaces de hidrógeno entre los enlaces peptídicos vecinos dan lugar a hélices α y láminas β.

Muchas proteínas se construyen a partir de unidades modulares que son regiones globulares conocidas como dominios. Estos dominios generalmente contienen entre 40 y 350 aminoácidos. De forma característica, las proteínas pequeñas presentan un solo dominio mientras que las proteínas más grandes tienen varios dominios unidos entre sí a través de tramos de la cadena polipeptídica, de longitudes variadas y algunos de los cuales pueden estar relativamente desordenados. A medida que las proteínas evolucionaron, los dominios fueron modificándose y combinándose con otros dominios, construyéndose así nuevas proteínas. Hasta el momento se han observado unas 800 maneras diferentes de plegarse un dominio, entre las más de 20.000 estructuras proteicas conocidas.

Las proteínas pueden unirse entre sí formando grandes estructuras mediante las mismas fuerzas no-covalentes que determinan el plegado de las proteínas. Las proteínas que presentan lugares de unión para su propia superficie se pueden ensamblar formando dímeros, anillos cerrados, estructuras esféricas o polímeros helicoidales. Algunas mezclas de proteínas y de ácidos nucleicos se pueden ensamblar espontáneamente en un tubo de ensayo produciendo estructuras complejas, pero muchos procesos de ensamblaje presentan pasos irreversibles de modo que no todas las estructuras de la célula son capaces de reensamblarse espontáneamente después de haber sido disociadas en sus elementos constituyentes.

FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Hemos visto que cada tipo de proteína está formada por una secuencia precisa de aminoácidos que le permite plegarse en una forma tridimensional particular o conformación. Pero las proteínas no son un material rígido. Generalmente tienen partes móviles de precisa in-

...ría cuyos movimientos mecánicos están acoplados a procesos químicos. Este acopla-...to de química y movimiento es lo que da a las proteínas las extraordinarias capacidades ...on la base de los procesos dinámicos en las células vivas.

...n esta parte del capítulo, explicaremos de qué forma las proteínas se unen a otras mo-...s determinadas y de qué manera su actividad depende de esta unión. La capacidad de ... a otras moléculas permite que las proteínas actúen como catalizadores, receptores de ...s, interruptores, motores o pequeñas bombas. Los ejemplos que se darán no son en ...ra alguna un listado exhaustivo del vasto repertorio funcional de las proteínas. En todo ...o se trata de las funciones especializadas de muchas otras proteínas, basadas en prin-... similares.

...das las proteínas se unen a otras moléculas

...opiedades biológicas de una molécula proteica dependen de su interacción física con ...moléculas. Así, los anticuerpos se unen a virus y bacterias como una señal para su des-...ón, la enzima hexoquinasa se une a la glucosa y al ATP antes de catalizar la reacción ...llos, las moléculas de actina se unen unas a otras formando los filamentos de actina. ... hecho, todas las proteínas se adhieren, o se *unen*, a otras moléculas. En algunos ca-... unión es muy fuerte; en otros, es débil y transitoria. Pero la unión siempre presenta ...n *especificidad*, en el sentido de que cada proteína puede unirse sólo a una molécu-...nos cuantos tipos de moléculas de entre los muchos millares de moléculas que se en-...n en su entorno. A la sustancia que se une a la proteína sea un ion, una molécula ...ña o una macromolécula como otra proteína, se la denomina **el ligando** de esa pro-... (del latín *ligare*, unir).

...capacidad de una proteína para unirse selectivamente y con alta afinidad a un ligan-...debe a la formación de una serie de enlaces débiles no-covalentes –enlaces de hi-...o, atracciones electrostáticas y atracciones de van der Waals– y de interacciones ...bas favorables (véase el Panel 2–3, pp. 110–111). Cada uno de los enlaces es débil, por ... para que la unión sea efectiva hace falta que se formen simultáneamente muchos en-...biles. Este hecho sólo es posible si el contorno de la superficie de la molécula del li-... encaja perfectamente en la proteína, como una mano en un guante (**Figura 3–36**).

...ralmente, la región de una proteína que se asocia con el ligando, conocida como ... *de unión*, consiste en una cavidad de la superficie de la proteína formada por una dis-... particular de los aminoácidos. Estos aminoácidos pueden pertenecer a diferentes ... de la cadena polipeptídica que cuando la proteína se ha plegado quedan cerca unos ... (Figura 3–37). A menudo otras regiones de la superficie constituyen lugares de ... diferentes ligandos que regulan la actividad de la proteína, como veremos más ...e. Por último, otras zonas de la proteína actúan como asa para situar la proteína en ...lización particular en la célula –por ejemplo, el dominio SH2, explicado previamen-... se utiliza para desplazar la proteína que lo contiene a una localización intracelular ...nada en respuesta a señales concretas.

...que los átomos escondidos en el interior de la proteína no tienen un contacto di-... el ligando, constituyen el esqueleto esencial que confiere a la superficie sus con-... y sus propiedades químicas. A menudo, pequeñas variaciones producidas en los

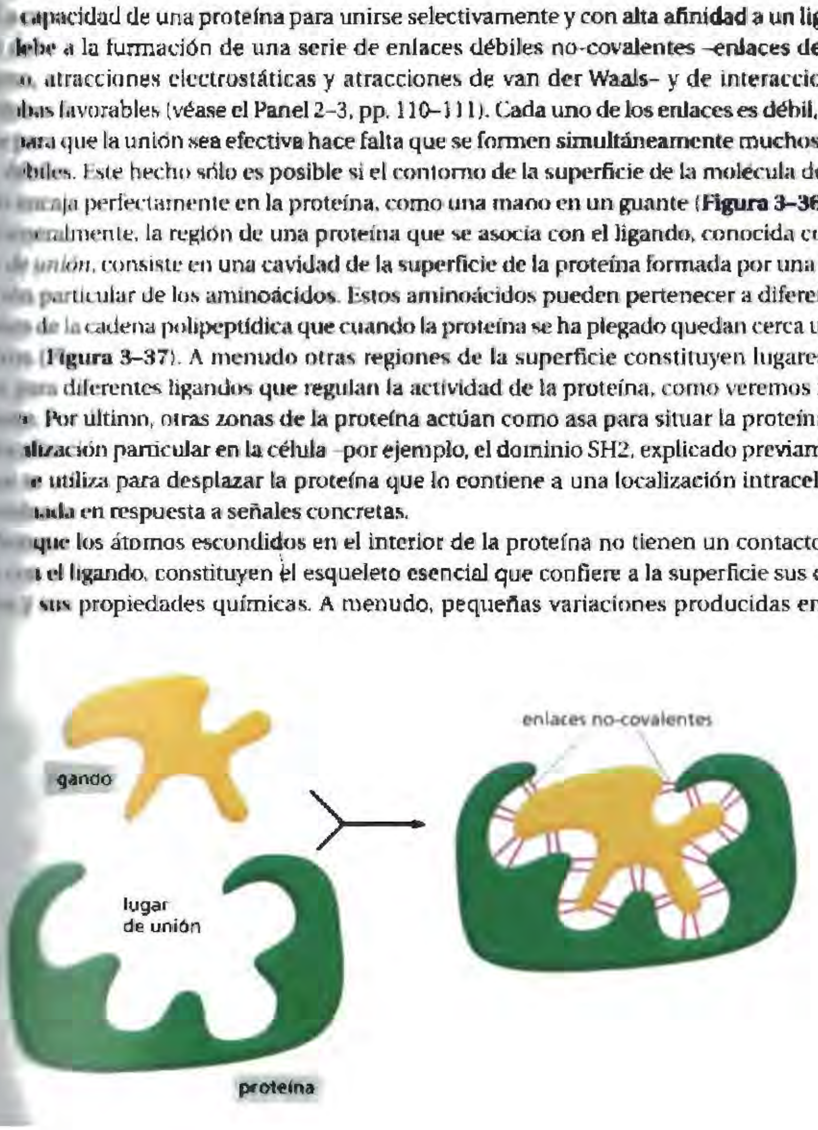
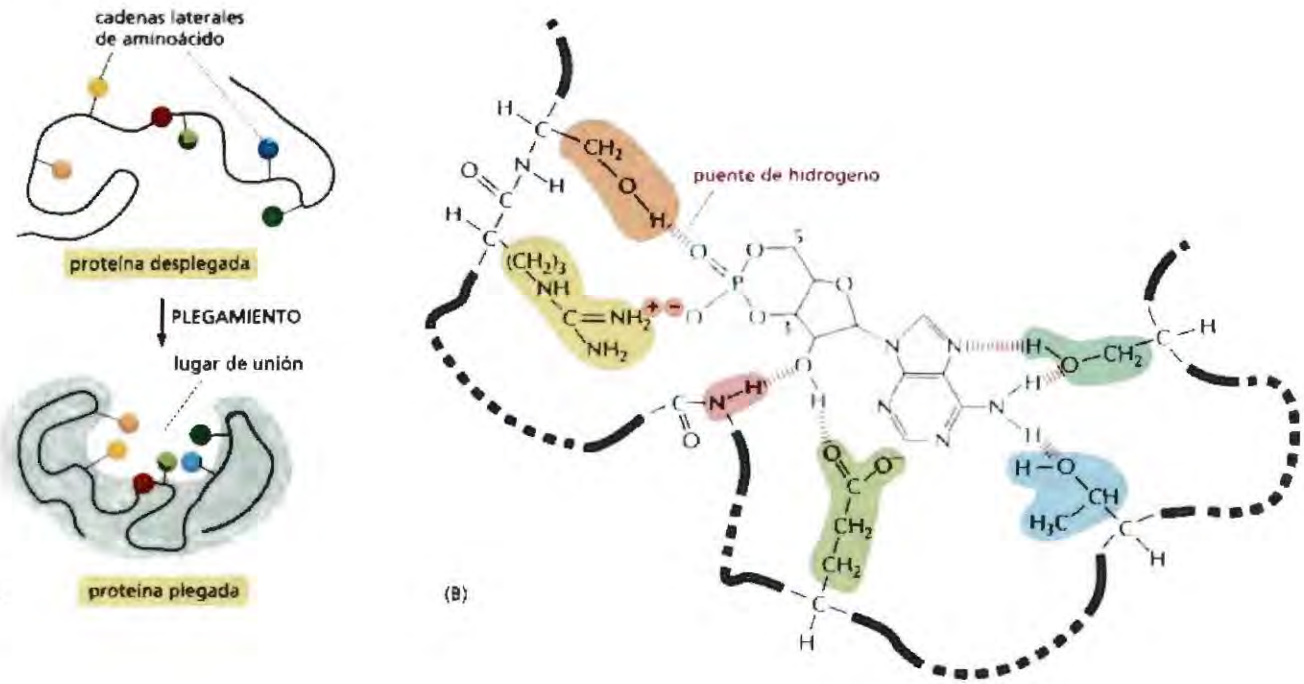


Figura 3–36 Unión selectiva de una proteína a otra molécula. Se necesitan muchos enlaces débiles para que una proteína se una fuertemente a una segunda molécula, a la cual se llama *ligando* de la proteína. Por lo tanto, un ligando debe encajar con precisión en el lugar de unión de la proteína, como una mano en un guante. Así se formarán un gran número de enlaces no-covalentes entre la proteína y el ligando.



aminoácidos del interior de la proteína provocan cambios en su forma tridimensional que destruyen un lugar de unión en la superficie.

Figura 3-37 Lugar de unión de una proteína. (A) Típicamente, el plegamiento de la cadena polipeptídica genera una hendidura o cavidad en la superficie proteica. La cavidad contiene una serie de cadenas laterales de aminoácidos dispuestas de tal modo que sólo pueden formar enlaces no-covalentes con ciertos ligandos. (B) Primer plano de un lugar de unión real mostrando los enlaces de hidrógeno y las interacciones iónicas formadas entre la proteína y su ligando. En este ejemplo, el ligando unido es el AMP cíclico.

La conformación de la superficie de una proteína determina sus propiedades químicas

Las proteínas tienen capacidades químicas sorprendentes porque, a menudo, los residuos superficiales de una proteína interaccionan de tal manera que alteran la reactividad química de algunos residnos determinados de aminoácidos. Estas interacciones son de dos tipos principales.

En primer lugar, la interacción entre zonas vecinas de la cadena polipeptídica restringe el acceso de moléculas de agua a los lugares de unión del ligando. Esto es importante porque las moléculas de agua forman enlaces de hidrógeno que pueden competir con los ligandos por sitios de la superficie proteica. Si las moléculas de agua son excluidas de sus lugares de unión, las proteínas y sus ligandos forman fuertes enlaces de hidrógeno (e interacciones electrostáticas). Resulta difícil de imaginar un mecanismo que excluya de la superficie de una proteína una molécula tan pequeña como la del agua sin afectar el acceso del propio ligando. Sin embargo, y debido a la tendencia que tiene el agua a formar enlaces de hidrógeno agua-agua, las moléculas de agua forman una amplia red mantenida por estos enlaces (véase el Panel 2-2, pp. 108–109). En efecto, el lugar de unión del ligando puede permanecer seco para que resulte energéticamente desfavorable a cada una de las moléculas de agua separarse de la red e introducirse en una grieta de la superficie proteica.

En segundo lugar, la agrupación de residuos de aminoácidos polares vecinos puede alterar su reactividad. Por ejemplo, si el plegamiento de la proteína induce a agruparse a varias cadenas laterales con carga negativa, en contra de su repulsión mutua, la afinidad de cada residuo de aminoácido por un ion de carga positiva aumenta marcadamente. Determinadas cadenas laterales también pueden interaccionar una con otra a través de enlaces de hidrógeno, los cuales pueden activar grupos laterales normalmente no reactivos (como el $-CH_2OH$ de la serina, que se muestra en la **Figura 3-38**) transformándolos en grupos altamente reactivos capaces de generar o romper enlaces covalentes determinados.

Por consiguiente, la superficie de cada molécula proteica tiene una reactividad química característica que depende no sólo de las cadenas laterales de aminoácidos que quedan al descubierto, sino también de la exacta orientación de estas cadenas entre sí. Por esta razón, dos conformaciones ligeramente diferentes de una misma molécula proteica pueden ser muy diferentes en cuanto a sus propiedades químicas.

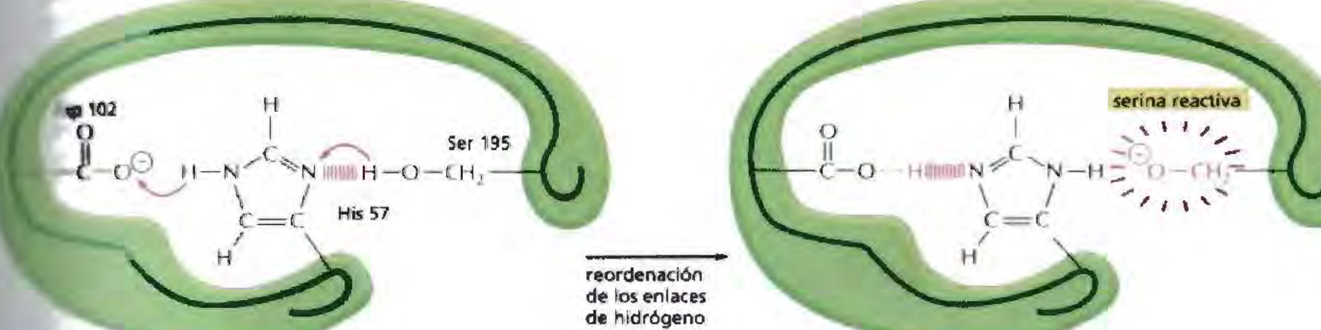


Figura 3–38 Un aminoácido muy reactivo actúa en el lugar activo de una enzima. El ejemplo que se muestra es la "tríada catalítica" que se presenta en la quimotripsina, en la elastasa y en otras serinas proteasa (véase Figura 3-12). La cadena lateral del ácido aspártico (Asp 102) induce a la histidina (His 57) a eliminar el protón de la serina 195. Este hecho activa la serina formando un enlace covalente con el sustrato de la enzima e hidrolizando un enlace peptídico. En esta imagen se han omitido muchas circunvoluciones de la cadena polipeptídica.

La comparación de secuencias entre miembros de una familia proteica revela lugares cruciales de unión al ligando

Como hemos descrito anteriormente, las secuencias de los genomas permiten agrupar muchos dominios proteicos en familias, que muestran evidencias claras de su evolución a partir de un antecesor común. Las estructuras tridimensionales de los miembros de la misma familia del dominio tienen una similitud remarcable. Por ejemplo, incluso cuando la identidad de la secuencia de aminoácidos cae al 25%, el esqueleto atómico en el dominio sigue un plegamiento proteico común dentro de un rango de 0,2 nanómetros (2Å).

Por tanto podemos utilizar un método llamado "rastreo evolutivo" (*evolutionary tracing*) para identificar los lugares de un dominio proteico que son más cruciales para su función. Para ello, aquellos aminoácidos que no han cambiado, o que prácticamente no han cambiado en todos los miembros conocidos de la familia proteica, se cartografían en un modelo de la estructura tridimensional de uno de los miembros de la familia. Una vez hecho esto, las posiciones menos variables a menudo forman uno o más grupos en la superficie proteica, como se ilustra en la **Figura 3–39A** para el dominio SH2 descrito previamente (véase el Panel 3–2, pp. 132–133). Estos grupos generalmente corresponden a lugares de unión de ligandos.

El dominio SH2 es un módulo que actúa en las interacciones proteína-proteína. Une la proteína que lo contiene a otra proteína que contenga una cadena lateral de tirosina fosforilada en un contexto de secuencia de aminoácidos específico, tal como se muestra en la Figura 3–39B. Los aminoácidos localizados en el lugar de unión para el polipéptido fosforilado han sido los que más lentamente han cambiado durante el largo proceso evolutivo que produjo la gran familia SH2 de dominios de reconocimiento de péptidos. Debido a que la mutación es un proceso aleatorio, este resultado se atribuye a la eliminación preferente, durante la evolución, de todos los organismos cuyos dominios SH2 fueron alterados de un modo que inactivó el lugar de unión SH2 y destruyó la función del dominio.

En esta era de exhaustiva secuenciación genómica, se han descubierto una gran cantidad de nuevas familias de proteínas cuyas funciones se desconocen. Cuando se ha determinado la estructura tridimensional de uno de los miembros de la familia, el rastreo evolutivo permite a los biólogos determinar los lugares de unión de los otros miembros de la familia, lo cual ayuda a descifrar la función de estas proteínas.

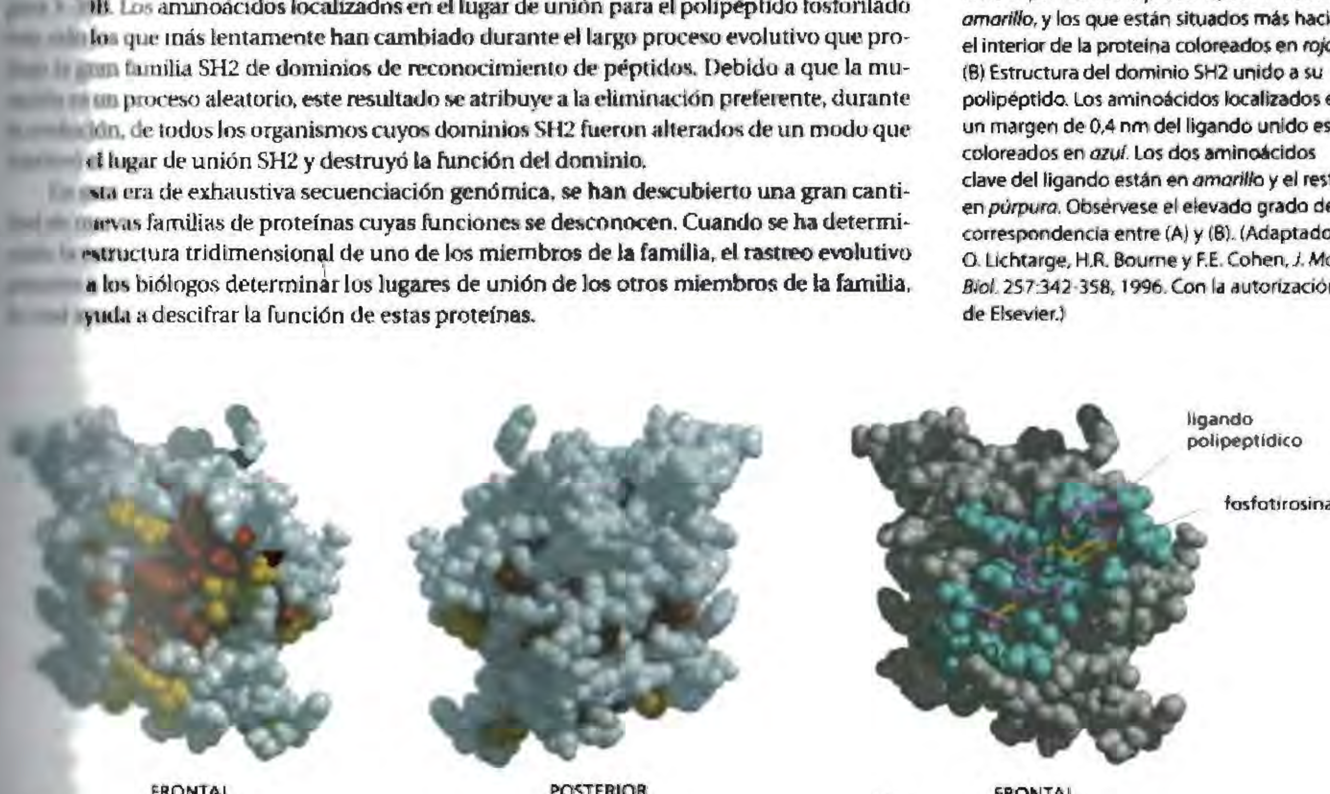


Figura 3–39 El método de rastreo evolutivo aplicado al dominio SH2. (A) Visión frontal y posterior de un modelo espacial compacto del dominio SH2, con los aminoácidos conservados durante la evolución situados en la superficie de la proteína, coloreados en *amarillo*, y los que están situados más hacia el interior de la proteína coloreados en *rojo*. (B) Estructura del dominio SH2 unido a su polipéptido. Los aminoácidos localizados en un margen de 0,4 nm del ligando unido están coloreados en *azul*. Los dos aminoácidos clave del ligando están en *amarillo* y el resto en *púrpura*. Obsérvese el elevado grado de correspondencia entre (A) y (B). (Adaptado de O. Lichtarge, H.R. Bourne y F.E. Cohen, *J. Mol. Biol.* 257:342-358, 1996. Con la autorización de Elsevier.)

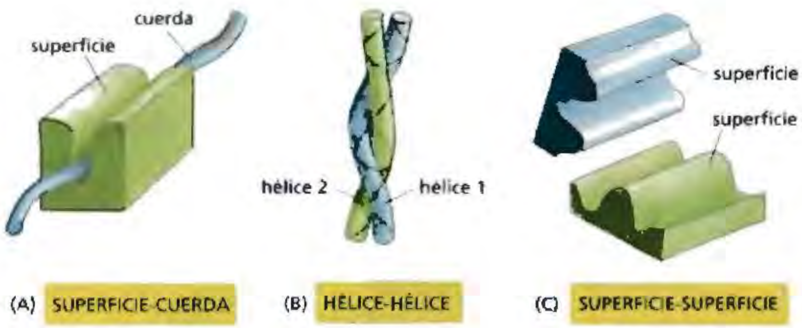


Figura 3–40 Tres sistemas a través de los que se pueden unir dos proteínas entre sí. Sólo se muestran las zonas que interactúan de las dos proteínas. (A) Una superficie rígida de una proteína puede unirse a una larga asa de cadena polipeptídica (una "cuerda") de otra proteína. (B) Dos hélices α pueden unirse entre sí formando una hélice sobreenrollada. (C) A menudo dos superficies rígidas complementarias unen entre sí dos proteínas.

Las proteínas se unen unas a otras a través de diferentes tipos de interfases

Las proteínas pueden unirse entre sí al menos de tres maneras. En muchos casos una porción de la superficie de una proteína entra en contacto con un asa extendida de una cadena polipeptídica (una "cuerda") de otra proteína (**Figura 3–40A**). Las interacciones de este tipo permiten, por ejemplo, que el dominio SH2 reconozca un asa fosforilada de otra proteína, como hemos descrito, y también permite a una determinada proteína quinasa reconocer las proteínas que fosforilará (véase más adelante).

El segundo tipo de interacción entre dos proteínas se forma cuando se unen dos hélices, una de cada proteína, formando una hélice sobreenrollada (Figura 3–40B). Este tipo de interacciones entre proteínas se halla en algunas familias de proteínas reguladoras de genes, como se expone en el Capítulo 7.

Sin embargo, el sistema más común de interacción entre dos proteínas consiste en un acoplamiento preciso entre dos superficies rígidas, una de cada proteína (Figura 3–40C). Las interacciones de este tipo pueden ser muy fuertes, ya que si las superficies se acoplan bien una a otra se puede formar un elevado número de enlaces débiles. Por esta misma razón, estas interacciones superficie-superficie pueden ser extraordinariamente específicas, permitiendo que una proteína seleccione a otra proteína determinada de entre los muchos miles de proteínas que presenta una célula eucariota.

Los lugares de unión de los anticuerpos son especialmente versátiles <GCCG>

Todas las proteínas deben unirse a ligandos particulares para llevar a cabo sus diferentes funciones. La familia de los anticuerpos presenta una notable capacidad de unión selectiva, como se describe en detalle en el Capítulo 25.

Los **anticuerpos**, o inmunoglobulinas, son proteínas producidas por el sistema inmune en respuesta a moléculas extrañas, como las de la superficie de un microorganismo invasor. Cada anticuerpo se une fuertemente a una molécula diana particular de manera muy íntima, inactivándola de forma directa o marcándola para su destrucción. Un anticuerpo reconoce su diana (llamada **antígeno**) con una notable especificidad. Hay, potencialmente, billones de antígenos diferentes con los que los humanos nos podemos encontrar, por lo que hemos de ser capaces de producir billones de anticuerpos diferentes.

Los anticuerpos son moléculas en forma de Y, con dos lugares de unión idénticos, cada uno de los cuales es complementario a una pequeña región de la superficie de la molécula de antígeno. Un examen detallado de los lugares de los anticuerpos que se unen al antígeno revela que están formados por varios bucles de la cadena polipeptídica que sobresalen de los extremos de un par de dominios proteicos yuxtapuestos (**Figura 3–41**). Diferentes anticuerpos generan una enorme diversidad de lugares de unión al antígeno, simplemente cambiando la longitud y la secuencia de aminoácidos de los bucles sin cambiar su estructura.

Este tipo de bucles son ideales para unirse a otras moléculas. Permiten que un gran número de grupos químicos rodee al ligando de manera que la proteína se puede unir a él a través de muchos enlaces débiles. Por esta razón, a menudo forman los lugares de unión al ligando en las proteínas.

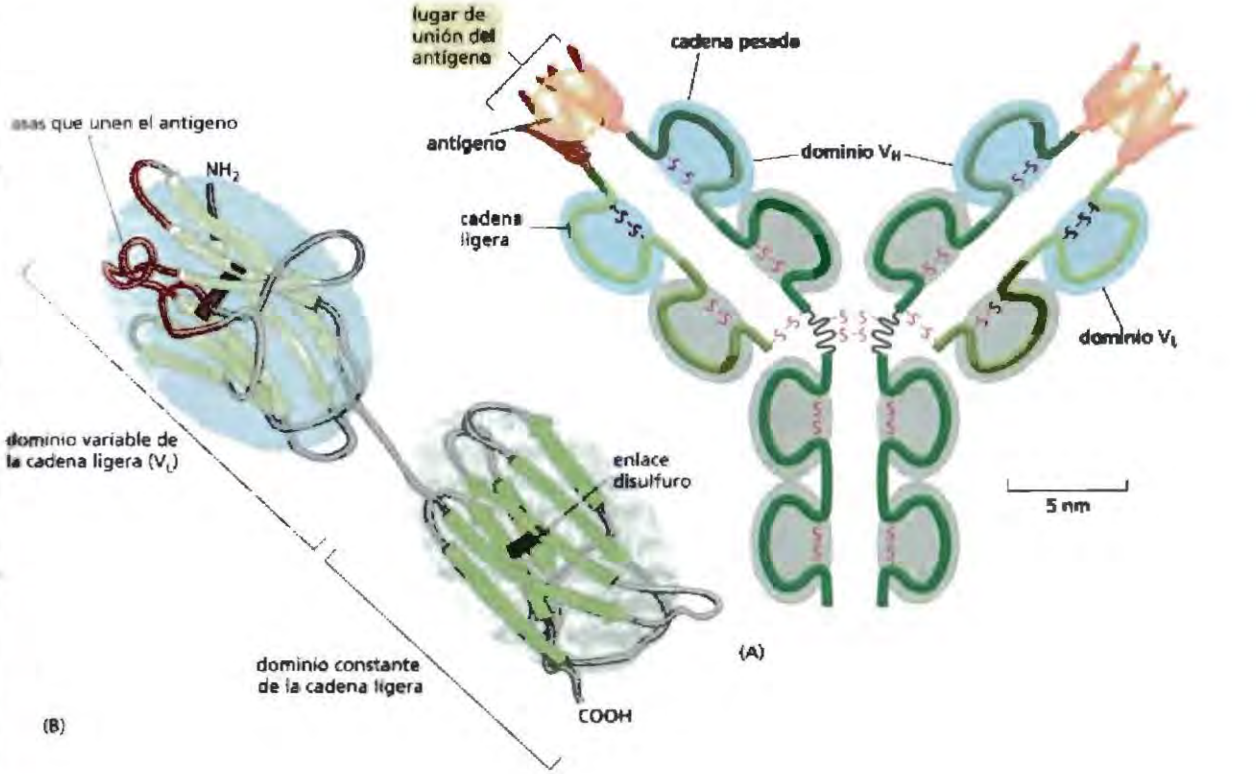


Figura 3–41 **Molécula de anticuerpo.** (A) Una molécula de anticuerpo típica tiene forma de Y, con dos lugares de unión idénticos para su antígeno, uno en cada brazo de la Y. La proteína se compone de cuatro cadenas polipeptídicas (dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras pequeñas idénticas) unidas por enlaces disulfuro. Cada cadena se compone de varios dominios inmunoglobulina diferentes, aquí sombreados tanto en *azul* como en *gris*. El lugar de unión del antígeno se forma donde se juntan el dominio variable de una cadena pesada (V_H, de *heavy*, pesada) y el dominio variable de una cadena ligera (V_L, de *light*, ligera). Estos son los dominios que más difieren en su secuencia y estructura en los diferentes anticuerpos. Cada dominio terminal de los dos brazos de la molécula del anticuerpo forma un bucle que se une con el antígeno. En (B) podemos ver estas estructuras similares a dedos (*rojo*) que forman parte de V_L.

...tante de equilibrio mide la fuerza de unión

...a, las moléculas se encuentran las unas a las otras con mucha frecuencia debido a ...uos movimientos térmicos al azar. Cuando colisionan dos moléculas que tienen ... poco complementarias una de la otra, se forman pocos enlaces no-covalentes ... y las dos moléculas se disocian tan rápidamente como se unieron. En el otro ex... ...ndo se forman muchos enlaces no-covalentes, la asociación puede persistir mu... ...po (**Figura 3–42**). Las interacciones fuertes se dan en las células siempre que una ...lógica requiera que las moléculas permanezcan unidas largo rato –por ejemplo, ... grupo de moléculas de RNA y proteína se unen dando lugar a una estructura sub... ...mo el ribosoma.

...os medir la fuerza con la que se unen dos moléculas cualesquiera. Por ejemplo, ...mos una población de moléculas de anticuerpo idénticas, que repentinamente se ...n ante una población de ligandos que difunden en el fluido que les rodea. A inter... ...uentes, una de las moléculas de ligando colisiona con el lugar de unión de un ...o y forma un complejo ligando-anticuerpo. Así, la población de complejos ligan... ...po irá aumentando, pero no de forma ilimitada: con el tiempo, un segundo pro... ...esivamente cobrando importancia: los complejos ligando-anticuerpo se irán ... debido al movimiento inducido térmicamente. Llegará un momento en que ...población de moléculas de anticuerpo y de ligandos alcanzará un estado estacio... ...uilibrio, en el que el número de uniones (asociación) por segundo será exacta... ...al número de "desuniones" (disociación) (véase también la Figura 2–52).

...de las diversas concentraciones de ligando, anticuerpo y complejos ligando-an... ...n el equilibrio podemos calcular una medida útil –denominada la **constante de ...o (K)**– de la fuerza de la unión (**Figura 3–43A**). La constante de equilibrio de una ...n la que dos moléculas (A y B) se unen entre sí formando un complejo (AB) tiene ...le litros/mol y cuando la concentración del ligando (en litros/mol) alcanza un va... ...gual a $1/K$, la mitad de los lugares de unión estarán ocupados por el ligando. Esta ...de equilibrio es tanto mayor cuanto mayor sea la fuerza de unión, y es una medi... ...de la diferencia de energía libre entre los estados libre y unido (Figura 3–43B y C). ...tra en el ejemplo de la **Figura 3–44**, incluso un cambio de unos cuantos enlaces ...tes puede tener un efecto sorprendente en una interacción de la unión, como se

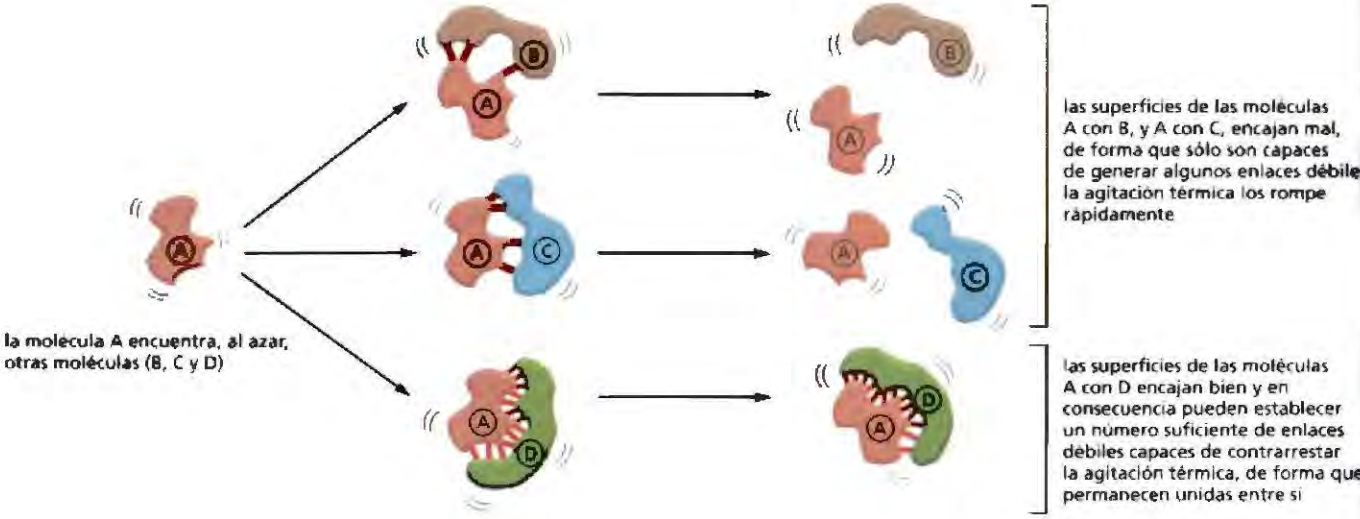


Figura 3–42 De qué forma los enlaces no-covalentes participan en interacciones entre macromoléculas.

muestra en el ejemplo de la **Figura 3–44**. (Nótese que la constante de equilibrio tal como la definimos aquí, también es la constante de asociación o **afinidad** K_a.)

Hemos utilizado el caso de un anticuerpo uniéndose a su ligando para ilustrar el efecto de la fuerza de unión sobre el estado de equilibrio, pero este mismo principio se aplica a cualquier proteína y su ligando. Muchas proteínas son enzimas que, como comentaremos ahora, primero se unen a sus ligandos y luego catalizan la rotura o formación de enlaces covalentes en estas moléculas.

Las enzimas son potentes catalizadores y altamente específicos

Muchas proteínas todo lo que hacen para realizar su función es unirse a otra molécula. Por ejemplo, una molécula de actina sólo tiene que asociarse a otras moléculas de actina para formar un filamento. Sin embargo, para otras proteínas la unión al ligando es simplemente

(A)

1

A B —disociación→ A + B

velocidad de disociación = constante de velocidad de disociación × concentración de AB

velocidad de disociación = k_{off} [AB]

2

A + B —asociación→ A B

velocidad de asociación = constante de velocidad de asociación × concentración de A × concentración de B

velocidad de asociación = k_{on} [A] [B]

3

EN EL EQUILIBRIO:

velocidad de asociación = velocidad de disociación

k_{on} [A] [B] = k_{off} [AB]

$$\frac{[AB]}{[A][B]} = \frac{k_{on}}{k_{off}} = K = \text{constante de equilibrio}$$

(B)

Relación entre las diferencias de energía libre y las constantes de equilibrio (37 °C)

constante de equilibrio $\frac{[AB]}{[A][B]} = K$ (litros/mol)	diferencia de energía libre de AB menos energía libre de A + B (kcal/mol)	diferencia de energía libre de AB menos energía libre de A + B (kJ/mol)
1	0	0
10	−1,4	−5,9
10^2	−2,8	−11,9
10^3	−4,3	−17,8
10^4	−5,7	−23,7
10^5	−7,1	−29,7
10^6	−8,5	−35,6
10^7	−9,9	−41,5
10^8	−11,3	−47,4
10^9	−12,8	−53,4
10^{10}	−14,2	−59,4
10^{11}	−15,6	−65,3

(C)

Aunque julios y kilojulios (1000 julios) son las unidades estándar de energía, los biólogos celulares generalmente se refieren a los valores de energía libre en términos de calorías y kilocalorías.

Una kilocaloría (kcal) es igual a 4,184 kilojulios (kJ).

La relación entre el cambio de energía libre ΔG, y la constante de equilibrio es

$\Delta G = -0{,}00458\ T \log K$

donde ΔG se expresa en kilocalorías y T es la temperatura absoluta, expresada en grados Kelvin (310 K = 37 °C).

Figura 3–43 Energías de unión y constante de equilibrio para una reacción de asociación. (A) El equilibrio entre las moléculas A y B y el complejo AB se mantiene mediante un balance entre las dos reacciones opuestas mostradas en los paneles 1 y 2. Para reaccionar, las moléculas A y B deben colisionar entre sí; entonces su velocidad de asociación es proporcional al producto de sus concentraciones individuales [A] × [B]. (Los corchetes indican concentración.) Como se muestra en el panel 3, la relación entre las constantes de velocidad para las reacciones de asociación y disociación es igual a la constante de equilibrio (*K*) de la reacción. (B) La constante de equilibrio del panel 3 se refiere a la reacción A + B ⇌ AB, y cuanto mayor es su valor, más fuerte es la unión entre A y B. Obsérvese que por cada 1,41 kcal/mol (5,91 kJ/mol) de disminución de energía libre, a 37 °C, la constante de equilibrio se incrementa en un factor de 10.
La constante de equilibrio tiene unidades de litro/mol: para interacciones sencillas de unión, también se llama *constante de afinidad* o *constante de asociación*, indicado como K_a. La recíproca de K_a se llama *constante de disociación*, K_d (con unidades mol/litro.)

[illegible] paso necesario de su función. Este es el caso de una gran clase de proteínas muy [illegible] llamadas **enzimas**. Como se describe en el Capítulo 2, las enzimas son molécu-[illegible] que determinan todas las transformaciones químicas que forman y rompen en-[illegible] lentes en las células. Se unen a uno o más ligandos, llamados **sustratos**, y los [illegible] en uno o más *productos* químicamente modificados, realizando esta operación [illegible] vez a una velocidad admirable. Las enzimas aceleran las reacciones, a menudo [illegible] factor de un millón o más, y no resultan alteradas: actúan como **catalizadores** que [illegible] que las células generen o rompan enlaces covalentes de forma controlada. De he-[illegible] genera y mantiene la célula, haciendo posible la vida, es la catálisis de grupos or-[illegible] de reacciones químicas, realizada por las enzimas.

[illegible] mos agrupar a las enzimas en clases funcionales que realizan reacciones químicas [illegible] (**Tabla 3–1**). Cada tipo de enzima dentro de su clase es altamente específico, cata-[illegible] un solo tipo de reacción. Así, la *hexoquinasa* añade un grupo fosfato a la D-glucosa [illegible] reacciona con el isómero óptico de la D-glucosa, la L-glucosa; la enzima de la coagu-[illegible] la sangre *trombina* corta un tipo de proteína de la sangre entre un residuo particu-[illegible] nina y su glicina adyacente, pero en ningún otro sitio, etc. Como se comentó con [illegible] el Capítulo 2, las enzimas trabajan en equipo, de manera que el producto de una [illegible] convierte en el sustrato de la enzima siguiente. El resultado de ello es una elabo-[illegible] de vías metabólicas que suministran energía a la célula y generan la gran cantidad [illegible] las, grandes y pequeñas, que necesita la célula (véase la Figura 2–35).

Consideremos una célula eucariota con 1000 moléculas de A y 1000 de moléculas de B. La concentración de ambas será aproximadamente 10^{-9} M.

Si la constante de equilibrio (K) para A + B ⇌ AB es 10^{10}, entonces en el equilibrio habrá

270	270	730
moléculas de A	moléculas de B	moléculas de AB

Si la constante de equilibrio es algo más débil a 10^8, lo cual representa una pérdida de 2,8 kcal/mol de energía de unión respecto al ejemplo anterior, es decir 2-3 enlaces de hidrógeno menos, entonces habrá

915	915	85
moléculas de A	moléculas de B	moléculas de AB

Figura 3–44 Pequeños cambios en el número de enlaces débiles pueden tener efectos drásticos en una interacción de unión. Este ejemplo ilustra el efecto radical de la presencia o ausencia de unos cuantos enlaces no-covalentes débiles en el contexto biológico.

[illegible] mer paso de la catálisis enzimática es la unión del sustrato

[illegible] proteína que cataliza una reacción química (una enzima), la unión del sustrato a la [illegible] es una condición esencial. En el caso más sencillo, si denominamos a la enzima por [illegible] ato por S y el producto por P, la reacción básica es E + S → ES → EP → E + P. A par-[illegible] proceso de reacciones, podemos ver que existe un límite a la cantidad de sustrato [illegible] molécula de enzima puede procesar en un tiempo dado. Un incremento de la con-[illegible] de sustrato también incrementa la velocidad a la que se forma el producto hasta [illegible] un valor máximo (**Figura 3–45**). En este punto, la molécula de enzima se halla sa-[illegible] sustrato y la velocidad de reacción (denominada V_{max}) depende únicamente de la [illegible] a la que sea procesada la molécula de sustrato. Esta velocidad dividida por la con-[illegible] de la enzima constituye el *número de recambio*. A menudo el número de recam-[illegible] aproximadamente 1000 moléculas de sustrato procesadas cada segundo por cada [illegible] de enzima, pero los valores conocidos van desde 1 a 10.000.

[illegible] 1 Algunos tipos comunes de enzimas

[illegible]	REACCIÓN CATALIZADA
[illegible]	término general de las enzimas que catalizan una reacción de rotura hidrolítica; nucleasas y proteasas son los nombres específicos para las subclases de estas enzimas.
[illegible]	rompen ácidos nucleicos mediante la hidrólisis de los enlaces entre nucleótidos.
[illegible]	rompen proteínas mediante la hidrólisis de los enlaces entre aminoácidos.
[illegible]	sintetizan moléculas en reacciones anabólicas mediante la condensación de dos moléculas menores.
[illegible]	catalizan la redistribución de enlaces dentro de una misma molécula.
[illegible]	catalizan reacciones de polimerización como la síntesis de DNA y RNA.
[illegible]	catalizan la adición de grupos fosfato a las moléculas. Las proteínas quinasa son un importante grupo de quinasas que añaden grupos fosfato a las proteínas.
[illegible]	catalizan la eliminación hidrolítica de un grupo fosfato de una molécula.
[illegible] tasas	nombre general de las enzimas que catalizan reacciones en las que una molécula se oxida mientras otra se reduce. Las enzimas de este tipo a menudo se llaman *oxidasas*, *reductasas* y *deshidrogenasas*.
[illegible]	hidrolizan ATP. Muchas proteínas que desempeñan papeles muy diversos tienen una actividad ATPasa que les proporciona energía como parte de su función, por ejemplo, proteínas motoras como la *miosina* y proteínas de transporte de membrana como la *bomba de sodio-potasio*.

[illegible] de las enzimas típicamente acaban en "asa", con la excepción de algunas enzimas como la pepsina, la tripsina, la trombina, la lisozima y algunas [illegible] fueron descubiertas y denominadas antes de que se aceptara generalmente esta convención, al final del siglo XIX. En la mayoría de los casos, el nombre [illegible] una enzima indica el sustrato y la naturaleza de la reacción catalizada. Por ejemplo, la citrato sintasa cataliza la síntesis de citrato mediante la adición [illegible] CoA al oxalacetato.

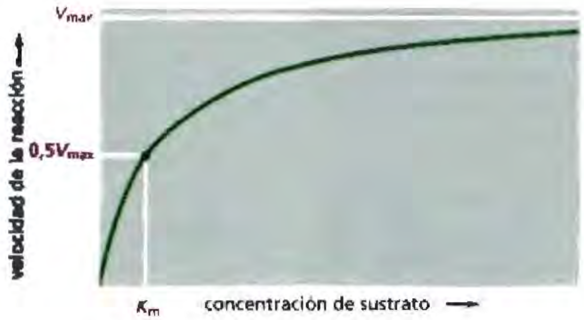


Figura 3–45 Cinética enzimática. La velocidad de una reacción enzimática (*V*) aumenta cuando aumenta la concentración del sustrato, hasta alcanzar un valor máximo (V_{max}). En este punto, todos los posibles lugares de unión al sustrato de las moléculas enzimáticas están ocupados, y la velocidad de la reacción está limitada por la velocidad del proceso de catálisis sobre la superficie de la enzima. Para la mayoría de las enzimas la concentración de sustrato (K_m) a la que la velocidad es igual a la mitad de la velocidad máxima (*punto negro*) constituye una medida de la fuerza con que la enzima se une al sustrato; cuanto mayor es el valor de la K_m, menor es la fuerza de unión.

El otro parámetro cinético utilizado con frecuencia para caracterizar a una enzima es su K_m, que es la concentración de sustrato que permite alcanzar la mitad de la velocidad máxima de la reacción (0,5 V_{max}) (Figura 3–45). Una K_m *baja* significa que la enzima alcanza su máxima velocidad catalítica a una *baja concentración* del sustrato y, por lo general, indica que la enzima se une a su sustrato muy fuertemente, mientras que un valor de K_m *alto* corresponde a una unión débil. Los métodos utilizados para caracterizar las enzimas de esta manera se explican en el **Panel 3–3** (pp. 162–163).

Las enzimas aceleran las reacciones estabilizando determinados estados de transición

Las enzimas consiguen que las reacciones químicas se produzcan a velocidades extremadamente altas –mucho más que a través de cualquier catálisis sintética. Esta eficiencia puede ser atribuida a varios factores. En primer lugar, la enzima incrementa la concentración local de las moléculas de sustrato en el lugar catalítico manteniendo los átomos adecuados en una orientación correcta para la reacción que se producirá a continuación. Sin embargo, lo más importante es que una parte de la energía de fijación contribuye directamente a la catálisis. Antes de formar los productos finales de la reacción, las moléculas del sustrato pasan a través de una serie de formas intermedias de geometría y distribución electrónica alteradas. La energía libre requerida para alcanzar el **estado de transición** más inestable es la llamada *energía de activación* para la reacción, y es el principal determinante de la velocidad de la reacción. Las enzimas presentan mayor afinidad por estos estados de transición de los sustratos que por sus formas estables. Esta fuerte interacción disminuye en gran medida las energías de los estados de transición, por lo que la enzima acelera enormemente una reacción determinada al disminuir la energía de activación requerida (**Figura 3–46**).

Mediante la síntesis intencionada de anticuerpos que actúan como enzimas, podemos demostrar que al estabilizar un estado de transición se incrementa mucho la velocidad de la reacción. Consideremos por ejemplo la hidrólisis de un enlace amida, que es similar al enlace peptídico que une aminoácidos adyacentes en las proteínas. En una solución acuosa un enlace amida se hidroliza muy lentamente mediante el mecanismo que se ilustra en la **Figura 3–47**A. En el compuesto intermedio central, o estado de transición, el carbono carbonilo se halla unido a cuatro átomos situados en los vértices de un tetraedro. Un anticuerpo monoclonal que se una fuertemente a un análogo estable de este *compuesto intermedio tetraédrico*, muy inestable, actúa como una enzima (Figura 3–47B). Este *anticuerpo catalítico* se une y estabiliza el compuesto intermedio tetraédrico, incrementando así más de 10.000 veces la velocidad de hidrólisis espontánea del enlace amida.



Figura 3–46 Las enzimas aceleran las reacciones químicas al disminuir la energía de activación. A menudo tanto las reacciones no catalizadas (A) como las catalizadas por una enzima (B) pueden producirse a través de diversos estados de transición. El estado de transición de mayor energía (S^T y ES^T) es el que determina la energía de activación y limita la velocidad de la reacción. (S = sustrato; P = producto de la reacción; ES = complejo enzima-sustrato; EP = complejo enzima-producto.)

Las enzimas pueden utilizar simultáneamente catálisis ácida y básica

La **Figura 3–48** compara la velocidad de reacción espontánea y la velocidad catalizada enzimáticamente para cinco enzimas. Se observan tasas de aceleración de entre 10^9 y 10^{23}. Las enzimas son claramente mejores catalizadores que los anticuerpos catalíticos. Además de unirse fuertemente al estado de transición, el lugar activo de una enzima contiene átomos situados en el espacio de forma precisa que aceleran la reacción alterando la distribución de los electrones de los átomos involucrados en la formación y la rotura de los enlaces covalentes. Los enlaces peptídicos, por ejemplo, pueden ser hidrolizados en ausencia de una enzima

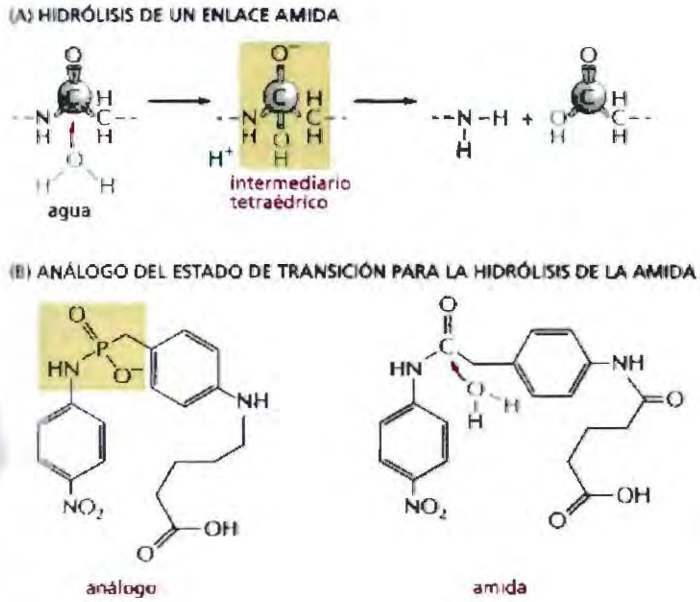


Figura 3–47 Anticuerpos catalíticos. La estabilización de un estado de transición por un anticuerpo, genera una enzima. (A) La reacción de la hidrólisis de un enlace amida se produce a través de un intermediario tetraédrico, que es el estado de transición de alta energía de la reacción. (B) La molécula mostrada a la izquierda se unió covalentemente a una proteína y se utilizó como antígeno para generar un anticuerpo que resultó unirse fuertemente a la región de la molécula señalada en *amarillo*. Este anticuerpo también se une fuertemente al estado de transición en (A), por lo que actúa como una enzima que cataliza de forma eficiente la hidrólisis del enlace amida de la molécula que se muestra a la derecha.

...do un polipéptido a una base fuerte o a un ácido fuerte, tal como se ilustra en la ...49. Sin embargo, las enzimas son únicas en hacer posible la catálisis ácida y básica ...amente, ya que la estructura fundamental de la proteína une los residuos ácidos y ... impide que se combinen unos con otros (como ocurriría si estuvieran en solución) ...49D).

...ión entre una enzima y su sustrato debe ser muy precisa. Un pequeño cambio ...do mediante ingeniería genética en el lugar activo de una enzima puede tener con... extraordinarias. Por ejemplo, al reemplazar un ácido glutámico por un ácido as... una enzima, se desplaza la posición del ion carboxilato catalítico alrededor de 1 Å ...damente el radio de un átomo de hidrógeno); este desplazamiento es suficiente ...ir la actividad de la enzima más de mil veces.

La lisozima ilustra cómo funciona una enzima <AGCA>

...strar cómo las enzimas catalizan las reacciones químicas, examinaremos una en... actúa como un antibiótico natural en la clara de huevo, la saliva, las lágrimas y ...ciones. La **lisozima** cataliza la rotura de las cadenas de polisacárido de las paredes ... de las bacterias. La célula bacteriana se halla bajo presión debido a las fuerzas os... por lo que la rotura, aunque sólo sea de un pequeño número de cadenas de polisa... hace que la pared celular se rompa y que la bacteria reviente. La lisozima es una ... relativamente pequeña y estable que puede ser aislada con facilidad en grandes ... Por estas razones, ha sido ampliamente estudiada y fue la primera enzima cuya ... fue descrita a nivel atómico mediante la cristalografía de rayos X.



Figura 3–48 Incrementos de velocidad causados por cinco enzimas diferentes. (Adaptado de A. Radzicka y R. Wolfenden, *Science* 267:90-93, 1995. Con la autorización de AAAS.)

¿POR QUÉ ANALIZAR LA CINÉTICA DE LAS ENZIMAS?

Las enzimas son los catalizadores más selectivos y potentes conocidos. La comprensión de sus mecanismos detallados ofrece una herramienta crítica para el descubrimiento de nuevos fármacos para la síntesis industrial a gran escala de productos químicos, y para apreciar las propiedades químicas de las células y de los organismos. Un estudio detallado de las velocidades de las reacciones químicas que son catalizadas por enzimas purificadas –más concretamente, cómo varían estas velocidades con los cambios en condiciones tales como concentración de sustrato, productos, inhibidores y ligandos reguladores– permite a los bioquímicos imaginarse cómo funciona exactamente cada enzima. Por ejemplo, fue de esta manera como se descifraron las reacciones de producción de ATP en la glucólisis mostrada previamente en la Figura 2-72 permitiéndonos apreciar la lógica que sigue esta vía enzimática crítica.

Este panel nos introduce en el importante campo de la cinética enzimática, que ha sido indispensable para deducir muchos de los conocimientos detallados que tenemos de la química celular.

CINÉTICA ENZIMÁTICA DEL ESTADO ESTACIONARIO

Muchas enzimas tienen un solo sustrato, al que se unen y procesan produciendo productos de acuerdo con el esquema esbozado en la Figura 3-50A. En este caso, la reacción se escribe como

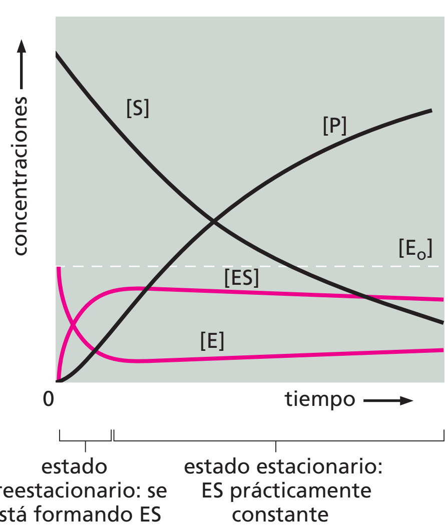
$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_{cat}} E + P$$

Aquí hemos asumido que la reacción inversa, en la que E + P se recombinan formando EP y después ES, se produce tan poco que la podemos ignorar. En este caso, podemos expresar la velocidad de la reacción –conocida como V, como

$$V = k_{cat}\,[ES]$$

donde [ES] es la concentración del complejo enzima-sustrato, y k_{cat} es el número de recambio, una constante de velocidad que es igual al número de moléculas de sustrato procesadas por la molécula de enzima cada segundo.

¿Pero cómo se relaciona el valor de [ES] con las concentraciones que conocemos directamente, que son la concentración total de enzima, $[E_o]$, y la concentración del sustrato, [S]? Cuando el sustrato y la enzima se mezclan, la concentración de [ES] crece rápidamente desde cero hasta un llamado estado estacionario, como se ilustra en la gráfica.



En este estado estacionario, [ES] es prácticamente constante, de forma que

$$\underset{k_{-1}\,[ES] + k_{cat}\,[ES]}{\text{velocidad de rotura de ES}} = \underset{k_1\,[E][S]}{\text{velocidad de formación}}$$

o bien, dado que la concentración de enzima libre, [E], es igual a $[E_o] - [ES]$,

$$[ES] = \left(\frac{k_1}{k_{-1} + k_{cat}}\right)[E][S] = \left(\frac{k_1}{k_{-1} + k_{cat}}\right)\left([E_o] - [ES]\right)[S]$$

Reordenando, y definiendo la constante K_m como

$$\frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$$

tenemos

$$[ES] = \frac{[E_o][S]}{K_m + [S]}$$

o bien, recordando que $V = k_{cat}\,[ES]$, obtenemos la famosa ecuación de Michaelis-Menten

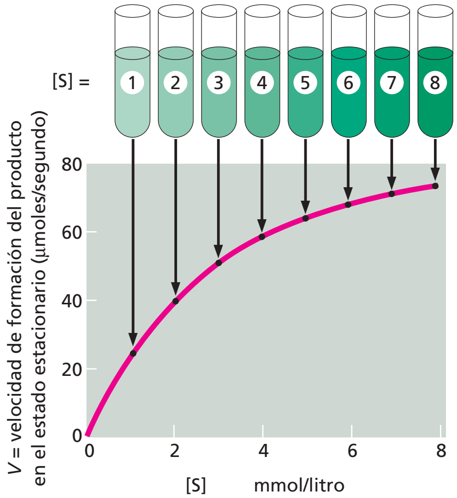
$$V = \frac{k_{cat}\,[E_o][S]}{K_m + [S]}$$

Si aumentamos la [S] lo suficiente, conseguiremos que esencialmente toda la enzima esté unida al sustrato en el estado estacionario; en este punto, se alcanzará la velocidad máxima de la reacción, V_{max}, cuando $V = V_{max} = k_{cat}\,[E_o]$. Entonces, es conveniente reescribir la ecuación de Michaelis-Menten como

$$V = \frac{V_{max}\,[S]}{K_m + [S]}$$

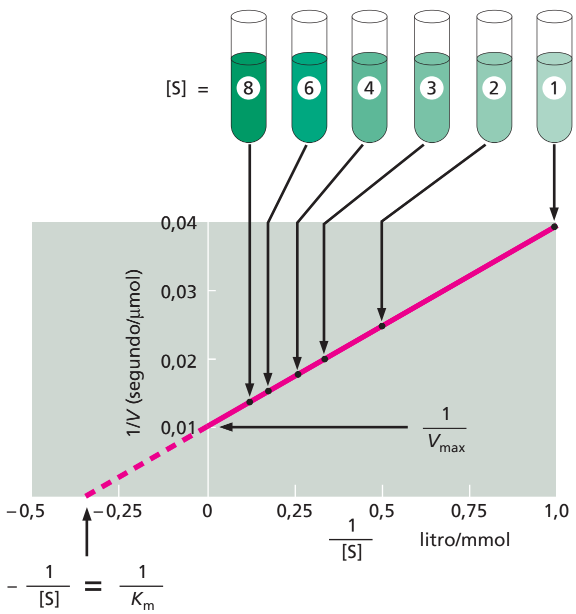
REPRESENTACIÓN DOBLE RECÍPROCA

Abajo se muestra una representación típica de la V respecto a [S] para una enzima que siga la cinética de Michaelis-Menten. En esta representación no se deduce de forma inmediata ni el valor de V_{max} ni el de K_m.



Para obtener V_{max} y K_m a partir de estos datos, se suele utilizar una representación doble recíproca, reordenando la ecuación de Michaelis-Menten, de modo que puede representarse $1/V$ respecto a $1/[S]$.

$$1/V = \left(\frac{K_m}{V_{max}}\right)\left(\frac{1}{[S]}\right) + 1/V_{max}$$



SIGNIFICADO DE K_m, k_{cat} y k_{cat}/K_m

Como se describió en el texto, K_m es una medida aproximada de la afinidad de la enzima por el sustrato: numéricamente es igual a la concentración de [S] a $V = 0{,}5\ V_{max}$. En general, un valor bajo de K_m significa una unión fuerte al sustrato. De hecho, en el caso en que k_{cat} sea mucho más pequeña que k_{-1}, K_m será igual a K_d, la constante de disociación para la unión del sustrato a la enzima ($K_d = 1/K_a$).

Hemos visto que k_{cat} es el número de recambio para la enzima. A concentraciones muy bajas de sustrato, donde $[S] << K_m$, la mayoría de la enzima se encuentra libre. Así podemos pensar que $[E] = [E_o]$; entonces, la ecuación de Michaelis-Menten se convierte en $V = k_{cat}/K_m\ [E][S]$. En consecuencia, la relación k_{cat}/K_m para una misma enzima con diferentes sustratos, o para dos enzimas con sus diferentes sustratos, es ampliamente utilizada como medida de eficiencia enzimática.

La comparación de k_{cat}/K_m para una misma enzima con diferentes sustratos, o para dos enzimas con sus diferentes sustratos, es ampliamente utilizada como medida de eficiencia enzimática.

Para simplificar, en este panel hemos descrito enzimas que tienen un solo sustrato, como la enzima lisozima tratada en el texto (véase p. 164). La mayoría de enzimas tienen dos sustratos, uno de los cuales a menudo es una molécula activadora –como el NADH o el ATP.

Un análisis similar, pero más complejo, se utiliza para determinar la cinética de estas enzimas, que nos revela el orden de la unión de los sustratos y la presencia de intermediarios covalentes a lo largo de las vías.

ALGUNAS ENZIMAS ESTÁN LIMITADAS POR LA DIFUSIÓN

A continuación se muestran los valores de k_{cat}, K_m y k_{cat}/K_m para algunas enzimas determinadas:

enzima	sustrato	k_{cat} (seg^{-1})	K_m (M)	k_{cat}/K_m ($seg^{-1}M^{-1}$)
acetilcolinesterasa	acetilcolina	$1{,}4 \times 10^4$	9×10^{-5}	$1{,}6 \times 10^8$
catalasa	H_2O_2	4×10^7	1	4×10^7
fumarasa	fumarato	8×10^2	5×10^{-6}	$1{,}6 \times 10^8$

Puesto que para poder reaccionar la enzima y su sustrato deben colisionar, el valor máximo posible de k_{cat}/K_m está limitado por las velocidades de colisión. Si cada colisión forma un complejo enzima-sustrato, por la teoría de la difusión puede calcularse que k_{cat}/K_m estará entre 10^8 y $10^9\ seg^{-1}M^{-1}$, en el caso de que todos los pasos siguientes se realicen inmediatamente. Se puede afirmar, por lo tanto, que la acetilcolinesterasa y la fumarasa son "enzimas perfectas", ya que cada una de ellas ha evolucionado hacia el punto en que prácticamente en cada colisión transforman su sustrato en producto.

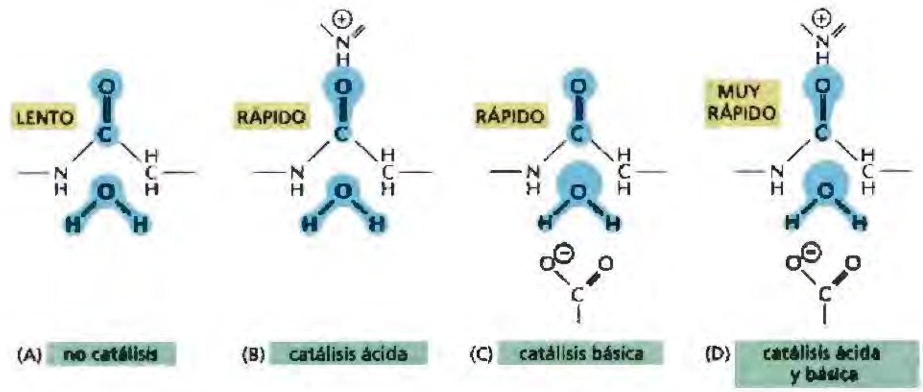


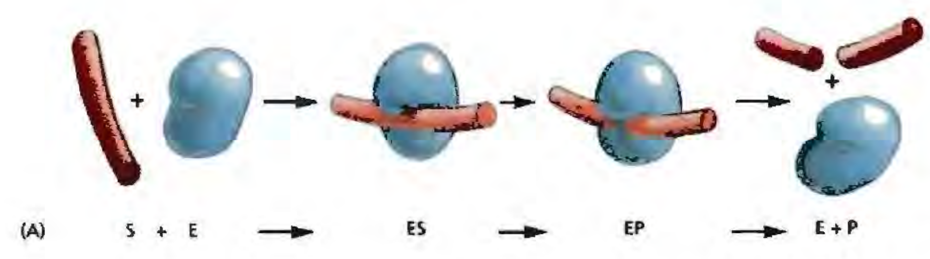
Figura 3–49 Catálisis ácida y catálisis básica. (A) El inicio de la reacción no catalizada que se presenta en la Figura 3-47A, utiliza el sombreado en *azul* como indicador de la distribución electrónica del agua y de los enlaces carbonilo. (B) Un ácido tiende a dar un protón (H^+) a otros átomos. En combinación con el oxígeno del carbonilo, un ácido hace que los electrones tiendan a separarse del carbono carbonilo, haciendo que este átomo atraiga con mucha más fuerza el oxígeno electronegativo de la molécula de agua que ataca el enlace. (C) Una base tiende a captar H^+. En combinación con un hidrógeno de la molécula de agua atacante, una base hace que los electrones se desplacen hacia el oxígeno de la molécula de agua para constituir un grupo más reactivo del carbono carbonilo. (D) Al presentar una disposición adecuada de átomos en su superficie, una enzima puede realizar una catálisis ácida y básica simultáneamente.

La reacción que cataliza la lisozima es una hidrólisis: añade una molécula de agua a un enlace sencillo entre dos grupos de azúcar adyacentes de la cadena del polisacárido, causando así la rotura del enlace (véase la Figura 2–19). La reacción es energéticamente favorable porque la energía libre de la cadena de polisacárido cortada es inferior a la de la cadena intacta. Sin embargo, el polisacárido puro puede permanecer en agua durante años sin hidrolizarse de manera detectable. Este fenómeno se debe a que la reacción tiene una barrera energética, como se describe en el Capítulo 2 (véase la Figura 2–46). Una molécula de agua sólo puede romper el enlace que une dos azúcares al colisionar con él, si el polisacárido distorsionado presenta una forma particular –el estado de transición– en la cual los átomos vecinos al enlace tengan una geometría y una distribución electrónica alteradas. Debido a esta distorsión, las colisiones al azar deben aportar una elevada energía de activación para que la reacción tenga lugar. En solución acuosa a temperatura ambiente, la energía de las colisiones casi nunca excede la energía de activación. Por lo tanto, la hidrólisis transcurre muy lentamente o no tiene lugar en absoluto.

Esta situación cambia drásticamente cuando el polisacárido se une a la lisozima. Dado que su sustrato es un polímero, el lugar activo de la lisozima es un largo canal que puede contener un fragmento de seis unidades de azúcar del polisacárido al mismo tiempo. Inmediatamente después de que el polisacárido se una a la enzima, formando el complejo enzima-sustrato, la lisozima corta al polisacárido mediante la adición de una molécula de agua a uno de sus enlaces azúcar–azúcar. Las cadenas que constituyen el producto de la reacción son rápidamente liberadas y permiten que la enzima inicie un nuevo ciclo de reacción (**Figura 3–50**).

La naturaleza química de la unión de la lisozima a su sustrato es la misma que la de la unión del anticuerpo –la formación de muchos enlaces no-covalentes. Sin embargo, la lisozima sostiene al polisacárido que es su sustrato, en una orientación espacial particular, de manera que uno de los dos azúcares implicados en el enlace que se romperá está distorsio-

Figura 3–50 La reacción catalizada por la lisozima. (A) La enzima lisozima (E) cataliza la rotura de una cadena de polisacárido, que es su sustrato (S). Primero la enzima se une a la cadena formando un complejo enzima-sustrato (ES) y después cataliza la rotura de un enlace covalente específico del esqueleto del polisacárido, formando un complejo enzima-producto (EP) que rápidamente se disocia. La liberación de la cadena cortada (el producto P) deja a la enzima libre para actuar sobre otra molécula de sustrato. (B) Modelo espacial compacto de la molécula de la lisozima unida a una cadena de polisacárido de poca longitud antes de cortarla. (B, cortesía de Richard J. Feldmann.)





...cto de su conformación normal, la más estable. El enlace que se va a romper se ...a de dos aminoácidos de cadenas laterales ácidas del lugar activo (un ácido glu... ...n ácido aspártico).

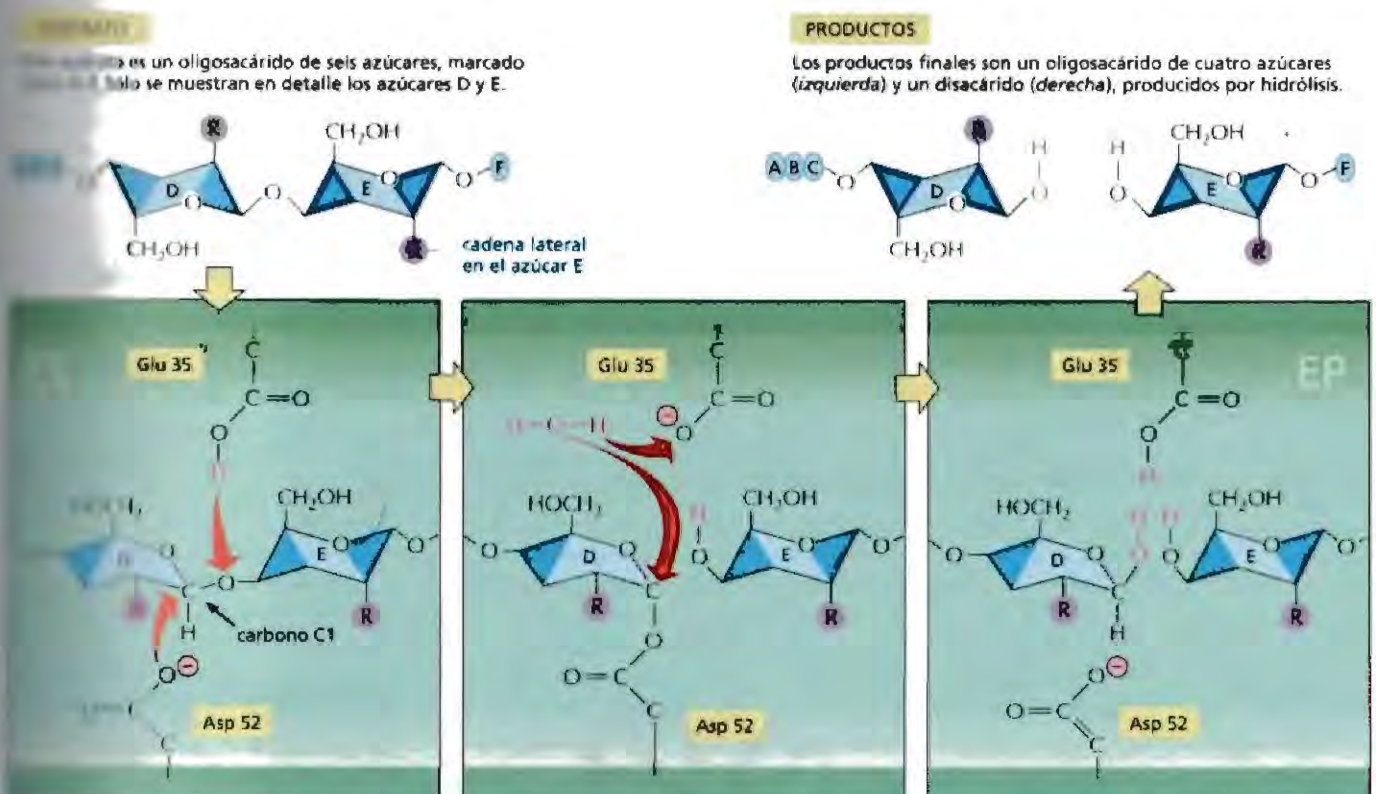
...n el microambiente del lugar activo de la lisozima se generan unas condiciones ...n de forma considerable la energía de activación necesaria para que pueda tener ...drólisis. La **Figura 3–51** muestra las etapas propuestas, en 1967, de esta reacción ...enzimáticamente.

1. ...nzima provoca una tensión en el sustrato al que está unido, de manera que ahora ...ma de uno de los azúcares recuerda mucho más a la del estado de transición de ...energía que se forma a lo largo de la reacción.
2. ...dena lateral ácida de un ácido aspártico reacciona con el átomo de carbono C1 ...úcar que está distursionado; el ácido glutámico da su protón al oxígeno, que une ...azúcar a su vecino.
3. ...lado por la carga negativa del ácido glutámico, una molécula de agua reacciona ...el átomo de carbono 1, desplazando la cadena lateral del ácido aspártico y com...ando el proceso de hidrólisis.

...cción química global, desde la unión inicial del polisacárido sobre la superficie ...na hasta la liberación final de las cadenas unidas, tiene lugar varios millones de ve... ...pidamente que en ausencia de enzima.

...enzimas utilizan mecanismos similares para disminuir la energía de activación y ...reacciones que catalizan. En las reacciones en que participan dos o más reacti... ...r activo actúa como un molde que acerca los sustratos entre sí, en una orientación ...ara que entre ellos pueda tener lugar la reacción (**Figura 3–52**A). Como ya hemos ...caso de la lisozima, el lugar activo de una enzima contiene algunos átomos dis... ...tal manera que, mediante la utilización de grupos cargados, alteran la distribu... ...ectrones del sustrato y aceleran la reacción (Figura 3–52B). Además, cuando un

Figura 3–51 Acontecimientos que se producen en el lugar activo de la lisozima. <TGGT> Los dibujos superiores de la derecha y de la izquierda muestran el sustrato y los productos libres, respectivamente, mientras que los otros tres dibujos muestran la secuencia de acontecimientos que ocurren en el lugar activo de la enzima. Nótese el cambio de conformación del azúcar D que se produce en el complejo enzima-sustrato; este cambio de la conformación estabiliza el estado de transición ion semejante a oxocarbonio necesario para la formación e hidrólisis del intermediario covalente que se muestra en el panel central. También es posible que en la etapa 2 se forme un ion intermediario carbonio, ya que el intermediario covalente mostrado en el panel central únicamente se ha detectado con un sustrato sintético. (Véase D.J. Vocadlo et al., *Nature* 412:835-838, 2001.)



...complejo enzima-sustrato (ES), la enzima ...azúcar D hacia una conformación tensa, ...35 de la lisozima colocado de forma ...como un ácido que ataca el enlace ...azúcar adyacente mediante la donación ...protón (H⁺) al azúcar E; el Asp 52 está ...para atacar el átomo de carbono C1.

El Asp 52 forma un enlace covalente entre la enzima y el átomo de carbono C1 del azúcar D. Entonces, el Glu 35 polariza la molécula de agua (*rojo*), de manera que el oxígeno está en disposición de atacar al átomo de carbono C1 y desplazar al Asp 52.

La reacción con una molécula de agua (*rojo*) completa la hidrólisis y la enzima retorna a su estado inicial, formándose el complejo enzima-producto (EP).



Figura 3-52 Algunas estrategias generales de la catálisis enzimática. (A) Manteniendo los sustratos juntos en un alineamiento preciso. (B) Estabilización por cargas de intermediarios de la reacción. (C) Aplicar fuerzas que deforman los enlaces en el sustrato e incrementan así la velocidad de una reacción en particular.

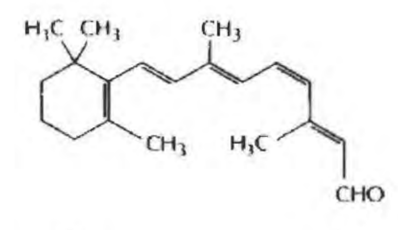
sustrato se une a una enzima, generalmente los enlaces del sustrato se curvan, cambiando la forma del sustrato. Estos cambios junto con fuerzas mecánicas conducen al sustrato a su estado de transición (Figura 3-52C). Por último, como la lisozima, muchas enzimas participan íntimamente en la reacción que catalizan, estableciendo enlaces covalentes transitorios entre el sustrato y una cadena lateral de la enzima. En los pasos siguientes de la reacción, la cadena lateral recupera su estado original, de manera que después de la reacción la enzima se recupera intacta (véase la Figura 2-72).

Moléculas pequeñas se unen íntimamente a las proteínas y aportan funciones extra

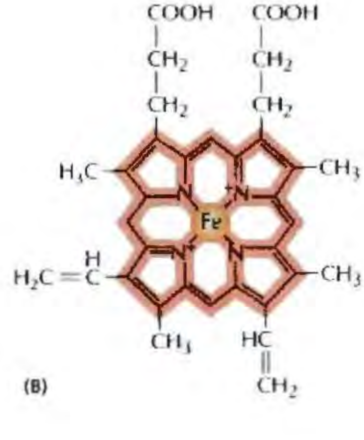
Hemos destacado la versatilidad de las proteínas como cadenas de aminoácidos que realizan diferentes funciones, pero en muchos casos los aminoácidos no son suficientes por sí mismos. De la misma manera que los humanos utilizamos herramientas para aumentar y ampliar las capacidades de nuestras manos, a menudo las proteínas utilizan pequeñas moléculas no proteicas para realizar funciones que serían difíciles o imposibles de realizar utilizando sólo los aminoácidos. Así, la proteína receptora de señales *rodopsina*, que es fabricada por las células fotorreceptoras de la retina, detecta la luz mediante una molécula pequeña, el *retinal*, insertada en la proteína (**Figura 3-53**A). El retinal cambia de forma cuando absorbe un fotón de luz y este cambio es amplificado por la proteína, desencadenando una cascada de reacciones enzimáticas que concluye enviando una señal eléctrica al cerebro.

Otro ejemplo de una proteína que contiene un elemento no proteico, es la hemoglobina (véase la Figura 3-22). Una molécula de hemoglobina contiene cuatro grupos *hemo*, moléculas en forma de anillo cada una de las cuales contiene un átomo central de hierro (Figura 3-53B). El hemo confiere a la hemoglobina (y a la sangre) su color rojo. El átomo de hierro se une de forma reversible al oxígeno, de forma que el hemo capacita a la hemoglobina para capturar el oxígeno en los pulmones y liberarlo en los tejidos.

Algunas de estas moléculas pequeñas están unidas covalentemente a sus proteínas –la unión es permanente– de forma que estas moléculas pasan a formar parte integral de la molécula proteica. En el Capítulo 10 veremos que las proteínas a menudo están ancladas a las membranas celulares mediante moléculas lipídicas unidas covalentemente. A menudo, tan-



(A)



(B)

Figura 3-53 El retinal y el hemo. (A) Estructura del retinal, la molécula sensible a la luz unida a la rodopsina en el ojo. (B) Estructura del grupo hemo. El anillo de carbonos del hemo está en *rojo* y el átomo de hierro en su centro en *naranja*. Un grupo hemo está fuertemente unido a cada una de las cuatro cadenas polipeptídicas en la hemoglobina, la proteína transportadora de oxígeno cuya estructura se muestra en la Figura 3-22.

[illegible] Muchas vitaminas proporcionan coenzimas cruciales para las células humanas

[illegible]	COENZIMA	REACCIONES CATALIZADAS POR ENZIMAS QUE REQUIEREN ESTAS COENZIMAS
[illegible]amina B_1)	tiamina pirofosfato	activación y transferencia de aldehídos
[illegible] (vitamina B_2)	FADH	oxidación-reducción
[illegible]	NADH, NADPH	oxidación-reducción
[illegible]toténico	coenzima A	activación y transferencia de grupos acilo
[illegible]	piridoxal fosfato	activación de aminoácidos; también glucógeno fosforilasa
[illegible]	biotina	activación y transferencia de CO_2
[illegible]	lipoamida	activación de grupos acilo; oxidación-reducción
[illegible]	tetrahidrofolato	activación y transferencia de grupos carbono sencillos
[illegible]	coenzimas cobalamina	isomerización y transferencia de grupos metilo

[illegible]oteínas de membrana expuestas en la superficie de la célula, como las proteínas [illegible]las al exterior de la célula, están modificadas mediante la adición covalente de azú[illegible] oligosacáridos.

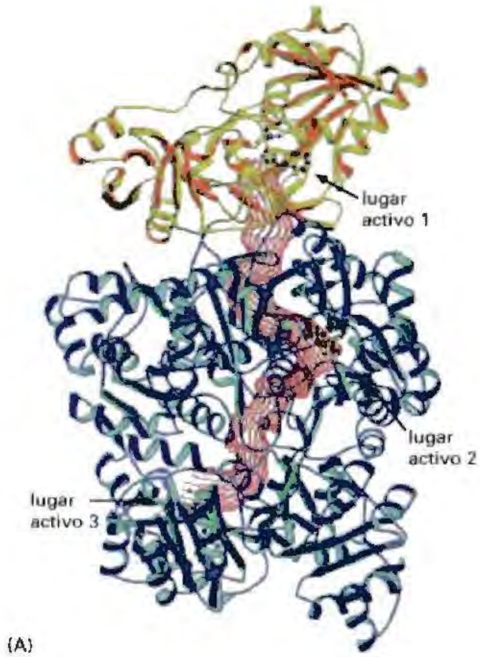
[illegible] frecuencia las enzimas tienen una pequeña molécula o un átomo metálico estre[illegible] asociados con su lugar activo que les asiste en sus funciones catalíticas. Por ejem[illegible]*rboxipeptidasa*, una enzima que corta cadenas polipeptídicas, contiene un ion de [illegible]do con fuerza a su lugar activo. Durante la rotura de un enlace peptídico mediado [illegible]rboxipeptidasa, el ion de zinc forma un enlace transitorio con uno de los átomos [illegible]ato, colaborando así en la reacción de hidrólisis. En otras enzimas, quien tiene un [illegible]ejante a éste es una pequeña molécula orgánica. A menudo a estas moléculas se [illegible] coenzimas. Un ejemplo es la *biotina*, que se halla en enzimas que transfieren gru[illegible]ilo (–COO^-) de una molécula a otra (véase la Figura 2–63). La biotina participa en [illegible]cciones formando un enlace covalente transitorio con el grupo –COO^- que va a ser [illegible]do, resultando más adecuada para esta función que cualquiera de los aminoácidos [illegible]an parte de las proteínas. Los humanos no podemos sintetizarla, por lo que hemos [illegible]orarla en pequeñas cantidades en la dieta, de forma que la biotina es una *vitami*[illegible] [illegible]as otras coenzimas se producen a partir de vitaminas (**Tabla 3–2**). Para fabricar al[illegible] estas moléculas también necesitamos otras vitaminas, que son componentes [illegible]s de nuestras proteínas: la vitamina A, por ejemplo, es necesaria en la dieta para [illegible]ricar el retinal, el elemento sensible a la luz de la rodopsina.

[illegible]neles moleculares canalizan los sustratos a las enzimas [illegible]enen muchos lugares catalíticos

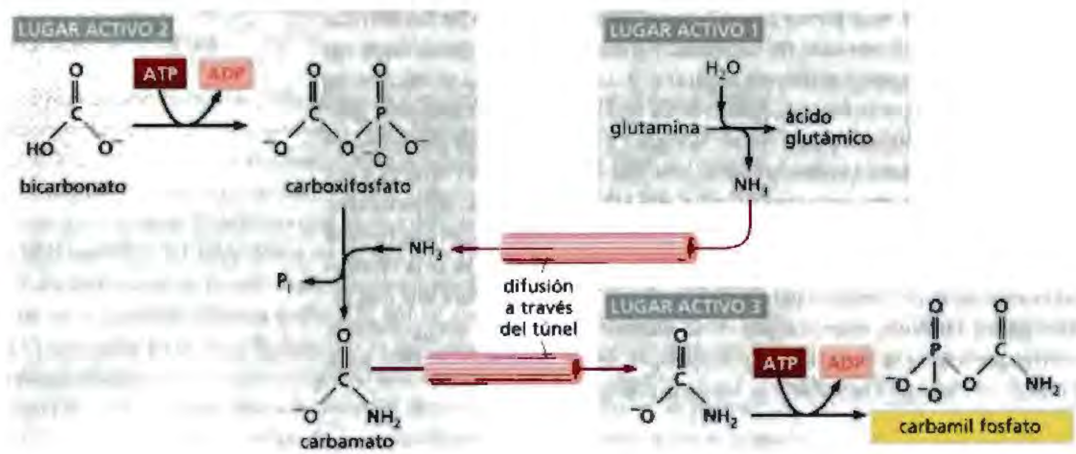
[illegible] las reacciones químicas catalizadas por enzimas en las células producen inter[illegible] que también son muy inestables o que si son liberados al citosol pueden difundir [illegible] de la membrana plasmática. Para preservar estos intermediarios, las enzimas han [illegible]do *túneles moleculares* que conectan dos o más sitios activos, permitiendo que el [illegible]ario sea procesado rápidamente hasta el producto final –sin abandonar la enzima.

[illegible]deremos, por ejemplo, la enzima carbamil fosfato sintetasa, que utiliza amoníaco [illegible] la glutamina y dos moléculas de ATP para transformar el bicarbonato (HCO_3^-) a [illegible]fato –un importante intermediario de varias vías metabólicas (**Figura 3–54**). Es[illegible] contiene tres lugares activos separados, que están interconectados mediante un [illegible] reacción comienza en el lugar activo 2, localizado a la mitad del túnel, donde se [illegible]P para fosforilar (añadir un grupo fosfato) un bicarbonato y formar un carboxifos[illegible] hecho dispara la hidrólisis de la glutamina a ácido glutámico en el lugar activo 1, [illegible] amoníaco al interior del túnel. Este amoníaco difunde de inmediato a través [illegible] parte del túnel hasta el lugar activo 2, donde reacciona con el carboxifosfato y [illegible]rbamato. Este inestable intermediario difunde a través de la segunda mitad del [illegible] el lugar activo 3, donde es fosforilado por ATP hasta el producto final, el carbamil [illegible]

[illegible] enzimas, bien caracterizadas, contienen túneles similares a éste. El amoníaco, un [illegible]ario que difundiría muy fácilmente y se escaparía de la célula, es el sustrato que [illegible]ntemente se canaliza en los ejemplos que conocemos.



(A)



(B)

Figura 3–54 El efecto túnel sobre los intermediarios de la reacción de la enzima carbamil fosfato sintetasa. (A) Esquema de la estructura de la enzima, en el que se ha utilizado una cinta *roja* para destacar el túnel situado en el interior de la proteína, que conecta sus tres lugares activos. Las subunidades pequeña y grande de esta enzima dimérica están coloreadas de *amarillo* y *azul* respectivamente. (B) Esquema de la reacción. Como se indica, el lugar activo 1 produce amoníaco, que difunde a través del túnel hasta el lugar activo 2, donde se combina con un carboxifosfato formando carbamato. Este intermediario altamente inestable, difunde a través del túnel hasta el lugar activo 3, donde es fosforilado por ATP produciendo el producto final, el carbamil fosfato. (A, modificado a partir de F.M. Raushel, J.B. Thoden y H.M. Holden, *Acc. Chem. Res.* 36:539-548, 2003. Con autorización de la American Chemical Society.)

Los complejos multienzimáticos ayudan a incrementar la velocidad del metabolismo celular

La eficiencia de las enzimas acelerando las reacciones químicas es crucial para el mantenimiento de la vida. En efecto, las células tienen que luchar contra procesos inevitables de degeneración que –si se desatienden– empujan a las macromoléculas hacia el desorden. Si las velocidades de las reacciones deseables no fueran superiores a las de las reacciones opuestas, la célula moriría pronto. Midiendo la velocidad de utilización del ATP podemos tener una idea aproximada de la velocidad a la que se produce el metabolismo celular. Una célula típica de mamífero recambia (es decir, hidroliza y restaura) todas sus reservas de ATP cada 1 o 2 minutos. Para cada célula esta renovación representa la utilización de unas 10^7 moléculas de ATP por segundo (y para el cuerpo humano, aproximadamente un gramo de ATP cada minuto).

La velocidad de las reacciones celulares es elevada gracias a que la catálisis enzimática es tan efectiva. De hecho, muchas enzimas importantes trabajan de una forma tan eficiente que es imposible mejorarla. En estos casos, el factor limitante de la velocidad de la reacción no es la velocidad intrínseca de la acción enzimática, sino la frecuencia a la que la enzima interacciona con su sustrato. De una reacción como ésta se dice que está *limitada por la difusión* (véase el Panel 3–3, pp. 162–163).

Si una reacción enzimática está limitada por la difusión, su velocidad depende de las concentraciones de la enzima y del sustrato. Por consiguiente, para que una secuencia de

e produzca con gran rapidez tiene que existir una elevada concentración de ca- ›s intermediarios metabólicos y de cada una de las enzimas que intervienen en ›bargo, dado el enorme número de reacciones diferentes que se desarrollan en existen límites a las concentraciones que se pueden alcanzar. De hecho, la ma- etabolitos se hallan presentes a concentraciones micromolares (10^{-6} M) y la las enzimas a concentraciones mucho menores. Entonces, ¿cómo es posible elocidades metabólicas muy elevadas?

uesta radica en la organización espacial de los componentes celulares. La célula mentar las velocidades de reacción sin aumentar la concentración de los sustra- do las diferentes enzimas implicadas en una secuencia de reacciones y forman- complejo proteico denominado *complejo multienzimático* (**Figura 3–55**). De esta producto de la enzima A es transferido directamente a la enzima B, y así sucesi- on lo que las velocidades de difusión no limitan la velocidad de reacción ni si- do la concentración de sustrato en toda la célula es muy baja. Entonces, no es que estos complejos multienzimáticos sean muy frecuentes e intervengan en aspectos del metabolismo –incluyendo los procesos genéticos centrales del A, y en la síntesis de proteínas. De hecho en las células eucariotas hay muy po- que difundan libremente en solución; por el contrario, la mayoría de las enzi- haber desarrollado zonas de unión que les permiten concentrarse con otras función relacionada en determinadas regiones de la célula, para incrementar ad y la eficiencia de las reacciones que catalizan.

las células eucariotas disponen de otro sistema para incrementar la velocidad ones metabólicas: utilizar su sistema de membranas intracelulares. Estas mem- den aislar ciertos sustratos y las enzimas que actúan sobre ellas, dentro del mis- timiento rodeado de membrana, como el retículo endoplasmático o el núcleo por ejemplo, el compartimiento ocupa un total de un 10% del volumen celular, ación de los compuestos que reaccionan, dentro de este compartimiento, sería yor que en una célula similar que tuviera el mismo número de moléculas de en- ustratos pero que no estuviese compartimentada. Así, las reacciones limitadas dad de difusión pueden incrementar su velocidad en este mismo factor.

regula las actividades catalíticas de sus enzimas

iva contiene millares de enzimas, muchas de las cuales intervienen al mismo el mismo reducido volumen del citosol. Debido a su acción catalítica, las enzi- n una compleja red de vías metabólicas, cada una de las cuales está compuesta de reacciones químicas en las que el producto de una enzima se convierte en el a enzima siguiente. En este laberinto de vías, hay muchos puntos de ramifica- en los que hay enzimas diferentes que compiten por el mismo sustrato. El sis- complejo (véase la Figura 2–88) que se requieren elaborados controles para do y a qué velocidad tiene lugar cada reacción.

ación ocurre a muchos niveles. Por un lado, la célula controla cuántas molécu- enzima fabrica, mediante la regulación de la expresión del gen que codifica esta no se comenta en el Capítulo 7). La célula también controla las actividades enzi- nando grupos de enzimas en compartimientos subcelulares particulares, deli- r distintas membranas (como se describe en los Capítulos 12 y 13). Como se

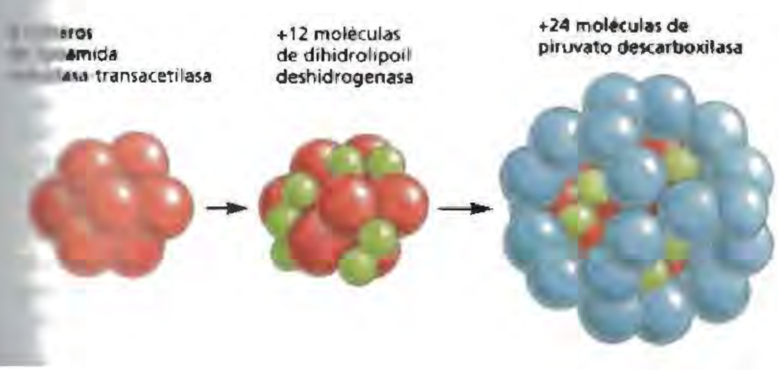


Figura 3–55 Estructura de la piruvato deshidrogenasa. Este complejo enzimático cataliza la transformación del piruvato a acetil CoA, como parte de la vía de oxidación de azúcares a CO_2 y H_2O (véase Figura 2-79). Se trata de un ejemplo de un gran complejo multienzimático en el que los intermediarios de la reacción pasan directamente de una enzima a otra.

explicará más adelante en este capítulo, frecuentemente las enzimas son modificadas covalentemente para controlar su actividad. La velocidad de degradación proteica por proteólisis dirigida representa otro importante mecanismo de regulación (véase p. 395). Pero el sistema más general de ajustar la velocidad de una reacción consiste en cambiar reversible y directamente su actividad en respuesta a moléculas pequeñas con las que interactúa.

El tipo más común de control tiene lugar mediante la unión a la enzima de una molécula diferente al sustrato, en un lugar regulador especial diferente del lugar activo; esta unión altera la velocidad a la que la enzima transforma sus sustratos en productos. Por ejemplo, en la **retroalimentación negativa**, un producto producido más tarde a través de una vía metabólica inhibe una enzima que actúa al principio de esta misma vía metabólica. De esta manera, en cuanto se empiezan a acumular grandes cantidades del producto final, este producto se une a la enzima, reduciendo su capacidad catalítica y limitando la entrada de sustratos en la vía (**Figura 3–56**). En los puntos en los que las vías se ramifican o se entrecruzan, suele haber varios puntos de control mediados por los diferentes productos finales, cada uno de los cuales regula su propio proceso de síntesis (**Figura 3–57**). La inhibición por retroalimentación negativa actúa de manera casi instantánea y es rápidamente reversible cuando los niveles del producto disminuyen.

La inhibición por retroalimentación negativa es una *regulación negativa*: impide que una enzima pueda actuar. Las enzimas también están sujetas a una *regulación positiva*, mediante la cual la actividad de la enzima no es inhibida sino que es estimulada por una molécula reguladora. La regulación positiva tiene lugar cuando un producto de una de las redes del laberinto metabólico estimula la actividad de una enzima de otra vía. Como ejemplo puede citarse la acumulación de ADP, que activa varias enzimas implicadas en la oxidación de las moléculas de azúcar, estimulando a la célula a que transforme más ADP en ATP.

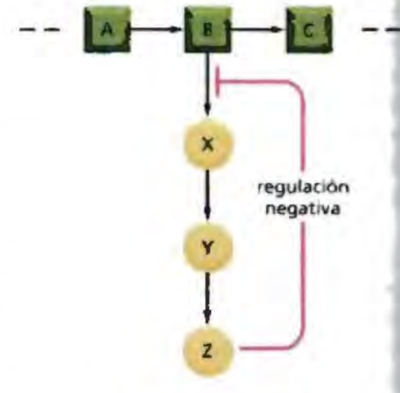


Figura 3–56 Inhibición mediante retroalimentación de una vía biosintética sencilla. El producto final Z inhibe la primera enzima de la vía, que es exclusiva de su síntesis, y de este modo controla sus propios niveles en la célula. Éste es un ejemplo de regulación negativa.

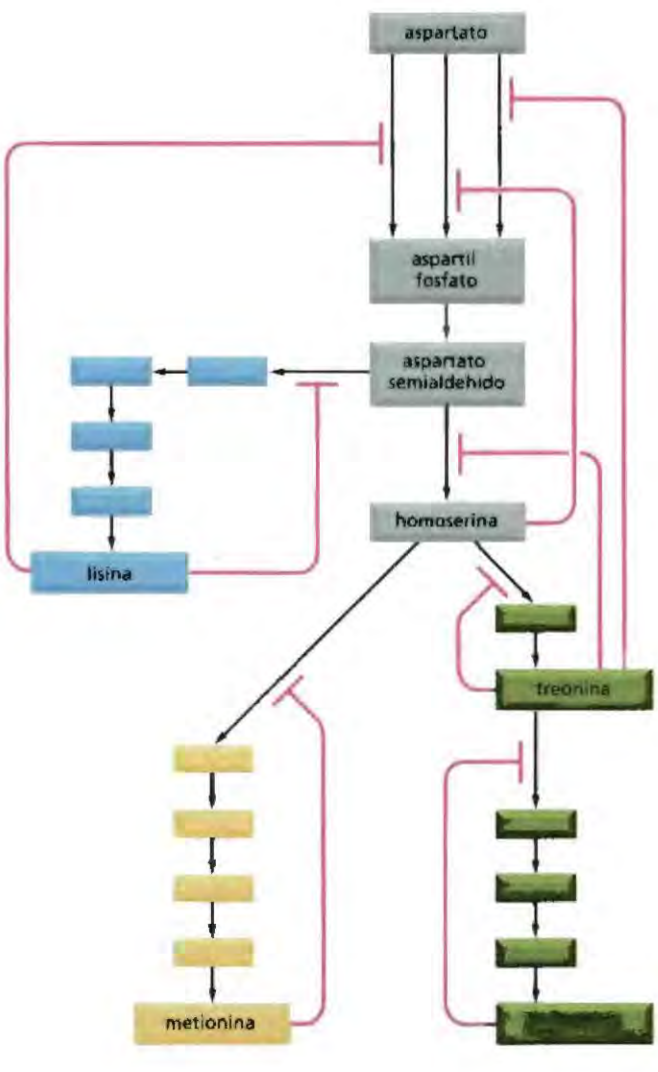


Figura 3–57 Inhibición mediante retroalimentación negativa múltiple. En este ejemplo, que muestra las vías biosintéticas de cuatro aminoácidos diferentes en bacterias, las *flechas rojas* indican los puntos en los cuales los productos inhiben, por retroalimentación, las enzimas. Cada aminoácido controla la primera enzima específica de su propia síntesis, con lo que controla sus propios niveles y evita la producción inútil, incluso peligrosa, de intermediarios. Los productos también pueden inhibir separadamente el conjunto inicial de reacciones comunes para todas las vías; en este caso, la reacción inicial está catalizada por tres enzimas diferentes, cada una de las cuales está inhibida por un producto diferente.

Las enzimas alostéricas tienen dos o más lugares de unión que interactúan entre sí

[illegible]rística sorprendente de la retroalimentación tanto negativa como positiva es que [illegible] la molécula reguladora tiene una forma totalmente diferente a la del sustrato de la [illegible]. Por eso a este efecto de la proteína se le llama *alostería* (del griego *allos*, "otro" y *ste*[illegible] "sólido" o "tridimensional"). A medida que los biólogos fueron conociendo mejor la re[illegible] por retroalimentación negativa, reconocieron que las enzimas que lo presentaban [illegible] tener en su superficie al menos dos lugares de unión diferentes –el **lugar activo**, [illegible]ce los sustratos, y un **lugar de regulación** que reconoce la molécula reguladora. [illegible] lugares deben "comunicarse" entre sí de alguna forma, de manera que los sucesos [illegible] del lugar activo tienen que estar influidos por la unión de la molécula reguladora [illegible] de unión, estando ambos lugares separados sobre la superficie de la proteína.

[illegible]mente se sabe que la interacción entre estos lugares físicamente separados sobre [illegible] de proteína depende de un *cambio conformacional* de la proteína: la unión del [illegible] uno de los lugares causa una transición desde una determinada forma plegada a [illegible]mente diferente. Por ejemplo, en la retroalimentación negativa, la unión de un in[illegible] un lugar de la proteína hace que ésta adquiera una conformación que incapacita [illegible]tivo -localizado en otra zona de la proteína.

[illegible] que la mayoría de las proteínas son alostéricas. Pueden adoptar dos o más con[illegible] ligeramente diferentes y, mediante la transición de una a otra, su actividad pue[illegible] alterada. Esto es cierto no sólo para las enzimas sino también para muchas otras [illegible] -incluyendo receptores, proteínas estructurales y proteínas motoras. En todos los [illegible]ulación alostérica, cada conformación de la proteína tiene unos contornos de su [illegible] algo diferentes y los lugares de unión de la proteína cambian cuando la proteína [illegible] forma. Además, como se describe más adelante, cada ligando estabilizará la con[illegible] que lo une con más fuerza y así, a concentraciones suficientemente elevadas, ten[illegible] la proteína "salte" hacia la conformación que prefiera el ligando.

Dos ligandos cuyos lugares de unión están acoplados pueden afectar recíprocamente la unión el uno del otro

[illegible] de la unión del ligando a una proteína siguen un principio químico fundamen[illegible]do como **conexión**. Supongamos, por ejemplo, que una proteína que une glucosa [illegible]ne otra molécula, X, en un lugar distante de la superficie de la proteína. Si el cam[illegible]macional inducido por la unión de la glucosa también hace cambiar de forma el [illegible]ión de X, se dice que los lugares de unión de X y de la glucosa están *acoplados*. [illegible]s ligandos se unen con más afinidad a la *misma* conformación de una proteína [illegible], consideraciones termodinámicas básicas aseguran que cada ligando incrementa [illegible] de la proteína por el otro ligando. Así, si el cambio en la proteína de la **Figura 3–58** [illegible]nformación cerrada que une mejor la glucosa también provoca que el lugar de [illegible] se ajuste mejor a X, entonces la proteína unirá más fuertemente la glucosa cuan[illegible] presente que cuando esté ausente.

[illegible] contrario, si dos ligandos se unen a conformaciones *diferentes* de una proteína [illegible], la conexión será negativa. En este caso, la unión del primer ligando dificultará la [illegible] segundo ligando. Así, si el cambio de conformación inducido por la glucosa redu[illegible]dad de la proteína por la molécula X, la unión de X disminuirá la afinidad de la pro[illegible] la glucosa (**Figura 3–59**). La relación de conexión es cuantitativamente recíproca [illegible], por ejemplo, que si la glucosa tiene un gran efecto sobre la unión de X, X también [illegible] gran efecto sobre la unión de la glucosa.

[illegible]laciones mostradas esquemáticamente en las Figuras 3–58 y 3–59 se pueden apli[illegible]s las proteínas y están en la base de la biología celular. Parecen tan obvias que no [illegible] importancia. Pero el descubrimiento de las relaciones entre enzimas la década de [illegible]do por un extenso análisis de los mecanismos de la alostería en proteínas a prin[illegible] la década de 1960, tuvo un efecto revolucionario sobre el conocimiento de la bio[illegible] estos ejemplos la molécula X se une a un lugar de la enzima que es diferente del [illegible]de ocurre la catálisis, por lo que no tiene por qué existir ninguna relación química [illegible]cosa o con cualquier otro ligando que se una a sitio activo. Además, como acaba[illegible], en el caso de enzimas que estén reguladas de esta manera, la molécula X puede

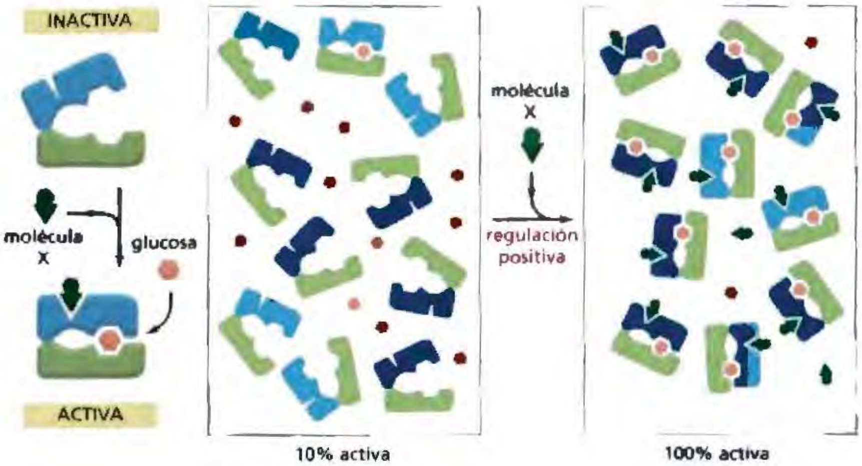


Figura 3–58 Regulación positiva causada por el acoplamiento conformacional entre dos lugares de unión distantes. En este ejemplo tanto la glucosa como la molécula X se unen mejor a la conformación *cerrada* de una proteína con dos dominios. Tanto la glucosa como la sustancia X empujan la proteína hacia su conformación cerrada, por lo que cada ligando colabora con el otro para que se una a la proteína. Así pues, se dice que la glucosa y la molécula X se unen de forma *cooperativa* a la proteína.

activar (regulación positiva) o inactivar (regulación negativa) la enzima. Por mecanismos de este tipo, las **proteínas alostéricas** pueden actuar como interruptores generales que permiten, en principio, que una molécula de una célula afecte el destino de otra molécula.

Los agregados proteicos simétricos producen transiciones alostéricas cooperativas

Una enzima que esté regulada por retroalimentación negativa, y que conste de una sola subunidad, puede disminuir desde el 90% hasta el 10% de actividad en respuesta a un incremento de unas 100 veces de la concentración del ligando inhibidor (**Figura 3–60**, *línea roja*). Aparentemente, las respuestas de este tipo no son bastante marcadas para conseguir una regulación celular óptima. La mayoría de enzimas que se activan o inhiben por la unión de un ligando consisten en agregados simétricos de subunidades idénticas. Mediante esta disposición, la unión de una molécula de ligando al lugar de unión de una de las subunidades puede provocar una alteración alostérica en esta subunidad que puede ayudar a que las subunidades vecinas también se unan al mismo ligando. Como resultado de esta *transición alostérica cooperativa*, una variación relativamente pequeña de la concentración del ligando en la célula puede hacer pasar todo el agregado de una conformación casi completamente activa a otra casi completamente inactiva (o viceversa) (véase Figura 3–60, *línea azul*).

Los principios que participan en una transición cooperativa del "todo o nada" son los mismos para todas las proteínas, sean o no enzimas. Pero quizás son más fáciles de visualizar en el caso de una enzima formada por un dímero simétrico. En el ejemplo mostrado en la **Figura 3–61**, la primera molécula del ligando inhibidor se une con una gran dificultad ya que su unión rompe una interacción energéticamente favorable entre los dos monómeros idénticos del dímero. Sin embargo, ahora la segunda molécula de ligando inhibidor se une

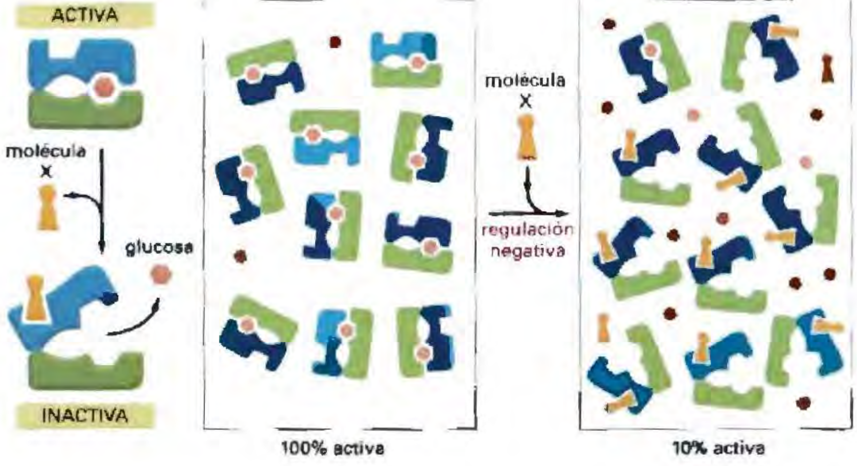


Figura 3–59 Regulación negativa generada por el acoplamiento conformacional entre dos lugares de unión distantes entre sí. El diseño de esta figura es el mismo que el descrito previamente, pero aquí la molécula X se une preferentemente a la conformación *abierta*, mientras que la glucosa se une preferentemente a la conformación *cerrada*. Así, la glucosa y la molécula X empujan la proteína hacia conformaciones opuestas (abierta y cerrada respectivamente), por lo que la presencia de uno de los ligandos interfiere con la unión del otro.

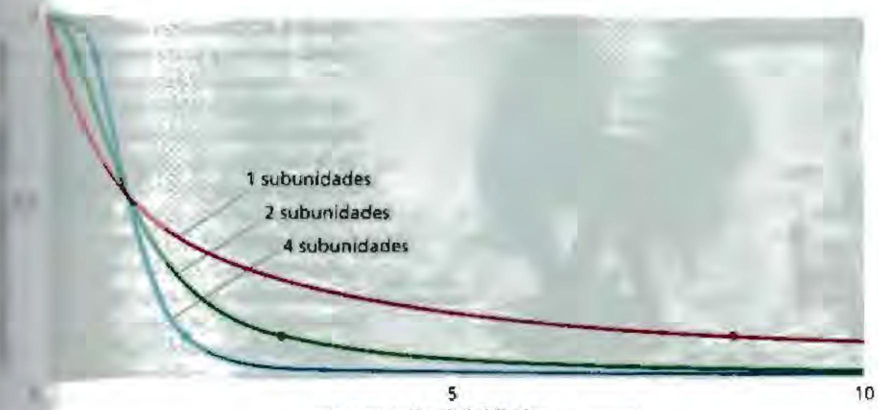


Figura 3–60 Relación entre actividad enzimática y concentración de ligando inhibidor, para enzimas de una sola subunidad y enzimas alostéricas formadas por diferente número de subunidades. En el caso de una enzima con una sola subunidad (*línea roja*), la disminución desde el 90% hasta el 10% de actividad (indicada por los dos puntos en la curva) requiere un incremento en la concentración de inhibidor de unas 100 veces. La actividad enzimática se calcula a partir de la relación de equilibrio sencillo $K=[IP]/[I][P]$, donde P es la proteína activa, I es el inhibidor e IP es la proteína inactiva unida al inhibidor. Ésta es la curva que se aplicaría a cualquier unión sencilla entre dos moléculas A y B. Por el contrario, una enzima alostérica formada por varias subunidades puede responder a variaciones de la concentración de inhibidor de una manera semejante a un interruptor: la respuesta escalonada que se produce se debe a que el ligando se une a la proteína de una forma cooperativa, como se explica en la Figura 3-61. La *línea verde* representa el resultado teórico esperado en el caso de unión cooperativa de dos moléculas de inhibidor a una enzima alostérica con 2 subunidades, y la *línea azul* el resultado teórico esperado de una enzima con 4 subunidades. Como indican los dos puntos en cada una de las curvas, las enzimas más complejas caen del 90% al 10% de actividad con incrementos menores de la concentración de inhibidor que la enzima compuesta por una sola subunidad.

...más facilidad ya que su unión recupera los contactos monómero a monómero ...mente favorables del dímero simétrico (lo cual inactiva por completo la enzima).

...alternativa a este modelo de *adaptación inducida* para la transición alostérica ...a, podemos suponer que una enzima simétrica como ésta sólo presenta dos con... posibles, correspondientes a las estructuras de la "enzima activa" y de la "enzi...a" de la Figura 3–61. En este supuesto, la unión del ligando perturba un equilibrio ...nada" entre estos dos estados, cambiando así la proporción de moléculas activas. ...delos representan conceptos ciertos y útiles; se trata del segundo modelo que ...mos a continuación.

La transición alostérica de la aspartato transcarbamilasa se conoce a nivel atómico

...enzimas utilizadas en los primeros estudios de regulación alostérica es la aspar...arbamilasa de *E. coli*. Cataliza la importante reacción carbamilfosfato + aspar... carbamilaspartato, que inicia la síntesis del anillo pirimidíoico de los nucleótidos ...Uno de los productos finales de esta vía, el citidín trifosfato (CTP), se une a la enzi...ndola cuando la concentración de CTP es elevada.

...artato transcarbamilasa es un gran complejo formado por seis subunidades re... y seis subunidades catalíticas. Las subunidades catalíticas forman dos trímeros, ...de los cuales está dispuesto como un triángulo equilátero y ambos se mantienen ...o a otro a través de tres dímeros reguladores, que hacen de puente entre ellos. La ...completa puede sufrir transiciones alostéricas del "todo o nada" entre dos confor... los estados T ("tenso") y R ("relajado") (**Figura 3–62**).

...ión de los sustratos (carbamilfosfato y aspartato) a los trímeros catalíticos condu...artato transcarbamilasa a su estado R, catalíticamente activo, del que se disocian ...las reguladoras de CTP. Contrariamente, la unión de CTP a los dímeros regulado... la enzima hacia su estado T, catalíticamente inactivo, del cual se disocian los ...Este "estira y afloja" entre el CTP y los sustratos es idéntico, en principio, al descri...ente en la Figura 3–59 para el caso de una proteína alostérica más sencilla. Sin ...aquí el estira y afloja ocurre en una molécula simétrica con muchos lugares de



Figura 3–61 Transición cooperativa alostérica en una enzima compuesta por dos subunidades idénticas. Este esquema ilustra de qué forma la conformación de una subunidad puede afectar a la de sus vecinas. La unión de una sola molécula de un ligando inhibidor (*amarillo*) a una subunidad de la enzima se produce con dificultad debido a que modifica la conformación de esta subunidad, alterando la simetría de la enzima. Sin embargo, cuando se ha completado este cambio conformacional, la energía obtenida al recuperar la estructura simétrica entre las dos subunidades hace que la segunda conformación una el ligando mucho más fácilmente, sufriendo el mismo cambio conformacional que la otra subunidad. La unión de la primera molécula de ligando incrementa la afinidad de la otra subunidad por la misma molécula de ligando, por lo que la respuesta de la enzima a variaciones de la concentración del ligando es mucho más marcada que la de una enzima monomérica (véase la Figura 3-60).

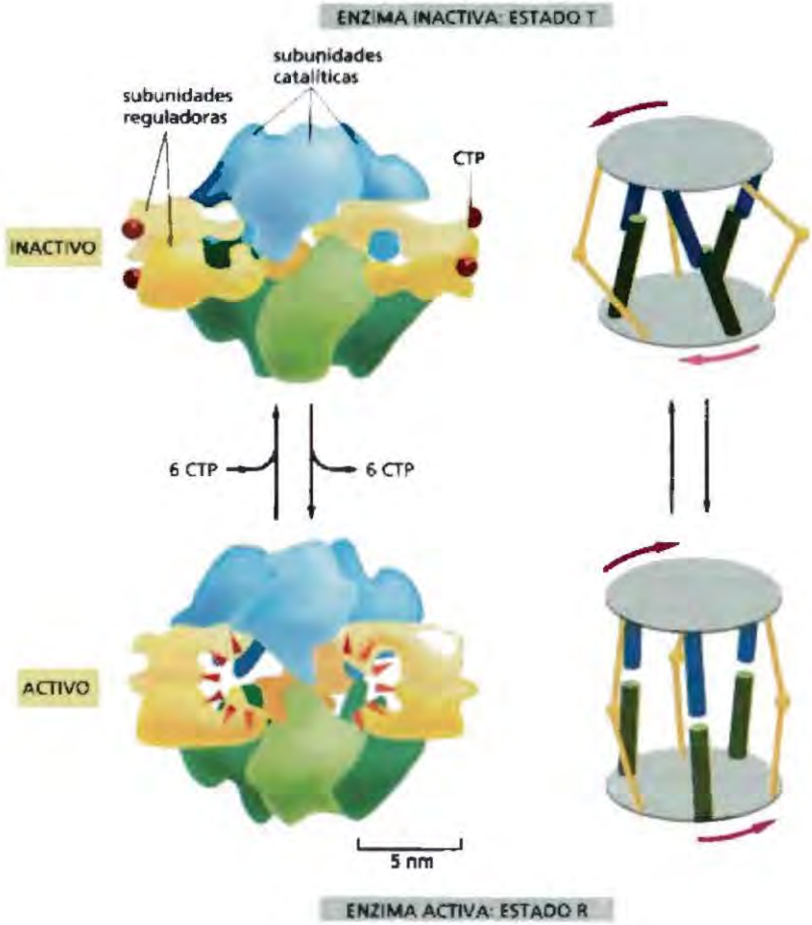


Figura 3–62 Transición entre los estados R y T en la enzima aspartato transcarbamilasa. <CTAA> La enzima está compuesta por un complejo de seis subunidades catalíticas y seis subunidades reguladoras. Las estructuras de la forma inactiva (estado T) y de la forma activa (estado R) se han determinado por cristalografía de rayos X. La enzima se inhibe por retroalimentación cuando aumenta la concentración de CTP. Cada una de las subunidades reguladoras puede unir una molécula de CTP, el cual es uno de los productos finales de la vía. Mediante esta regulación por retroalimentación negativa se impide que la vía produzca más cantidad de CTP del que necesita la célula. (Basado en K.L. Krause, K.W. Volz y W.N. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:1643-1647, 1985. Con la autorización de National Academy of Sciences.)

unión, por lo que el efecto es una transición alostérica cooperativa que puede activar la enzima con rapidez cuando se acumulan los sustratos (transformándola en su estado R) o inactivarla repentinamente cuando se acumula CTP (transformándola en su estado T).

La combinación de la bioquímica y de la cristalografía de rayos X ha revelado gran cantidad de detalles fascinantes de esta transición alostérica. Cada subunidad reguladora tiene dos dominios; la unión de CTP hace que ambos dominios se desplacen uno respecto al otro, de forma que actúan como un elevador que hace rotar los trímeros catalíticos acercándolos entre sí, en el estado T (véase Figura 3–62). Cuando este fenómeno ocurre se forman enlaces de hidrógeno entre las subunidades catalíticas opuestas y es más fácil que se ensanche la hendidura que forma el lugar activo en cada subunidad catalítica, desorganizando así los lugares de unión para el sustrato (**Figura 3–63**). Añadiendo grandes cantidades de sustrato se obtiene el efecto contrario, favoreciendo la formación del estado R mediante la unión de moléculas de sustrato en la hendidura de cada subunidad catalítica y oponiéndose así al cambio conformacional descrito. Las conformaciones intermedias entre los estados R y T son inestables, de forma que la enzima salta fundamentalmente entre las formas R y T, produciéndose una mezcla de ambas formas (la proporción varía en función de las concentraciones relativas de CTP y de sustratos).

La fosforilación proteica dirige muchos de los cambios que presentan las proteínas

Las proteínas se regulan por otros sistemas además de la unión reversible de otras moléculas. Un segundo método que las células eucariotas utilizan para regular la función de una proteína es la unión covalente de una pequeña molécula a una o a varias de las cadenas laterales de sus aminoácidos. La más habitual de estas modificaciones reguladoras en los eucariotas superiores consiste en la adición de un grupo fosfato. Por este motivo, utilizaremos la fosforilación de proteínas para ilustrar algunos de los principios generales que están invo-

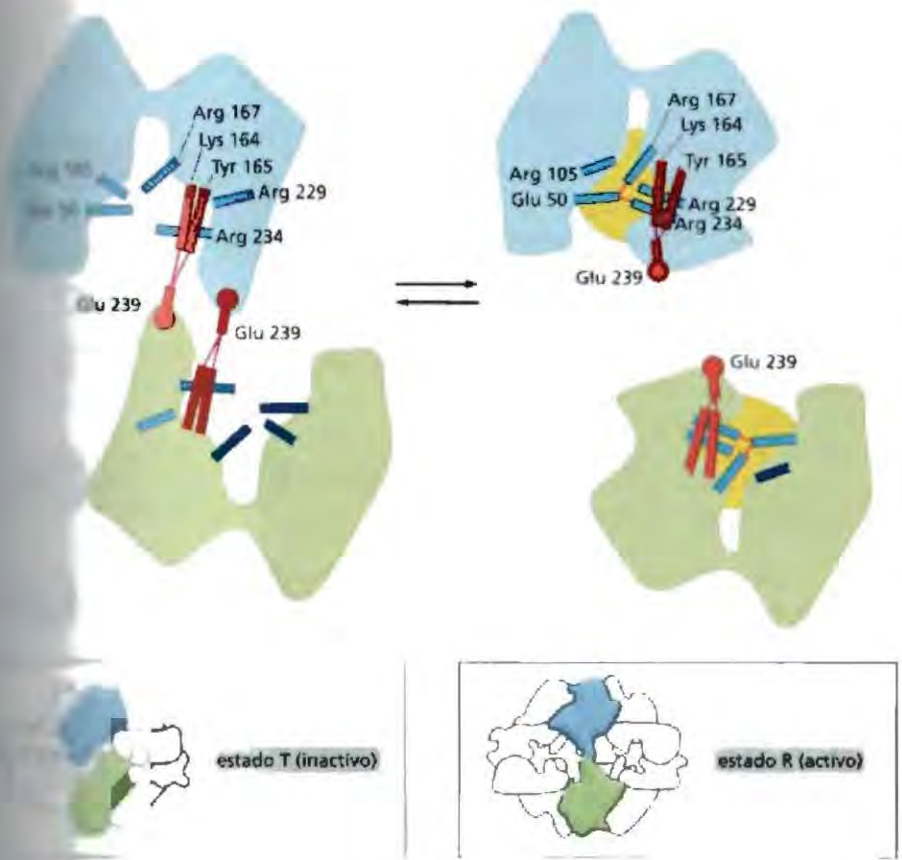


Figura 3–63 Parte del interruptor sí/no de la subunidad catalítica de la aspartato transcarbamilasa. Algunos cambios en las interacciones entre enlaces de hidrógeno indicados son parcialmente responsables del "salto" que sufre el lugar activo de esta enzima desde la conformación activa (*amarillo*) a la inactiva. Los enlaces de hidrógeno se indican como *finas líneas rojas*. Los aminoácidos que participan en las interacciones entre las dos subunidades en el estado T se indican en *rojo* mientras que los que forman el lugar activo de la enzima en el estado R se muestran en *azul*. Los esquemas grandes de la figura muestra el lugar catalítico en el interior de la enzima; los esquemas recuadrados muestran las mismas subunidades vistas desde la superficie externa de la enzima. (Adaptado de E.R. Kantrowitz y W.N. Lipscomb, *Trends Biochem. Sci* 15:53-59, 1990. Con la autorización de Elsevier.)

...n el control de la función proteica a través de la modificación de las cadenas late... aminoácidos.

...forilación puede afectar a la proteína que se ha modificado de dos importantes ... n primer lugar, debido a que cada grupo fosfato aporta dos cargas negativas, la ...zada enzimáticamente de un grupo fosfato a una proteína puede provocar un ...formacional importante en la proteína, por ejemplo atrayendo un grupo de ca...ales entonces cargadas positivamente. Esto a su vez, puede afectar la unión de li... cualquier parte de la superficie de la proteína y cambiar de forma radical la ...e la enzima. Cuando una segunda enzima elimina el grupo fosfato, la proteína ... conformación original y entonces se restablece su actividad inicial.

...undo lugar, un grupo fosfato puede formar parte de una estructura que sea re... por lugares de unión de otras proteínas. Como hemos indicado algunos dominios ... a veces llamados nódulos, aparecen muy a menudo formando parte de grandes ... Uno de estos módulos, el dominio SH2, ya descrito, se une a una corta secuencia ... que contiene una cadena lateral de tirosina fosforilada (véase Figura 3–39B). Exis... otros diez dominios habituales que proporcionan lugares de unión para que su ... una a péptidos fosforilados de otras moléculas proteicas, cada uno de los cuales ... una cadena lateral fosforilada de un aminoácido en diferentes contextos. Como ... la fosforilación y la desfosforilación de proteínas muy a menudo dirige el ensam... ...ensamblaje regulado de los complejos proteicos (véase Figura 15–22).

...orilación reversible de proteínas controla la actividad, la estructura y la localiza... tanto de enzimas como de muchos otros tipos de proteínas en las células euca... ...istema de regulación está tan extendido, que se cree que más de un tercio de las ...amente 10.000 proteínas de una célula típica de mamífero son fosforiladas en ... momento –muchas con más de un fosfato. Como se podía esperar, a menudo la ...minación de grupos fosfato a proteínas determinadas ocurre en respuesta a se... ...pecifican algún cambio en el estado de la célula. Por ejemplo, de esta manera es... ...ometrada la complicada serie de sucesos que tiene lugar cuando una célula ... divide (Capítulo 17) y muchas de las señales que median las interacciones célu... ... enviadas desde la membrana plasmática hasta el núcleo mediante una casca... ...ilación de proteínas (Capítulo 15).

Las células eucariotas contienen una gran gama de proteínas quinasa y proteínas fosfatasa

La fosforilación de proteínas supone la transferencia, catalizada enzimáticamente, del grupo fosfato terminal de un ATP al grupo hidroxilo de la cadena lateral de una serina, una treonina o una tirosina de la proteína (**Figura 3–64**). Esta reacción está catalizada por una **proteína quinasa**; la reacción es esencialmente unidireccional debido a la gran cantidad de energía libre liberada cuando el enlace fosfato–fosfato del ATP es roto dando lugar a ADP (como se describió en el Capítulo 2). Una **proteína fosfatasa** cataliza la reacción inversa de eliminación del fosfato o *desfosforilación*. Las células contienen cientos de proteínas quinasa diferentes, cada una de las cuales es responsable de la fosforilación de diferentes proteínas o grupos de proteínas. También existen muchos tipos de proteínas fosfatasa, algunas de las cuales son altamente específicas y solamente eliminan los grupos fosfato de uno o unos cuantos tipos de proteínas, mientras que otras actúan sobre un amplio espectro de proteínas y van dirigidas por subunidades reguladoras a sustratos específicos. El estado de fosforilación de una proteína en un momento dado y, por tanto, su actividad correspondiente, dependerá de las actividades relativas de las proteínas quinasa y de las proteínas fosfatasa que actúen sobre ella.

Las proteínas quinasa que fosforilan proteínas en las células eucariotas pertenecen a una gran familia de enzimas, las cuales contienen un dominio catalítico quinasa de unos 290 aminoácidos. Los diversos miembros de la familia contienen diferentes secuencias de aminoácidos en cada lado del dominio quinasa (p. ej., véase Figura 3–10) y a menudo dentro del dominio tienen cortas secuencias de aminoácidos formando asas (véanse las *puntas de flecha rojas* en la **Figura 3–65**). Algunas de estas secuencias adicionales de aminoácidos permiten que cada quinasa reconozca específicamente el conjunto de proteínas que fosforila o que se unan a estructuras que las localizan en lugares concretos de la célula. Otras partes de la proteína regulan la actividad de cada quinasa, de manera que puede ser activada o inhibida en respuesta a diferentes señales específicas, como describimos más adelante.

Comparando el número de diferencias en la secuencia de aminoácidos entre los miembros de una familia proteica podemos construir un "árbol evolutivo", que al parecer refleja el patrón de duplicación génica y de divergencia que ha dado lugar a la familia. En la **Figura 3–66** se presenta un árbol evolutivo de las proteínas quinasa. Las quinasas que tienen funciones relacionadas se localizan en ramas vecinas del árbol: por ejemplo, todas las proteínas quinasa que participan en procesos de señalización celular fosforilando cadenas laterales de tirosina se hallan agrupadas en la esquina superior izquierda del árbol. Las otras quinasas mostradas fosforilan cadenas laterales de serina o de treonina, y muchas de ellas están agrupadas, al parecer, según su función –en la señalización transmembrana, en la amplificación de señales intracelulares, en el control del ciclo celular, etc.

A causa de la combinación de las actividades de las proteínas quinasa y las proteínas fosfatasa, los grupos fosfato de las proteínas se están renovando continuamente, es decir, son añadidos y luego eliminados. Los ciclos de fosforilación de este tipo pueden parecer un derroche, sin embargo permiten que las proteínas cambien rápidamente de un estado a otro: cuanto más rápidamente actúe este ciclo, más deprisa podrá cambiar el estado de fosforilación de una población de proteínas en respuesta a un cambio brusco de la velocidad de fosforilación (véase Figura 15–11). La energía necesaria para mantener este ciclo de fosforilación se obtiene de la energía libre de hidrólisis del ATP, del que se consume una molécula en cada vuelta del ciclo.

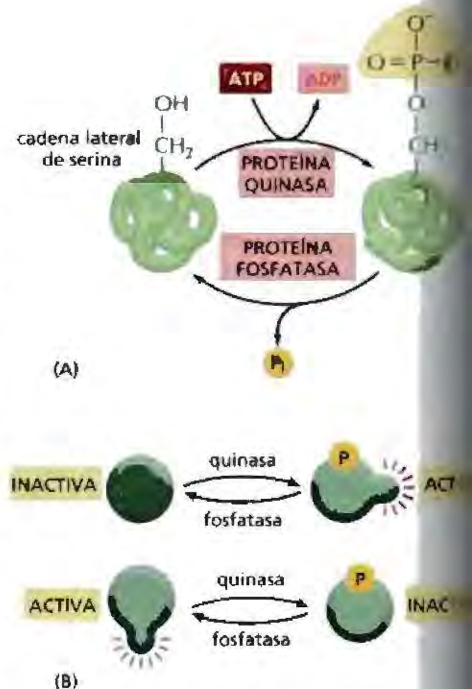


Figura 3–64 Fosforilación proteica. En una célula eucariota típica, muchos miles de proteínas se modifican mediante la adición covalente de un grupo fosfato. (A) La reacción general, mostrada aquí, transfiere un grupo fosfato del ATP a la cadena lateral de un aminoácido en la proteína diana mediante una proteína quinasa. La liberación del grupo fosfato se cataliza por una segunda enzima, una proteína fosfatasa. En este ejemplo, el fosfato se añade a la cadena lateral de una serina; en cambio en otros casos, el fosfato se añade a un grupo –OH de una treonina o una tirosina de la proteína. (B) La fosforilación de una proteína por una proteína quinasa puede tanto incrementar como disminuir la actividad de la proteína, según el lugar de fosforilación y la estructura de la proteína.

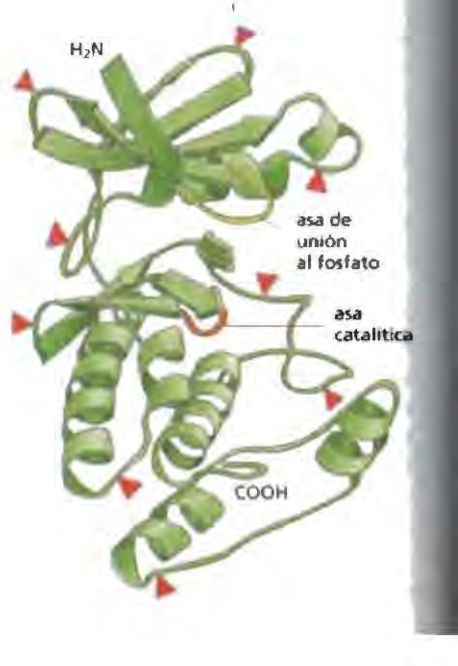


Figura 3–65 Estructura tridimensional de una proteína quinasa. Superpuestas al esquema de la estructura, las *puntas de flecha rojas* indican lugares en los que se han encontrado insertos de entre 5 y 100 aminoácidos en otros miembros de la familia de las proteínas quinasa. Estos insertos están localizados en asas sobre la superficie de la enzima, donde otros ligandos interactúan con la proteína. Así, los insertos diferencian las distintas quinasas confiriéndoles la capacidad de interaccionar con otras proteínas. El ATP (dador de un grupo fosfato en la reacción) y el péptido que será fosforilado se unen en el lugar activo de la enzima, que abarca desde el asa que une el grupo fosfato (*amarillo*) hasta el asa catalítica (*naranja*). Véase también la Figura 3-10. (Adaptado de D.R. Knighton et al., *Science* 235:407-414, 1991. Con la autorización de AAAS.)

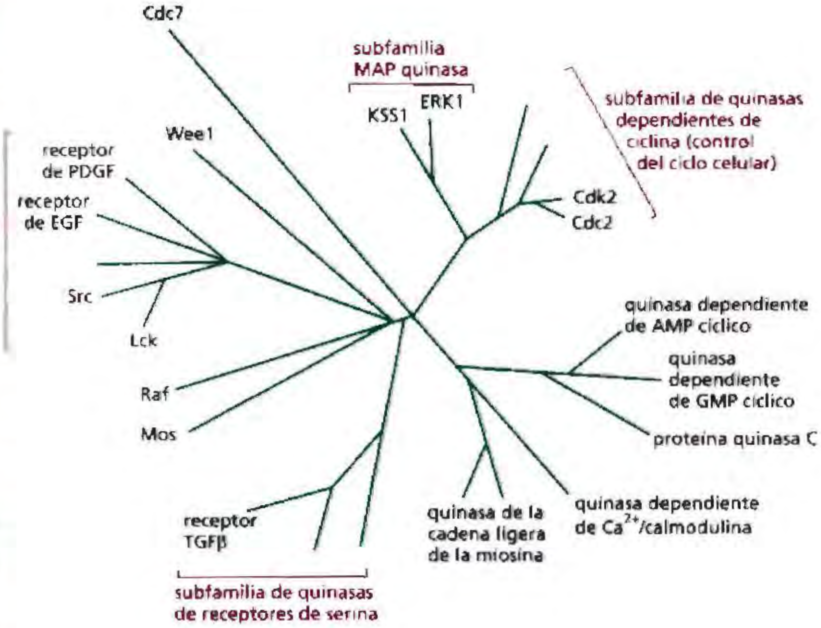


Figura 3–66 Árbol evolutivo de algunas proteínas quinasa. A pesar de que las células eucariotas superiores contienen centenares de tales enzimas, y el genoma humano codifica más de 500, sólo se muestran algunas de las que aparecen en este libro.

ulación de las proteínas quinasa Cdk y Src muestran forma una proteína puede actuar como un microchip

nares de proteínas quinasa diferentes que tiene una célula eucariota están organi- complejas redes de vías señalizadoras que ayudan a coordinar las actividades celu- en el ciclo celular y transmiten señales extracelulares al interior de la célula. las señales extracelulares involucradas deben ser integradas y amplificadas por la proteína quinasa (y otras proteínas señalizadoras) actúan como elementos de nto de entrada y salida de información o "microchips" en los procesos de inte- parte importante de las entradas de información de estas proteínas de proce- ñal procede del control que ejercen los fosfatos añadidos y eliminados por las quinasa y las proteínas fosfatasa respectivamente.

al unos conjuntos específicos de grupos fosfato activan las proteínas mientras las inactivan. Una proteína quinasa dependiente de ciclina (Cdk: *cyclin-depen- n kinase*) proporciona un buen ejemplo. Las quinasas de esta clase fosforilan en oninas, y son los componentes centrales del sistema de división celular de las cé- otas, como se describe en detalle en el Capítulo 17. En las células de los verte- proteína Cdk se activa e inhibe sucesivamente mientras la célula atraviesa las ses de su ciclo de división. Cuando una quinasa en particular está activada, afec- spectos del comportamiento celular a través de sus efectos sobre las proteínas la.

roteína Cdk sólo es activa como proteína serina/treonina quinasa cuando está ra proteína llamada *ciclina*. Sin embargo, como se ilustra en la **Figura 3–67**, la ciclina sólo es una de las tres "entradas de información" necesarias para activar más de la unión de la ciclina, se debe añadir un fosfato a una cadena lateral de inada treonina y se debe eliminar otro grupo fosfato de la proteína (que se halla lentemente a una cadena lateral de una determinada tirosina). Así, la Cdk integra específico de componentes celulares –una ciclina, una proteína quinasa y una fatasa– y actúa como un procesador de entrada y salida de información que se amente en el caso de que cada uno de estos componentes adquiera su estado de adecuado. Algunas ciclinas aumentan y disminuyen de concentración en deter- etapas del ciclo celular, incrementando de forma gradual de cantidad hasta que re- nte empiezan a ser destruidas en un punto determinado del ciclo. La repentina de una ciclina (por proteolisis dirigida) inhibirá de inmediato una enzima Cdk , lo cual constituye en conjunto un importante sistema específico de controlar ular.

milia de proteínas quinasa Src (véase Figura 3–10) presenta un comportamiento microchip. La *proteína Src* (se pronuncia "sarc" y es denominada así por el tipo de

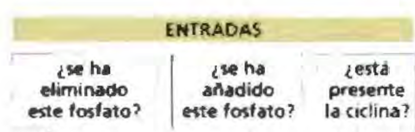


Figura 3–67 De qué manera actúa una Cdk como elemento integrador. <TAGA> En el Capítulo 17 se describe la función de estos reguladores centrales sobre el ciclo celular.



Figura 3–68 Estructura de dominios de las proteínas quinasa de la familia Src, situadas a lo largo de la secuencia de aminoácidos. Para detalles de la estructura tridimensional de Src, véase la Figura 3-10.

tumor, un sarcoma, producido por su desregulación) fue la primera tirosina quinasa descubierta. Ahora se sabe que pertenece a una subfamilia de nueve proteínas quinasa muy similares que sólo se encuentran en animales pluricelulares. Como se indicó en el árbol evolutivo en la Figura 3–66, las comparaciones de secuencias sugieren que las tirosinas quinasa, como grupo, fueron una innovación relativamente tardía que se ramificó de las serinas/treoninas quinasa, siendo la subfamilia Src un subgrupo de las tirosinas quinasa generadas de este modo.

La proteína Src y las relacionadas con ella contienen una corta región N-terminal que se une covalentemente a un ácido graso muy hidrofóbico; este hecho ancla la quinasa a la cara citoplasmática de la membrana plasmática. Luego vienen dos módulos de unión a péptido, un dominio 3 homólogo a Src (SH3: *Src **homology 3***) y un dominio SH2, seguido de los dominios catalíticos quinasa (**Figura 3–68**). Normalmente estas quinasas están en conformación inactiva, en la cual una tirosina fosforilada cercana al C-terminal está unida al dominio SH2, y el dominio SH3 está unido a un péptido interno de modo que distorsiona el centro activo de la enzima y ayuda a mantenerlo inactivo.

Activar la quinasa implica como mínimo dos procesos específicos: la eliminación del fosfato del C-terminal y la unión del dominio SH3 a una proteína activadora específica (**Figura 3–69**). Como ocurre al activar la proteína Cdk, la activación de la quinasa Src indica que se ha completado un conjunto particular de sucesos independientes dados con anterioridad (**Figura 3–70**). Así, las familias de proteínas Src y Cdk integran señales específicas, colaborando a generar la compleja telaraña de operaciones de procesamiento de información que permiten a la célula procesar las respuestas lógicas en un complicado conjunto de condiciones.

Las proteínas que unen e hidrolizan GTP son reguladores celulares ubicuos

Hemos descrito de qué forma la célula utiliza la adición o la eliminación de grupos fosfato de una proteína para controlar su actividad. En los ejemplos expuestos, el fosfato es transferido desde una molécula de ATP a una cadena lateral de un aminoácido de la proteína a través de una reacción catalizada por una proteína quinasa específica. Las células eucariotas también utilizan otra vía para controlar la actividad de las proteínas mediante la adición o eliminación de fosfatos. En este caso, el fosfato no se añade de forma directa a la proteína sino que parte del nucleótido de guanina GTP, el cual se une fuertemente a la proteína. Generalmente, cuando la proteína está unida a GTP es activa. La pérdida del grupo fosfato ocurre cuando el GTP unido es hidrolizado a GDP, a través de una reacción catalizada por la propia proteína; cuando la proteína está unida a GDP, es inactiva. De este modo, las proteínas que

Figura 3–69 Activación de una proteína quinasa tipo Src mediante dos sucesos secuenciales. (Adaptado de S.C. Harrison et al., *Cell* 112:737-740, 2003. Con la autorización de Elsevier.)



... actúan como interruptores "sí/no" cuya actividad depende de la presencia o au... un grupo fosfato adicional en la molécula de GDP que tienen unida (**Figura 3–71**).

... **proteínas que unen GTP** (también denominadas **GTPasas** debido a que también ... la hidrólisis de GTP) constituyen una gran familia de proteínas. Todas ellas contie... ...iones de un mismo dominio globular de unión a GTP. Cuando el GTP unido es hi... ...a GDP, este dominio sufre un cambio de conformación que inactiva la proteína. En ... 3–72 se ilustra la estructura tridimensional de una proteína prototipo de esta fami... ...na monomérica GTPasa denominada Ras.

...*ína Ras* desempeña un papel crucial en la señalización celular (como se explica ...tulo 15). Unida a GTP es activa y estimula una cascada de fosforilación de proteí... ...lula. Sin embargo, generalmente está en su forma inactiva, unida a GDP. Se acti... ...cambia la molécula de GDP que tiene unida por una de GTP, en respuesta a ...tracelulares como factores de crecimiento, que se unen a receptores de la mem... ...mática (véase Figura 15–58).



Figura 3–70 **De qué forma una proteína quinasa tipo Src actúa como mecanismo integrador.** La rotura de la interacción del dominio SH3 (*verde*) implica la sustitución de la unión a la región indicada en *rojo* por la interacción fuerte con un ligando activado, como se ilustra en la Figura 3-69.

... proteínas reguladoras controlan la actividad de las proteínas ...en GTP y determinan cuándo unen GDP y cuándo GTP

... que unen GTP están controladas por proteínas reguladoras que determinan ... GDP y cuándo GTP, del mismo modo que las proteínas fosforiladas se activan ... por proteínas quinasa y proteínas fosfatasa. Así, Ras se inactiva por una *proteína ... de GTPasa* (*GAP: GTPase-activating protein*), la cual se une a la proteína Ras in... ...a hidrolizar la molécula de GTP que lleva unida, formando GDP –que queda uni... ...nente a ella– y fosfato inorgánico (P_i), que es rápidamente liberado. La proteína ... en su conformación inactiva, unida a GDP, hasta que interactúa con un *factor ...dor de nucleótidos de guanina* (*GEF: guanine nucleotide exchange factor*), la cual ... complejo GDP-Ras haciendo que Ras libere su GDP. El lugar, ahora vacío, de unión ...dos, es ocupado inmediatamente por una molécula de GTP (el GTP está presente ... a concentraciones mucho mayores que las de GDP), por lo que GEF activa Ras ... la adición *indirecta* del fosfato eliminado por la hidrólisis del GTP. En cierto senti... ...eles de GAP y de GEF son análogos a los de la proteína fosfatasa y de la proteína ...spectivamente (**Figura 3–73**).

...ñas moléculas pueden generar grandes movimientos

... Ras es uno de los miembros de la superfamilia de *GTPasas monoméricas*, cada ... cuales están formadas por un dominio de unión a GTP de unos 200 aminoácidos. ...curso de la evolución, este dominio también se ha unido a proteínas mayores con ...dicionales, generando una gran familia de proteínas que unen GTP. Los miem... ...milia incluyen las proteínas G triméricas asociadas a receptores involucrados en ... celular (descritas en el Capítulo 15), proteínas reguladoras del tráfico de vesí... ...compartimientos intracelulares (analizadas en el Capítulo 13) y proteínas que se ... de transferencia y que son necesarias para que se produzca la síntesis proteica ...omas (tratado en el Capítulo 6). En cada caso, una importante actividad biológi... ...trolada por un cambio en la conformación de la proteína, producido por la hi... GTP en un dominio semejante a Ras.

...*ína EF-Tu* constituye un buen ejemplo sobre cómo actúan los componentes de ... de proteínas. EF-Tu es una molécula muy abundante que actúa como un factor ...ón (EF: *elongation factor*) en la síntesis proteica, cargando en el ribosoma cada ... de aminoacil-tRNA. La molécula de tRNA forma un fuerte complejo con EF-Tu



Figura 3–71 **Las proteínas que unen GTP como interruptores moleculares.** La actividad de una proteína que une GTP (también llamada GTPasa) por lo general requiere la presencia de una molécula de GTP fuertemente unida (interruptor encendido). La hidrólisis de esta molécula de GTP produce GDP y fosfato inorgánico (P_i), y provoca que la proteína se transforme en una conformación diferente, generalmente inactiva (interruptor apagado). Como se muestra aquí, reactivar el interruptor requiere la disociación del GDP fuertemente unido, un paso lento que es acelerado en gran medida por señales específicas; cuando el GDP se ha disociado, rápidamente se vuelve a unir una molécula de GTP.

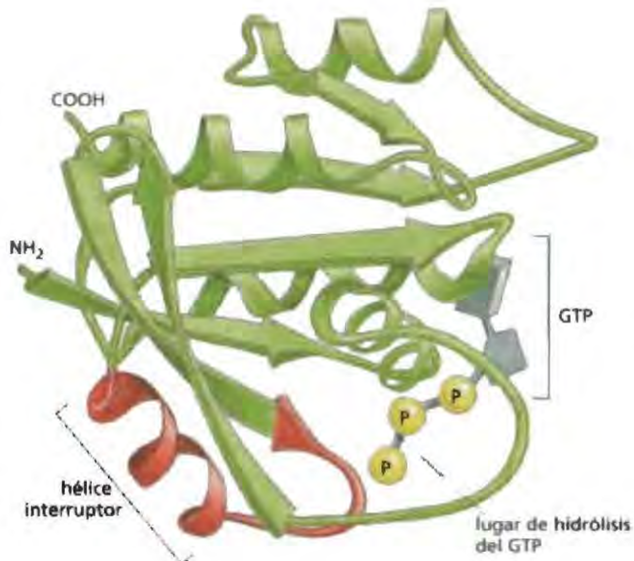


Figura 3–72 Estructura de la proteína Ras en su forma unida a GTP. <GAAC> Esta GTPasa monomérica ilustra la estructura de un dominio de unión a GTP, que se halla presente en una gran familia de proteínas que unen GTP. Las regiones mostradas en *rojo* cambian su conformación cuando la molécula de GTP es hidrolizada a GDP y fosfato inorgánico por la proteína; el GDP queda unido a la proteína mientras que el fosfato inorgánico es liberado. Más adelante se explica el papel especial que tiene la "hélice interruptor" en las proteínas relacionadas con Ras (véase la Figura 3-75).

unido a GTP (**Figura 3–74**). En este complejo, el aminoácido unido al tRNA está colocado de forma incorrecta para la síntesis de proteínas. El tRNA únicamente puede transferir su aminoácido después de que el GTP unido a EF-Tu sea hidrolizado sobre el ribosoma. Dado que la hidrólisis de GTP está desencadenada por el ajuste adecuado del tRNA a la molécula de mRNA en el ribosoma, EF-Tu actúa como un factor que discrimina entre pares mRNA-tRNA correctos e incorrectos (véase la Figura 6–67 para un mejor análisis de esta función de EF-Tu).

Comparando la estructura tridimensional de EF-Tu, respecto a su forma unida a GTP y su forma unida a GDP, podemos saber cómo cambia de posición el tRNA. La disociación del fosfato inorgánico (P_i), procedente de la reacción GTP $\rightarrow$ GDP + P_i, genera una ligerísima deformación de unas décimas de nanómetro del lugar de unión a GTP, tal como ocurre en la proteína Ras. Este ligero movimiento, equivalente a pocas veces el diámetro de un átomo de hidrógeno, genera un cambio de conformación que se propaga a lo largo de una pieza crucial de hélice α, llamada *hélice interruptor*, en el dominio semejante a Ras de la proteína. Al parecer la hélice interruptor actúa como un pestillo que se une específicamente a una zona de otro dominio de la molécula, manteniendo la proteína en una conformación "cerrada". El cambio de conformación desencadenado por la hidrólisis de GTP hace que la hélice interruptor se desenganche, dejando que los dominios de la proteína, ahora separados, se des-

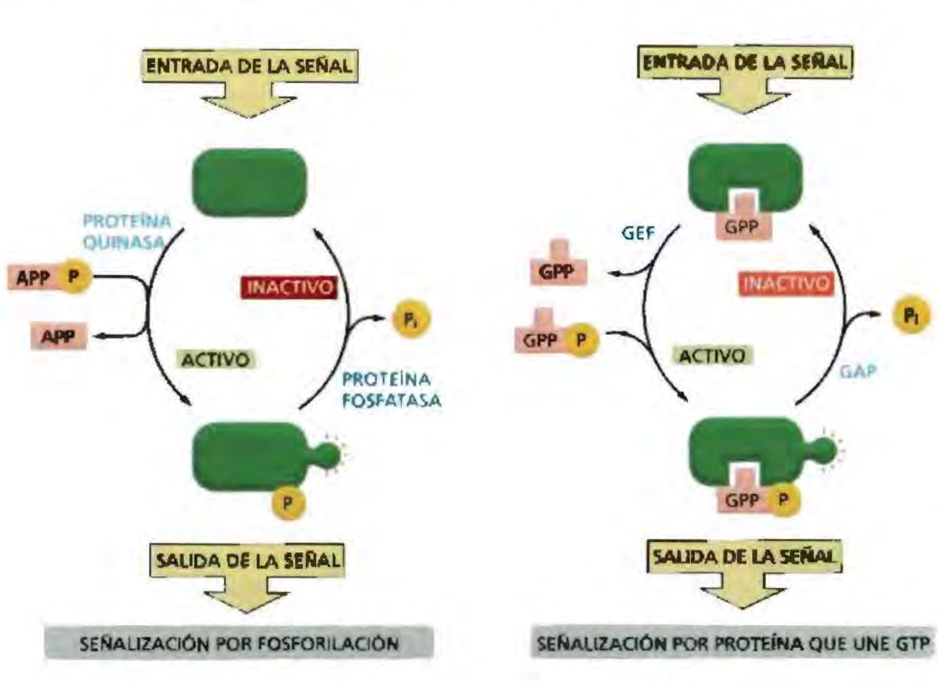


Figura 3–73 Comparación entre los dos principales mecanismos de señalización de las células eucariotas. En ambos casos una proteína de señal es activada mediante la adición de un grupo fosfato e inactivada mediante la eliminación de este fosfato. Para destacar las similitudes entre ambos procesos, el ATP y el GTP se han dibujado como APPP y GPPP, y ADP y GDP como APP y GPP, respectivamente. Como se muestra en la Figura 3-64, la adición de un fosfato a una proteína también puede inhibirla.



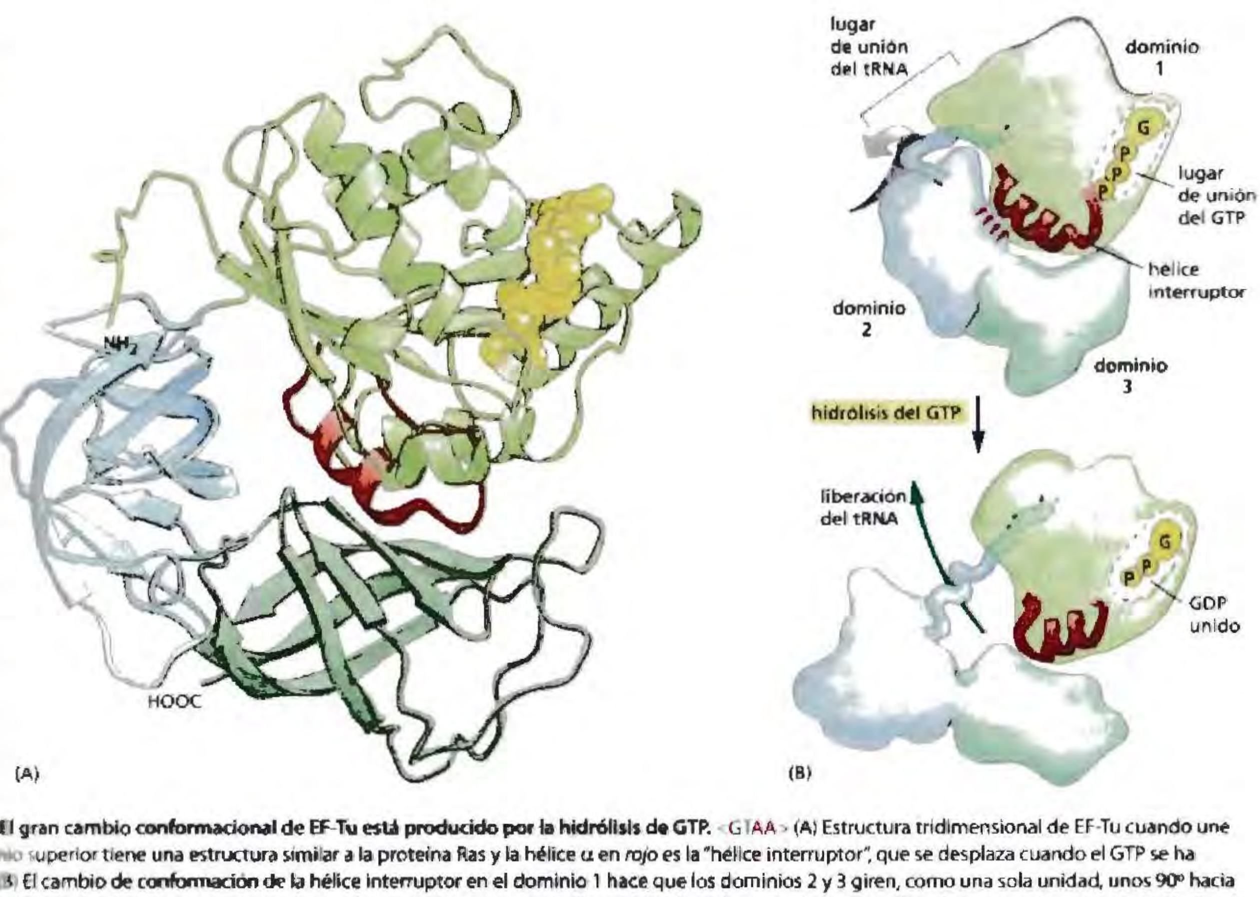
Figura 3–74 Una molécula de aminoacil tRNA unida a EF-Tu. Los tres dominios de la proteína EF-Tu están coloreados de forma diferente, para que coincidan con los colores de la Figura 3-75. Esta es una proteína bacteriana; sin embargo en los eucariotas existe una proteína muy parecida, que se denomina EF-1. (P. Nissen et al., *Science* 270:1464-1472, 1995. Con la autorización de AAAS.)

una distancia de unos cuatro nanómetros. Así se libera la molécula de tRNA que esta- y el aminoácido que lleva unido puede ser utilizado (**Figura 3–75**).

ese en este ejemplo de qué forma las células aprovechan cambios químicos sencillos ren sobre la superficie de pequeños dominios proteicos para realizar un movimien- es mayor. Los cambios de forma drásticos de este tipo también causan los grandes ntos que producen las proteínas motoras, como explicaremos a continuación.

Las proteínas motoras producen grandes movimientos en las células

isto que los cambios conformacionales de las proteínas desempeñan un papel cen- regulación enzimática y en la señalización celular. A continuación, hablaremos de as cuya función principal consiste en mover otras moléculas. Estas **proteínas mo-** ran las fuerzas responsables de la contracción muscular y de los movimientos de Las proteínas motoras también producen movimientos intracelulares de menor olaboran en el desplazamiento de los cromosomas hacia los extremos opuestos de durante la mitosis (Capítulo 17), desplazan los orgánulos a través de pistas molecu- tro de la célula (Capítulo 16) y desplazan a las enzimas a lo largo de la hebra de DNA la síntesis de una nueva molécula de DNA (Capítulo 5). Todos estos procesos fun- les dependen de proteínas con partes móviles, que actúan como **máquinas genera-** **fuerza.**



El gran cambio conformacional de EF-Tu está producido por la hidrólisis de GTP. <GTAA> (A) Estructura tridimensional de EF-Tu cuando une superior tiene una estructura similar a la proteína Ras y la hélice α en *rojo* es la "hélice interruptor", que se desplaza cuando el GTP se ha (B) El cambio de conformación de la hélice interruptor en el dominio 1 hace que los dominios 2 y 3 giren, como una sola unidad, unos 90º hacia liberando el tRNA que se mostraba unido a esta estructura en la Figura 3-74. (A, adaptado de Berchtold et al., *Nature* 365:126-132, 1993. Con la de Macmillan Publishers Ltd. B, por cortesía de Mathias Sprinzl y Rolf Hilgenfeld.)

¿Cómo funcionan estas "máquinas"? En otras palabras, ¿cómo pueden utilizar las células los cambios de forma de las proteínas para generar movimientos dirigidos? Por ejemplo, si se necesita que una proteína se desplace a lo largo de una hebra estrecha como una molécula de DNA, este desplazamiento se puede llevar a cabo mediante una serie de cambios conformacionales, como se ilustra en la **Figura 3–76**. Sin embargo, si no existe ningún elemento que permita que estos cambios sucedan en una secuencia ordenada, serán perfectamente reversibles y la proteína únicamente se desplazará al azar hacia adelante y hacia atrás a lo largo de la hebra. Observemos esta situación desde otra perspectiva. El desplazamiento direccional de una proteína supone un trabajo neto, por lo que las leyes de la termodinámica (véase el Capítulo 2) exigen que este desplazamiento use la energía libre de alguna otra fuente (en caso contrario, la proteína podría utilizarse para fabricar una máquina de movimiento continuo). Así pues, sin una entrada de energía, la molécula de proteína sólo puede vagar sin destino alguno.

¿Cómo puede la célula realizar cambios conformacionales unidireccionales de este tipo? Para forzar que el ciclo entero funcione en una sola dirección, es suficiente con que uno de los cambios de forma sea irreversible. La mayoría de las proteínas que son capaces de avanzar largas distancias en una dirección, lo consiguen acoplando uno de los cambios conformacionales a la hidrólisis de una molécula de ATP unida a la proteína. El mecanismo es semejante al que acabamos de comentar para la inducción de cambios alostéricos mediante la hidrólisis de GTP. A causa de la elevada cantidad de energía libre que se libera cuando se hidroliza el ATP (o el GTP), es muy poco probable que la proteína unida al nucleótido sufra un cambio de forma en sentido contrario –como el que se necesitaría para desplazarse hacia atrás– ya que haría falta que también se revirtiera la hidrólisis del ATP mediante la adición de una molécula de fosfato al ADP, formando ATP.



Figura 3–76 Una proteína alostérica "que anda". A pesar de que sus tres conformaciones diferentes le permiten desplazarse al azar adelante y atrás mientras se mantiene unida a un filamento, la proteína no puede desplazarse uniformemente en una sola dirección.

En el modelo esquemático que se muestra en la **Figura 3–77**, la unión del ATP provoca la transición de la proteína motora desde la conformación 1 hasta la conformación 2. En este momento, el ATP es hidrolizado a ADP y fosfato inorgánico (P_i), generando un cambio desde la conformación 2 a la conformación 3. Finalmente, la liberación del ADP y del P_i devuelve la proteína a la conformación 1. La transición 2 → 3 se realiza mediante la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP, por lo que, a efectos prácticos, esta serie de cambios conformacionales es irreversible. Así, el ciclo completo sólo puede tener lugar en una dirección, haciendo que, en este ejemplo, la molécula proteica avance continuamente hacia la derecha.

Muchas proteínas motoras generan movimientos direccionales siguiendo este modelo general, incluyendo la proteína motora muscular *miosina*, que "anda" a lo largo de los filamentos de actina generando la contracción muscular, y la proteína *quinesina* que "anda" a lo largo de los microtúbulos (Capítulo 16). Estos movimientos pueden ser rápidos: algunas proteínas motoras que participan en la replicación del DNA (las DNA helicasas) se propulsan a sí mismas a lo largo de la hebra del DNA a velocidades de hasta 1000 nucleótidos por segundo.

Los transportadores unidos a membrana utilizan energía para bombear moléculas a través de las membranas

Hemos expuesto cómo las proteínas alostéricas pueden actuar como microchips (Cdk y Src quinasas), factores ensambladores (EF-Tu) y generadores de fuerza y movimiento mecánicos (proteínas motoras). Las proteínas alostéricas también pueden utilizar energía derivada de la hidrólisis del ATP, de gradientes iónicos o de procesos de transporte de electrones para bombear iones o pequeñas moléculas a través de la membrana. A continuación se considera un ejemplo y en el Capítulo 11 serán descritos otros casos.

Los transportadores ABC constituyen una clase importante de bombas proteicas unidas a membrana. En humanos existen al menos 48 genes que codifican este tipo de proteínas. Estos transportadores actúan generalmente exportando moléculas hidrofóbicas desde el citoplasma y eliminando moléculas tóxicas por ejemplo de la superficie de la mucosa del tracto intestinal o de la barrera hematoencefálica. El estudio de los transportadores ABC tiene un

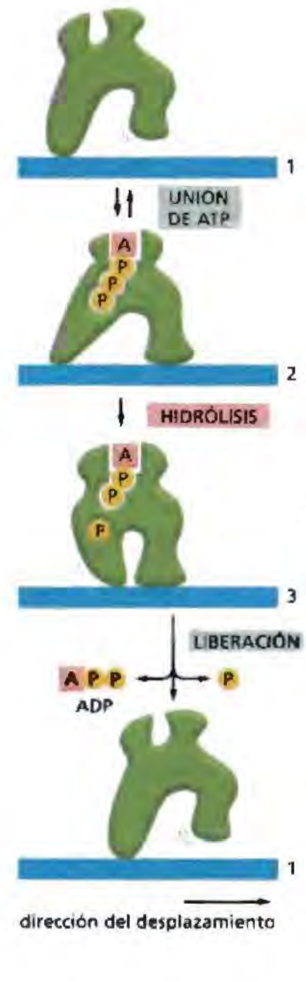


Figura 3–77 Una proteína alostérica "motor". La transición entre tres conformaciones diferentes incluye un paso impulsado por la hidrólisis de una molécula de ATP unida a ella, esto hace que el ciclo completo sea esencialmente irreversible. Al repetirse el ciclo, la proteína se desplaza hacia la derecha a lo largo del filamento.

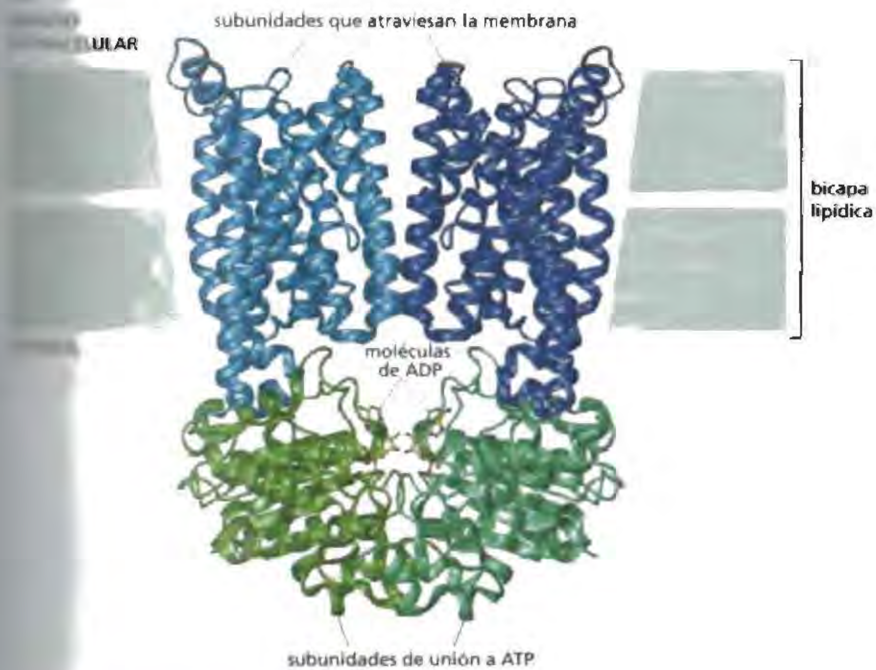
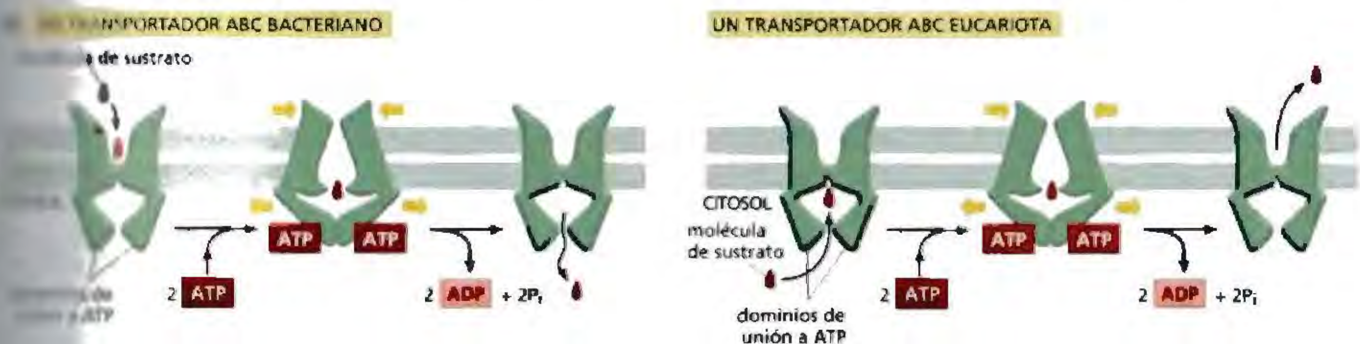


Figura 3–78 El transportador ABC casete de unión a ATP (*ATP-binding casete*), una maquinaria proteica que bombea grandes moléculas hidrofóbicas a través de la membrana. (A) La proteína bacteriana BtuCD, importa vitamina B_{12} al interior de *E. coli* utilizando la energía de la hidrólisis de ATP. La unión de dos moléculas de ATP une las dos subunidades que unen ATP. La estructura se muestra mientras une ADP y se puede observar que el canal está abierto hacia el espacio extracelular pero la puerta hacia el citosol se mantiene cerrada. (B) Ilustración esquemática del bombeo de sustratos por los transportadores ABC. En las bacterias, la unión de una molécula de sustrato a la cara extracelular del complejo proteico desencadena la hidrólisis de ATP seguida de la liberación del ADP, lo cual abre la puerta citoplasmática; entonces, la bomba inicia un nuevo ciclo. En los eucariotas ocurre un proceso opuesto a éste, que hace que las moléculas de sustrato sean bombeadas al exterior de la célula. (A, adaptado de K.P. Locher, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14:426-441, 2004. Con la autorización de Elsevier.)



...terés en medicina clínica, ya que la sobreproducción de proteínas de esta clase ...e a la resistencia de las células tumorales a los fármacos utilizados para la quimio... ...n las bacterias, este mismo tipo de proteínas actúan primariamente importando ... esenciales al interior de la célula.

...ansportadores ABC son tetrámeros. Un par de las subunidades atraviesan la mem... ...tán unidas a un par de subunidades que unen ATP localizadas justo debajo de la ...a plasmática (**Figura 3–78**A). Como hemos analizado en otros ejemplos, la hidró... ...moléculas de ATP que están unidas a la proteína dirige los cambios conformacio... ...ta proteína y transmite fuerzas que hacen que las subunidades que atraviesan ...ana desplacen las moléculas que tienen unidas a través de la bicapa lipídica ...78B).

...umanos hemos inventado muchos tipos diferentes de bombas mecánicas, por lo ...bería sorprendernos que las células también contengan bombas unidas a mem... ...funcionan de otros modos. Entre las más notables se encuentran las bombas rota... ...acoplan la hidrólisis de ATP al transporte de iones H^+ (protones). Estas bombas se ...a turbinas en miniatura y se utilizan para acidificar el interior de los lisosomas y de ...ulos de los eucariotas. Al igual que otras bombas iónicas que generan gradientes ...pueden funcionar a la inversa, catalizando la reacción ADP + $P_i \rightarrow$ ATP si, a través de ...ana, existe un gradiente suficientemente grande del ion que transportan.

...de estas bombas, la ATP sintasa, utiliza el gradiente de concentración de protones ...por los procesos de transporte de electrones, para producir la mayoría del ATP ...n los seres vivos. Esta bomba de localización ubicua desempeña un papel central ...ersión energética. Describiremos su mecanismo y su estructura tridimensional en ... 14.

A menudo las proteínas pueden formar grandes complejos que funcionan como máquinas proteicas <ACTT> <ATCG>

Las grandes proteínas formadas por muchos dominios son capaces de realizar funciones más elaboradas que las proteínas pequeñas, que tienen un solo dominio. Sin embargo, las tareas más impresionantes las realizan grandes ensamblajes de proteínas formados por muchas moléculas proteicas. Actualmente es posible reconstruir en sistemas libres de células en el laboratorio, ciertos procesos biológicos, por lo que ha resultado evidente que cada proceso central de la célula –como la replicación del DNA, la síntesis de proteínas, la formación de vesículas o la señalización transmembrana– está catalizado por un conjunto de 10 o más proteínas unidas entre sí y altamente coordinadas. En la mayoría de estas *máquinas proteicas*, una reacción energéticamente favorable como la hidrólisis de nucleótidos trifosfato (ATP o GTP) unidos a la proteína conduce a una serie de cambios conformacionales en una o varias de las subunidades proteicas, lo cual capacita a todo el conjunto de proteínas a moverse de forma coordinada. De esta manera, las enzimas se pueden desplazar directamente a los lugares donde son necesarias, a medida que la máquina cataliza reacciones sucesivas de una serie ordenada. Esto es lo que ocurre, por ejemplo, en la síntesis de proteínas sobre un ribosoma (Capítulo 6) –o en la replicación del DNA, en la que un enorme complejo multiproteico se desplaza rápidamente a lo largo del DNA (Capítulo 5).

A lo largo de la evolución, las células han desarrollado máquinas proteicas por la misma razón por la que los humanos han inventado máquinas mecánicas y eléctricas. Para realizar casi cualquier tipo de tarea, las manipulaciones que están espacial y temporalmente coordinadas mediante procesos ligados son mucho más eficientes que la utilización de herramientas individuales.

Las máquinas proteicas con partes intercambiables utilizan de forma eficiente la información genética

Para profundizar en la naturaleza de las máquinas proteicas, consideraremos una relativamente sencilla: la **ubiquitina ligasa SCF**. Este complejo proteico une diferentes "proteínas diana" en diferentes momentos del ciclo celular y añade covalentemente cadenas polipeptídicas de multiubiquitina a estas proteínas. Su estructura en forma de C está formada por cinco subunidades proteicas, la mayor de las cuales es una molécula que actúa como una *proteína de armazón* sobre la que se construye el resto de la estructura. La estructura contiene un mecanismo destacable (**Figura 3–79**). En uno de los extremos de la C se halla la enzima que conjuga ubiquitina E2. En el otro extremo, se halla el brazo al que se une el sustrato, una subunidad conocida como proteína caja-F. Estas dos subunidades están separadas por una distancia de unos 5 nm. Cuando este complejo proteico es activado, *la proteína caja-F* se une a un lugar específico sobre la proteína diana y coloca la proteína en el espacio de separación de forma que algunos de sus residuos de lisina entran en contacto con la enzima que conjuga ubiquitinas. Entonces, esta enzima puede catalizar la adición repetida de un polipéptido de ubiquitinas a estas lisinas (véase la Figura 3–79C), produciendo así una cadena de poliubiquitina que marca la proteína diana para ser rápidamente destruida por un proteosoma (véase página 393).

De esta forma, determinadas proteínas son marcadas para su rápida destrucción en respuesta a señales específicas, ayudando así a conducir el ciclo celular (se describe en el Capítulo 17). A menudo el patrón temporal de la destrucción supone la creación de un patrón específico de fosforilación sobre la proteína diana, necesario para el reconocimiento por la subunidad caja-F. También se necesita la activación de una ubiquitina ligasa SCF que transporte el brazo adecuado de unión al sustrato. Muchos de estos brazos (las subunidades caja-F) son intercambiables en el complejo proteico (véase la Figura 3–79B) y en los humanos existen más de 70 genes que los codifican.

Como hemos destacado anteriormente, cuando una proteína ha evolucionado con éxito, su información genética tiende a duplicarse produciendo una familia de proteínas relacionadas. Así, por ejemplo, no sólo existen muchas proteínas caja-F –lo cual hace posible el reconocimiento de diferentes juegos de proteínas diana– sino que también existe una familia de armazones (denominadas cullinas) que generan una familia de proteínas semejantes a ubiquitinas ligasa SCF.

La presión sobre un organismo para minimizar el número de genes (véase página 265) probablemente ayuda a explicar por qué la existencia de la maduración del RNA es tan ge-

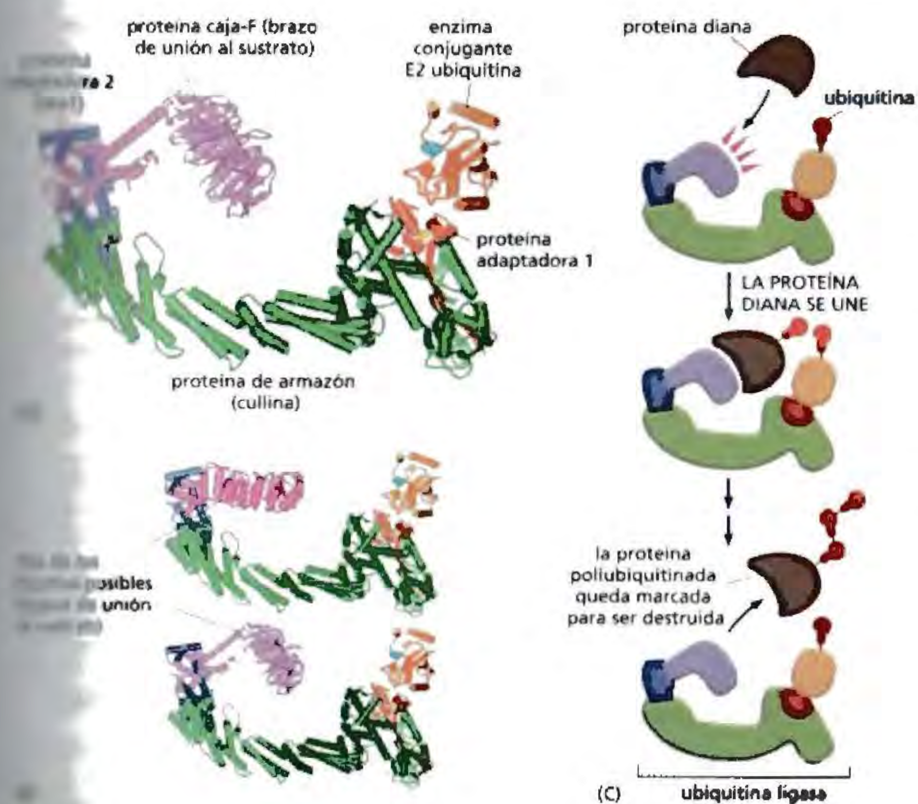


Figura 3–79 Estructura y modo de acción de una ubiquitina ligasa SCF. (A) Estructura de los cinco complejos proteicos incluidos en una ubiquitina ligasa E2. La proteína indicada como proteína adaptadora 1 es Rbx1/Hrt1, la proteína adaptadora 2, es Skp1, y la cullina es la proteína Cul1. (B) Comparación del mismo complejo con dos brazos de unión al sustrato, las proteínas de caja-F Skp2 (*arriba*) y β-trCP1 (*abajo*), respectivamente. (C) La unión y ubiquitinación de una proteína diana por la ubiquitina ligasa SCF. Si, como se indica, una cadena de moléculas de ubiquitina se añade a la misma lisina de la proteína diana, dicha proteína queda marcada para su destrucción rápida por el proteosoma. (A y B, adaptado de G. Wu et al., *Mol. Cell* 11:1445-1456, 2003. Con la autorización de Elsevier.)

... en los eucariotas superiores, ya que permite que a partir de un solo gen se sinte... ...chas proteínas generalizadas (se trata en el Capítulo 6). Una máquina proteica co... ...ubiquitina ligasa SCF, con sus partes intercambiables, también utiliza de una manera ... la información genética de las células, puesto que se pueden desarrollar nuevas ... de todo el complejo simplemente produciendo versiones alternativas de una de ...nidades.

...nudo la activación de máquinas proteicas supone ...icionamiento en lugares determinados

...los científicos han conocido más detalles acerca de la biología celular, han descu... ...ayores grados de sofisticación en los procesos químicos celulares. Así, no sólo co... ...que las máquinas proteicas desempeñan funciones predominantes sino que ...mente se ha descrito que la mayoría de estas máquinas se forman en lugares deter... ...de la célula y sólo se activan dónde y cuándo son necesarias. Utilizando proteínas ...marcadas con GFP fluorescente en células vivas (véase p. 593), los biólogos celula... ...do capaces de seguir el reposicionamiento de proteínas individuales que tiene lu... ...puesta a señales específicas. A menudo, cuando determinadas moléculas señal ...res se unen a receptores de la membrana plasmática, y reclutan un conjunto de ...eínas hacia la superficie interior de la membrana plasmática, forman máquinas ...que conducen la señal. Como ejemplo, en la **Figura 3–80**A se ilustra el rápido des... ...o de una enzima proteína quinasa C (PKC) hacia un complejo proteico en la ... plasmática, donde se asocia con determinadas proteínas fosforilándolas.

...n más de 10 PKC diferentes en las células humanas, que se diferencian tanto en su ... regulación como en su función. Cuando son activadas, estas enzimas se desplazan ... citoplasma hasta diferentes localizaciones intracelulares, formando complejos es... ...con otras proteínas, lo que les permite fosforilar otros sustratos proteicos (Figura ... Las ubiquitinas ligasa SCF también pueden desplazarse a lugares específicos de fun... ...momentos apropiados. Como comentaremos cuando se describa la señalización ...n el Capítulo 15, frecuentemente los mecanismos suponen la fosforilación de pro... ...mo **proteínas de armazón** que unen grupos de proteínas activadoras, inhibidoras, ...ras y proteínas sustrato, en lugares determinados de la célula.

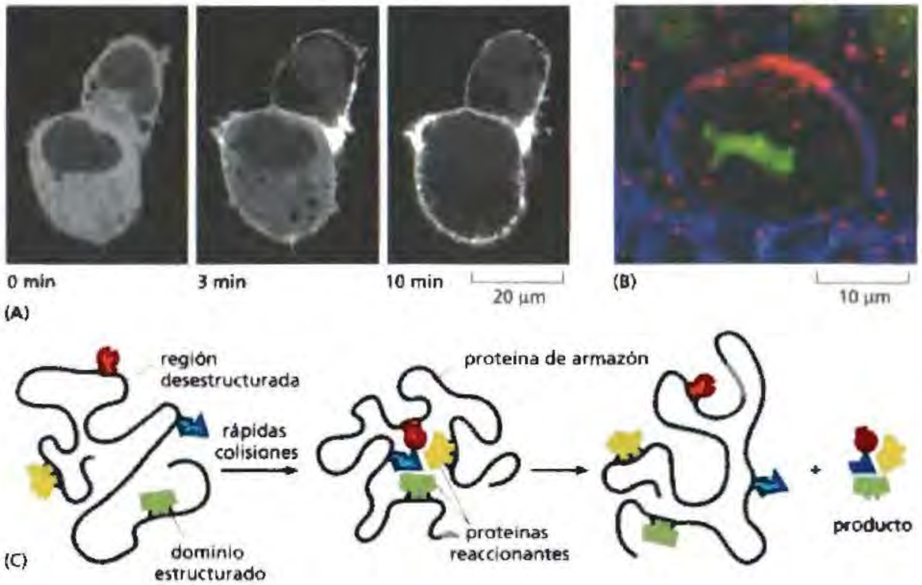


Figura 3-80 Ensamblaje de máquinas proteicas en lugares determinados de la célula. (A) En respuesta a una señal (en este caso un éster de phorbol), la subespecie gamma de la proteína quinasa C se desplaza con rapidez desde el citosol hasta la membrana plasmática. La proteína quinasa es fluorescente en estas células vivas porque un gen modificado artificialmente dentro de la célula codifica una proteína de fusión que une la quinasa a una proteína verde fluorescente GFP (*green fluorescent protein*). (B) Asociación específica de una subespecie diferente de la proteína quinasa C (aPKC) con la punta apical de un neuroblasto en diferenciación de un embrión temprano de *Drosophila*. La quinasa está teñida de *rojo* y el núcleo celular de *verde*. (C) Esquema que ilustra de qué forma una simple proximidad generada por proteínas de armazón puede incrementar en gran medida la velocidad de las reacciones en la célula. En este ejemplo, largas regiones desestructuradas de cadena polipeptídica de una gran proteína de armazón conectan series de dominios desestructurados que unen un conjunto de proteínas reaccionantes. Las regiones desestructuradas actúan como "correas" flexibles que incrementan de forma notable la velocidad de las reacciones al generar rápidas colisiones al azar de todas las proteínas que están unidas a la proteína de armazón. (Para un ejemplo más sencillo, véase la Figura 16-38.) (A, de N. Sakai et al., *J. Cell Biol.* 139:1465-1476, 1997. Con autorización de The Rockefeller University Press. B, cortesía de Andreas Wodarz, Instituto de Genética, Universidad de Düsseldorf, Alemania.)

Este fenómeno general se conoce como ***proximidad inducida*** y explica la observación (de otra forma difícil de entender) de que a menudo formas de enzimas ligeramente diferentes, con el mismo lugar catalítico, desempeñan funciones muy diferentes. Las células cambian la localización de sus proteínas modificándolas covalentemente de formas muy diferentes, como parte de un "código de regulación" que describiremos a continuación. Estas modificaciones generan sobre las proteínas lugares a través de los cuales se unen a proteínas de armazón específicas, de forma que se agrupan las proteínas necesarias para reacciones particulares en determinadas regiones de la célula. La mayoría de las reacciones biológicas están catalizadas por grupos de 5 o más proteínas, y a menudo para que la reacción tenga lugar es necesario un agrupamiento de proteínas de este tipo. Por lo tanto, los armazones permiten a las células compartimentar reacciones incluso en ausencia de membranas. A pesar de que el descubrimiento de que este fenómeno es general todavía es reciente, este tipo de agrupamiento es particularmente obvio en el núcleo celular (véase Figura 4-69).

Muchas proteínas de armazón son bastante diferentes a la cullina, ilustrada previamente en la Figura 3-79: en lugar de unir a las proteínas en posiciones precisas unas respecto a las otras, las proteínas que interaccionan se hallan unidas a regiones no estructuradas de la cadena polipeptídica. Este hecho mantiene las proteínas agrupadas haciendo que colisionen entre sí frecuentemente en orientaciones al azar -algunas de las cuales conducen a reacciones productivas (Figura 3-80C). En esencia este mecanismo acelera notablemente las reacciones y genera una concentración local muy elevada de las especies reaccionantes. Por esta razón, la utilización de proteínas de armazón representa un camino especialmente versátil de controlar los procesos químicos de la célula (véase también la Figura 15-61).

Tabla 3-3 Algunas moléculas unidas mediante enlaces covalentes a proteínas regulan la función de la proteína

GRUPO MODIFICADO	ALGUNAS FUNCIONES DESTACADAS
Fosfato en Ser, Thr o Tyr	Dirige el ensamblaje de proteínas formando grandes complejos (véase Figura 15-19).
Metil en Lys	Ayuda a generar códigos de histonas en la cromatina mediante la formación de mono-, di-o tri-metil lisina (véase Figura 4-38).
Acetil en Lys	Ayuda a generar códigos de histonas en la cromatina (véase Figura 4-38).
Grupo **palmitil** en Cys	La unión de estos ácidos grasos dirige la asociación de proteínas con la membrana (véase Figura 10-20).
N-acetilglucosamina en Ser o Thr	Controla la actividad enzimática y la expresion génica de la homeostasis de la glucosa.
Ubiquitina en Lys	La adición de monoubiquitina regula el transporte de proteínas de membrana en vesículas (véase Figura 13-58).
	Una cadena de poliubiquitinas marca una proteína para ser degradada (véase Figura 3-79).

La ubiquitina es un polipéptido de 76 aminoácidos; existen al menos otras 10 proteínas relacionadas con la ubiquitina, como SUMO, que modifican proteínas mediante vías similares.

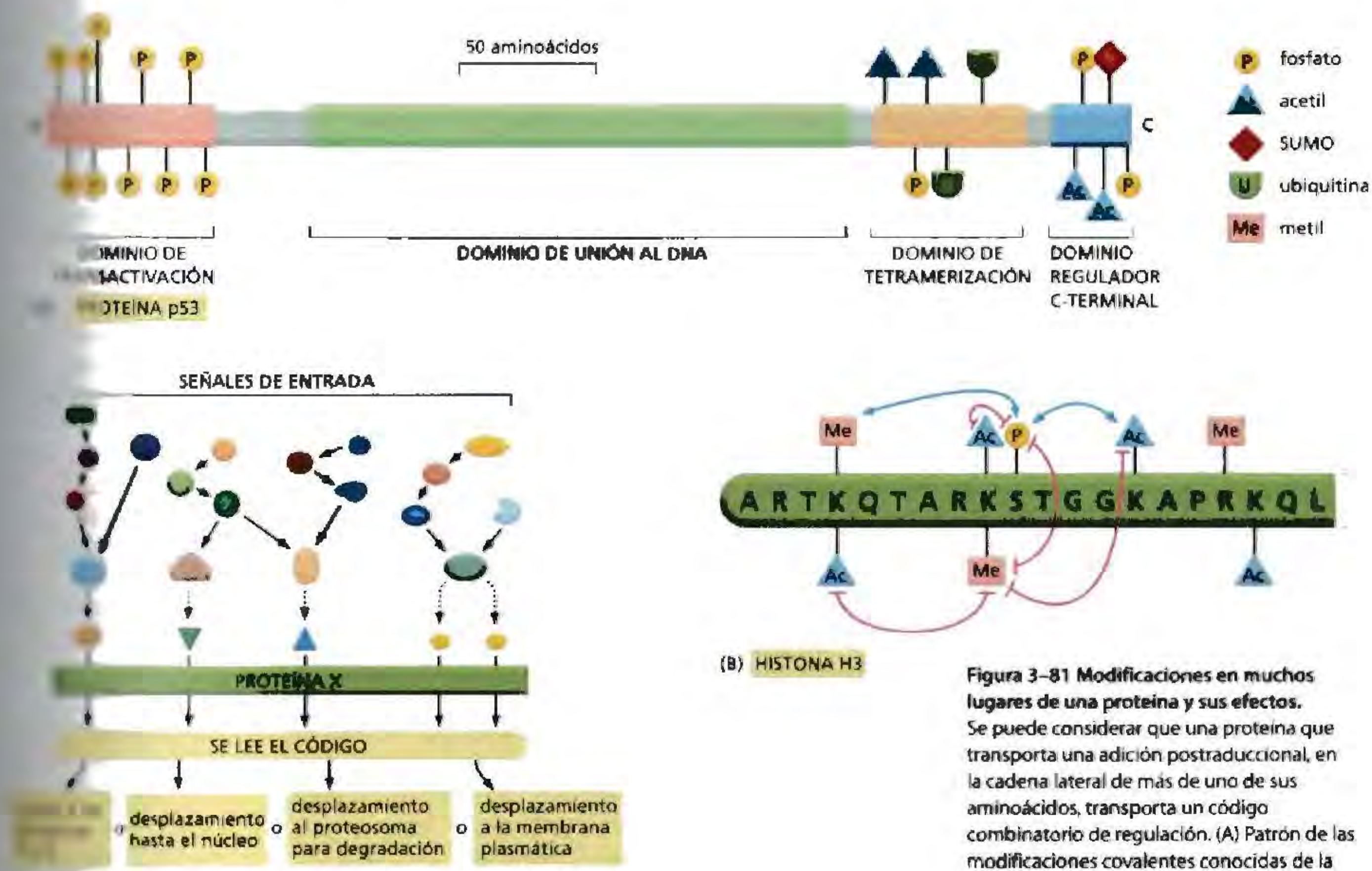


Figura 3–81 Modificaciones en muchos lugares de una proteína y sus efectos. Se puede considerar que una proteína que transporta una adición postraduccional, en la cadena lateral de más de uno de sus aminoácidos, transporta un código combinatorio de regulación. (A) Patrón de las modificaciones covalentes conocidas de la proteína p53; la ubiquitina y la SUMO son polipéptidos relacionados (véase Tabla 3–3). (B) Posibles modificaciones de los primeros 20 aminoácidos del extremo N-terminal de la histona H3; se muestran no sólo sus localizaciones sino también sus efectos activadores (*azul*) e inhibidores (*rojo*) sobre la adición de modificaciones covalentes vecinas. Además de los efectos mostrados, la acetilación y la metilación de una lisina son reacciones mutuamente excluyentes (véase Figura 4-38). (C) Esquema en el que se muestra la manera general mediante la cual se añaden (o se eliminan) modificaciones en varios lugares de una proteína mediante redes de señales, y de qué forma se leen los códigos de regulación combinatorios resultantes alterando el comportamiento celular.

Muchas proteínas están controladas por modificaciones covalentes en muchos lugares

[illegible] hora hemos descrito un tipo de modificación postraduccional de proteínas –en el que [illegible] to se une covalentemente a una cadena lateral de un aminoácido (véase la Figura [illegible] n embargo, también pueden ocurrir muchos otros tipos de modificaciones, de las que [illegible] en más de 200 tipos distintos.

[illegible] poner de relieve esta variedad, en la **Tabla 3–3** se presenta un subgrupo de modifica- [illegible] grupos que desempeñan funciones reguladoras conocidas. Como ocurre en el caso [illegible] ión del fosfato, estos grupos pueden ser añadidos y eliminados de las proteínas, de [illegible] con las necesidades específicas de la célula.

[illegible] e que un elevado número de proteínas son modificadas en más de una cadena la- [illegible] aminoácido, de forma que diferentes sucesos de regulación producen diferentes pa- [illegible] de estos tipos de modificaciones. Un ejemplo extraordinario es la proteína p53, que [illegible] ña un papel central en el control de la respuesta celular a circunstancias adversas [illegible] p. 1105). Mediante cuatro tipos de adiciones moleculares diferentes esta proteína [illegible] er modificada en 20 lugares diferentes (**Figura 3–81**A). Debido a que son posibles un [illegible] enorme de combinaciones diferentes de estas 20 modificaciones, en principio el [illegible] rtamiento de la proteína puede ser alterado de múltiples maneras. Además, el patrón [illegible] ificaciones de una proteína puede determinar su susceptibilidad a modificaciones [illegible] ores, como se ilustra en la Figura 3–81B para la histona H3.

[illegible] o recientemente los biólogos han empezado a reconocer que cada conjunto de mo- [illegible] nes covalentes de proteínas constituye un importante *código de regulación combi-* [illegible]. Cuando se añaden o eliminan de una proteína determinadas modificaciones, este [illegible] genera diferentes modificaciones del comportamiento de la proteína –cambiando la [illegible] ad o la estabilidad de la proteína, su pareja de unión y su localización específica en el [illegible] de la célula (Figura 3–81C). Todo ello le permite a la célula responder rápidamente y [illegible] gran versatilidad a cambios de condición o de entorno.

Una compleja red de interacciones proteicas subyace tras la función celular

Los biólogos celulares se enfrentan a muchos retos en esta era "postgenoma" en la que se conocen las secuencias completas de diferentes genomas. Uno de los retos consiste en la necesidad de diseccionar y reconstruir cada una de las miles de máquinas proteicas que existen en un organismo como el nuestro. Para entender estos complejos proteicos, cada uno de ellos tiene que ser reconstituido a partir de sus partes proteicas purificadas, de forma que podamos estudiar su modo detallado de actuar bajo condiciones controladas en un tubo de ensayo, libre de otros componentes celulares. Sólo esto, ya constituye un trabajo gigantesco. Pero ahora sabemos que cada uno de estos subcomponentes de una célula también interacciona con otros conjuntos de macromoléculas, generando una extensa red de interacciones proteína-proteína y proteína-ácido nucleico por toda la célula. Entonces, para entender de forma correcta el funcionamiento de la célula también es necesario analizar con detalle muchas de estas otras interacciones.

Cierta idea de la complejidad de las redes proteicas intracelulares puede extraerse de un ejemplo particularmente bien estudiado descrito en el Capítulo 16: las varias docenas de proteínas que interaccionan con el citoesqueleto de actina en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (véase Figura 16–18). También se puede estimar de una forma general el número de estas interacciones proteína-proteína. En las bases de datos de proteínas de Internet existe libremente accesible una enorme cantidad de información valiosa: decenas de miles de estructuras tridimensionales de proteínas y decenas de millones de secuencias proteicas derivadas de las secuencias de nucleótidos de los genes. Los científicos han desarrollado nuevos métodos para poder manejar esta gran fuente de información que nos debe permitir avanzar en nuestro conocimiento de las células. Concretamente, combinando la bioinformática basada en ordenadores con las tecnologías de la robótica y de los microchips (véase p. 574) podemos investigar miles de proteínas en un solo conjunto de experimentos. La **proteómica** es un término que a menudo se utiliza para describir el tipo de investigación dirigida en el análisis de las proteínas a gran escala, análogo al término *genómica* que describe el análisis a gran escala de secuencias de DNA y de genes.

Los biólogos utilizan dos métodos diferentes de análisis a gran escala para estudiar las interacciones de unión directa entre muchas proteínas diferentes en una célula. El método inicial se basaba en la genética: a través de una ingeniosa técnica conocida como análisis de híbridos de levadura (véase Figura 8–24), se pudieron analizar cientos de miles de interacciones entre miles de proteínas en levaduras en un nematodo y en la mosca de la fruta *Drosophila*. Más recientemente un método bioquímico basado en el marcaje de afinidad (*affinity tagging*) y espectrometría de masas ha ganado adeptos (se analiza en el Capítulo 8), ya que parece que produce menos falsos resultados. Los resultados de éstos y otros análisis que predicen interacciones de unión entre proteínas se han tabulado y organizado en las bases de datos de Internet. Esta información permite a los biólogos celulares que estudian un pequeño conjunto de proteínas, descubrir otras proteínas de la misma célula que pueden unirse y, por tanto, interactuar con este conjunto de proteínas. Cuando lo representamos en forma de *mapa de interacciones proteicas*, cada proteína está representada por un rectángulo o un punto en una red bidimensional, con líneas que conectan aquellas proteínas que se ha descubierto que interaccionan entre sí.

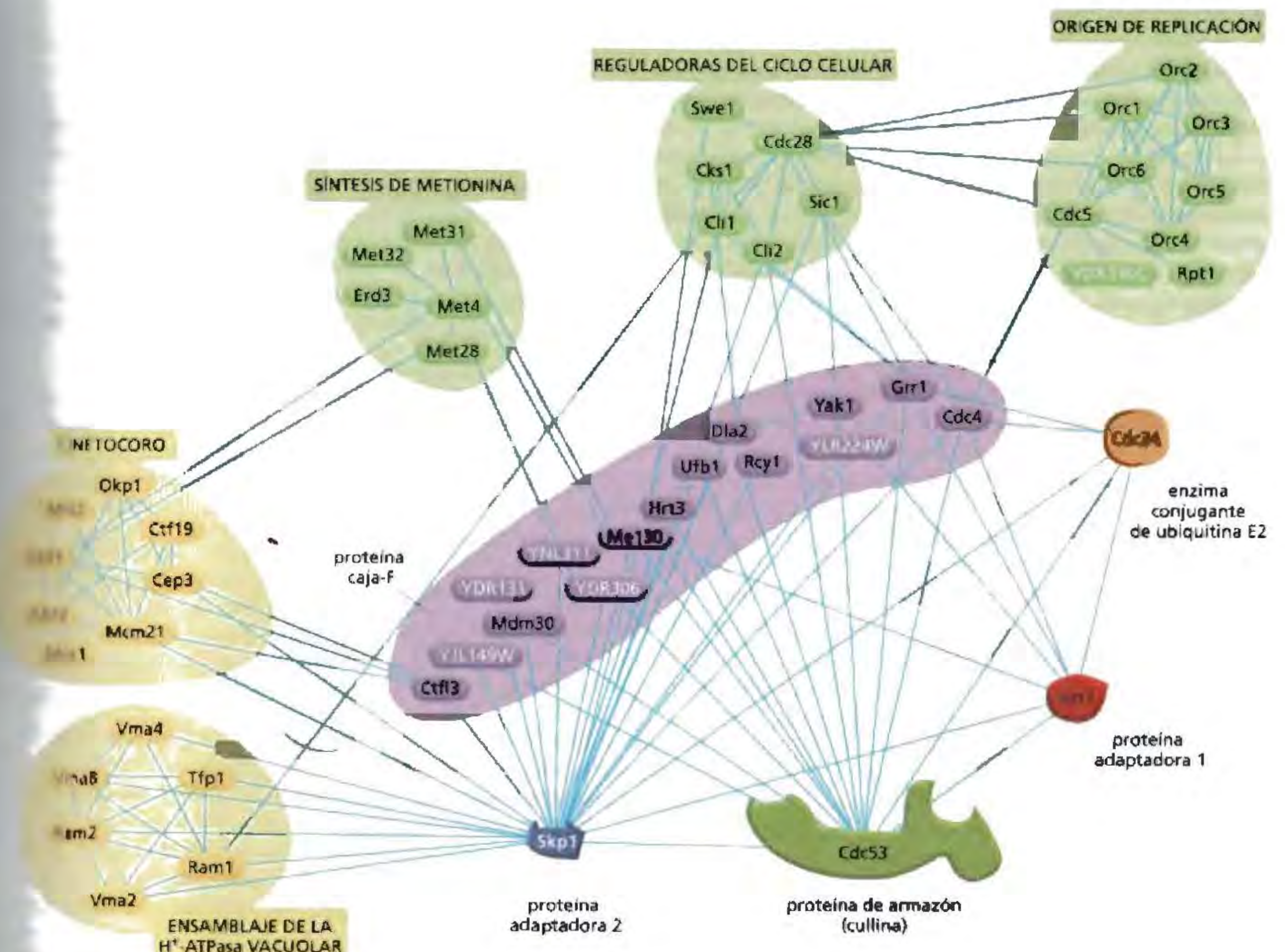
Cuando se representan centenares o miles de proteínas en el mismo mapa, la red del diagrama se vuelve extraordinariamente compleja e ilustra la enorme cantidad de cosas que todavía tenemos que aprender antes de poder llegar a entender el funcionamiento de una célula. Resultan mucho más útiles las subsecciones de estos mapas, centradas en algunas proteínas de interés. Así, la **Figura 3–82** muestra una red de interacciones proteína-proteína para las cinco proteínas que forman la ubiquitina ligasa SCF de células de levadura (véase Figura 3–79). Cuatro de las subunidades de la ligasa están localizadas en la parte inferior derecha de la Figura 3–82. La otra subunidad, la caja-F, que actúa como brazo de unión al sustrato, aparece como un conjunto de 15 productos génicos diferentes que se unen a la proteína adaptadora 2 (la proteína Skp1). A lo largo de las zonas superior e izquierda de la figura se encuentran grupos de otras interacciones proteicas, sombreadas en *verde* y en *amarillo*. Tal como se indica, estos conjuntos de proteínas actúan en el origen de replicación del DNA, en la regulación del ciclo celular, en la síntesis de metionina, en el cinetocoro y en el ensamblaje de la ATPasa-H^+ vacuolar. Esta figura sirve de ejemplo para explicar de qué forma se utilizan los mapas de interacciones proteicas de este tipo y el significado que tienen.

Los mapas de interacciones proteicas son útiles para identificar las funciones semejantes de proteínas no caracterizadas previamente. Ejemplos de ello son los productos de los genes que hasta ahora hemos inferido que existen a partir de la secuencia genómica, como son las seis proteínas de la figura que no tienen abreviaturas sencillas de tres letras (*letras blancas* que empiezan por Y). Una de ellas, el producto denominado por ello *pauta abierta de lectura* YDR196C, está localizada en el origen de replicación del grupo, por lo que probablemente participa en el inicio de una nueva horquilla de replicación. Las otras cinco proteínas de este esquema son proteínas caja-F que se unen a Skp1; por tanto es probable que actúen como una parte de la ubiquitina ligasa, como un brazo de unión a sustratos que reconozcan diferentes proteínas diana. Sin embargo, como explicaremos a continuación, ninguna asignación puede considerarse válida sin información adicional.

Las redes de interacción proteica han de ser interpretadas con cautela, ya que como resultado de la eficiente utilización de la información genética por parte de la evolución, una misma proteína puede formar parte de dos complejos proteicos diferentes con funciones diferentes. Así, a pesar de que la proteína A se una a la proteína B y la proteína B se una a la proteína C, no es necesario que la proteína A y la proteína C participen en el mismo proceso. Por ejemplo, a partir de minuciosos estudios bioquímicos sabemos que las funciones de Skp1 en el cinetocoro y en el ensamblaje de la ATPasa-H^+ vacuolar (*sombreado amarillo*) son diferentes de su función en la ubiquitina ligasa SCF. De hecho, únicamente las tres funciones restantes de Skp1 que se ilustran en el diagrama –síntesis de metionina, regulación del ciclo celular y origen de replicación (*sombreado verde*)– suponen ubiquitinación.

En la comparación entre especies, aquellas proteínas que muestran patrones similares de interacción entre ambos mapas de interacciones proteicas probablemente desem-

Figura 3–82 Mapa de algunas interacciones proteína-proteína de la ubiquitina ligasa SCF y otras proteínas de la levadura *S. cerevisiae*. Los símbolos y los colores que se utilizan para las 5 proteínas ligasa están en la Figura 3-79. Obsérvese que las 15 proteínas caja-F diferentes están sombreadas (*púrpura*); las que tienen las letras blancas (empezando por Y) sólo son conocidas a partir de la secuencia del genoma como pauta abierta de lectura. Para detalles adicionales, véase el texto. (Cortesía de Peter Bowers y David Eisenberg, UCLA-DOE Institute for Genomics and Proteomics, UCLA.)



peñan la misma función en la célula. Así, a medida que los científicos generen mapas cada vez más detallados de organismos diferentes, los resultados serán cada vez más útiles para inferir funciones proteicas. Estas comparaciones de mapas proteicos resultan herramientas especialmente poderosas para descifrar las funciones de las proteínas humanas. Existe una enorme cantidad de información directa sobre funciones proteicas que se puede obtener por ingeniería genética, mutacional y análisis genético en organismos modelo –como levaduras, gusanos y moscas– que no está asequible en humanos.

Los datos disponibles sugieren que una proteína típica en una célula humana podría interaccionar con una cantidad de proteínas diferentes que oscila entre 5 y 15. A menudo cada uno de los diferentes dominios de una proteína multidominio se une a un grupo diferente de parejas; de hecho, podemos especular que las extraordinariamente grandes estructuras multidominio observadas en las proteínas humanas pudieron evolucionar facilitando estas interacciones. Dada la enorme complejidad de las redes de interacción de macromoléculas en las células (**Figura 3–83**), el desciframiento completo del significado de su función mantendrá ocupados a los científicos durante siglos.

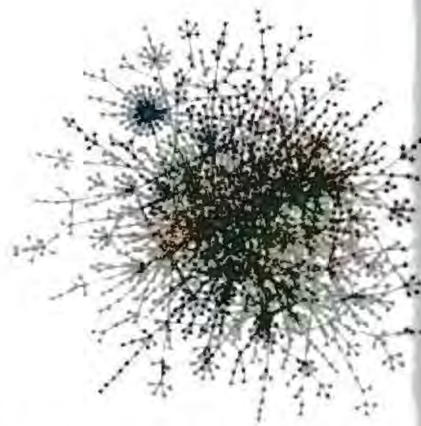


Figura 3–83 Una red de interacciones de unión entre proteínas en una célula de levadura. Cada línea que conecta un par de puntos (proteínas) indica una interacción proteína-proteína. (De A. Guimerá y M. Sales-Pardo, *Mol. Syst. Biol.* 2:42, 2006. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

Resumen

Las proteínas pueden formar máquinas químicas muy sofisticadas, cuya función depende en gran parte de las propiedades químicas detalladas de su superficie. Los lugares de unión para ligandos están constituidos por cavidades de la superficie, en las cuales se localizan de una forma precisa diversas cadenas laterales gracias al plegamiento de la proteína. De esta forma, las cadenas laterales de aminoácidos, normalmente no-reactivas, puede hallarse activadas formando y rompiendo enlaces covalentes. Las enzimas son proteínas catalíticas que aceleran enormemente las velocidades de las reacciones uniéndose a los estados de transición de alta energía de una reacción determinada; también desarrollan catálisis ácidas y básicas de forma simultánea. A menudo, las velocidades de las reacciones enzimáticas son tan rápidas que sólo están limitadas por la difusión; las velocidades pueden incrementarse aún más si las enzimas que actúan de forma secuencial sobre un sustrato se hallan unidas formando un mismo complejo multienzimático o si las enzimas y sus sustratos están confinadas en el mismo compartimiento de la célula.

Las proteínas cambian reversiblemente de conformación cuando algunos ligandos se unen a su superficie. Los cambios alostéricos de conformación de una proteína producidos por un ligando pueden afectar a un segundo ligando. Este tipo de relación entre dos lugares de unión de ligandos proporciona un mecanismo crucial de regular procesos celulares. Por ejemplo, los procesos metabólicos están controlados por retroalimentación: algunas moléculas pequeñas inhiben y otras activan a enzimas iniciales del proceso. Por lo general, las enzimas reguladas de esta manera forman ensamblajes simétricos, permitiendo que se produzcan cambios conformacionales cooperativos que generan respuestas escalonadas a los ligandos.

La utilización de energía química puede dirigir de forma unidireccional los cambios de conformación de las proteínas. Por ejemplo, acoplando cambios conformacionales alostéricos a la hidrólisis de ATP, las proteínas pueden desarrollar trabajo útil, como generar una fuerza mecánica o movimiento a lo largo de grandes distancias en una sola dirección. Las estructuras tridimensionales de varias proteínas, determinadas por cristalografía de rayos X, han revelado de qué forma un pequeño cambio local generado por la hidrólisis de un nucleósido trifosfato se amplifica dando lugar a cambios mayores en otros lugares de la proteína. De esta forma estas proteínas son capaces de actuar como transductores de información, factores de ensamblaje, motores, o como bombas unidas a membrana. Se forman "máquinas proteicas" altamente eficientes mediante la incorporación de muchas subunidades proteicas diferentes a un gran agregado que coordina los movimientos alostéricos de cada uno de los componentes. Ahora se sabe que estas máquinas realizan la mayoría de las reacciones más importantes en las células.

Las proteínas están sujetas a muchas modificaciones reversibles postraduccionales, como la adición covalente de un grupo fosfato o un grupo acetil a determinadas cadenas laterales de aminoácido. La adición de estos grupos modificantes se utiliza para regular la actividad de una proteína, cambiando su conformación, su unión a otras proteínas y su localización en la célula. Una proteína celular típica interactúa con más de 5 parejas diferentes. Utilizando las nuevas técnicas de proteómica, los biólogos pueden analizar en un conjunto de experimentos miles de proteínas. Un resultado importante es la producción de mapas detallados de interacciones proteicas, que intentan describir todas las interacciones de unión que ocurren entre los miles de proteínas de una célula.

PROBLEMAS

...afirmaciones son ciertas? Explicar por qué sí o por qué no

Cada cadena de una lámina β es una hélice con dos ami...s por vuelta.

Las asas de polipéptidos que sobresalen de la superficie ... proteínas a menudo forman los lugares de unión a otras ...las.

Una enzima colocada a elevadas concentraciones de sus...ga a su velocidad máxima debido a que el número de lu...tivos, a los que se une el sustrato, es fijo.

...levadas concentraciones de enzima dan lugar a elevados ...s de recambio.

Las enzimas como la aspartato transcarbamilasa, que ...nsiciones alostéricas cooperativas, contienen muchas ...ades idénticas.

La adición y eliminación continuas de fosfatos por pro...quinasa y proteínas fosfatasa supone un derroche de ener... que ambas acciones combinadas consumen ATP–, pero es ...ecuencia necesaria de una regulación efectiva por fosfo...

...r los siguientes problemas

Considerar la siguiente afirmación: "Para producir una ... de cada una de las posibles cadenas polipeptídicas de ...oácidos de longitud, serían necesarios más átomos de ... existen en el universo". Dado el tamaño del universo, ¿la ...ón tiene posibilidades de ser cierta? Contar los átomos es ...o difícil y es mejor considerar el problema desde el pun...a de la masa. La masa del universo observable se estima ... 10^{80} gramos, orden de magnitud arriba o abajo. Asu... que la masa de un aminoácido medio es de unos 110 dal...l sería la suma de las masas de una molécula de cada ...s posibles cadenas polipeptídicas de 300 aminoácidos de ...? ¿Sería mayor que la masa del universo?

Una estrategia habitual para determinar la distancia de la ... entre las proteínas consiste en buscar en las bases de da...ndo una secuencia corta indicativa de una determinada ... de la proteína. ¿Por qué es mejor buscar con una secuen... que con una secuencia larga? ¿No tendríamos más posi...s de éxito en la base de datos con una secuencia larga?

...l denominado motivo "kelch" consiste en cuatro lámi... que forman lo que se conoce como un propulsor β. Por lo ... se encuentra repetido entre cuatro y siete veces formando ...nio repetido kelch en una proteína multidominio. En la ... P3–1 se presenta uno de estos dominios repetidos kelch. ¿Es ... clasificar este dominio como "en línea" o "enchufe"?

La titina, que tiene un peso molecular de 3×10^6 daltons, ... proteína más grande descrita hasta la actualidad. Las molé... titina van desde los filamentos gruesos hasta los discos Z ... fibras musculares; parece que actúan como unos resortes ... mantienen los filamentos gruesos centrados en el sarcómero. ... está compuesta de un gran número de secuencias de in...globulina (Ig) repetidas de 89 aminoácidos, cada una de las ... plegada formando un dominio de unos 4 nm de longi... Figura P3–2A).

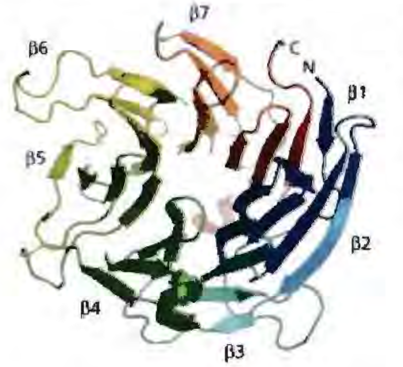


Figura P3–1 El dominio repetido kelch de la galactosa oxidasa de *D. dendroides* (Problema 3–9). Se indican las siete láminas β propulsoras. Los extremos C y N se indican por C y N.

Se sospecha que el comportamiento de resorte de la titina está generado por el desplegamiento y replegamiento secuencial de cada dominio Ig. Para comprobar esta hipótesis, se utiliza el microscopio de fuerza atómica, que permite tomar un extremo de una molécula proteica y empujarlo con una fuerza suave y controlada. Para el caso de un fragmento de la titina de siete dominios repetidos de Ig, este experimento proporciona la gráfica de diente de sierra entre fuerza y extensión producida, que se muestra en la Figura P3–2B. Cuando el experimento se repite en una solución de urea 8 M (suficiente para desnaturalizar las proteínas), los dientes de sierra desaparecen y la extensión medida se vuelve mucho más larga para una fuerza dada. Si el experimento se repite después de que la proteína se haya entrecruzado mediante un tratamiento con glutaraldehído, de nuevo los dientes de sierra desaparecen pero la extensión se vuelve menor para una fuerza dada.

A. ¿Son consistentes estos resultados con la hipótesis respecto a que el comportamiento de resorte de la titina es debido al desplegamiento y replegamiento secuencial de los dominios Ig? Explicar el razonamiento.

B. ¿La extensión de cada posible desplegamiento de un dominio es de la magnitud esperada? (En una cadena polipeptídica extendida los aminoácidos se sitúan a unos 0,34 nm de sus vecinos.)

C. ¿Por qué cada pico de la Figura P3–2B es un poco mayor que el anterior?

D. ¿Por qué la fuerza cae tan abruptamente después de cada pico?

3–11 A menudo se dice que los complejos proteicos están formados de subunidades (es decir, proteínas sintetizadas individualmente) y no como largas cadenas únicas, porque el primer



Figura P3–2 Gráfica en diente de sierra de la titina (Problema 3–10). (A) Estructura de un dominio Ig. (B) Fuerza en piconewtons respecto a extensión en nanómetros obtenida por microscopía de fuerza atómica.

caso tiene una probabilidad mayor de dar lugar a una estructura final correcta.

A. Asumiendo que la maquinaria de síntesis de proteínas incorpora un aminoácido incorrecto cada 10.000 aminoácidos insertados, calcular al porcentaje de ribosomas bacterianos que se ensamblarían correctamente si las proteínas se sintetizaran como una larga cadena respecto a lo que ocurre sintetizándose en forma de proteínas individuales. Para facilitar el cálculo se asume que el ribosoma está compuesto de 50 proteínas, cada una de ellas de 200 aminoácidos de longitud y que las subunidades (correctas o incorrectas) se ensamblan con la misma probabilidad en el cromosoma completo. [La probabilidad de que un polipéptido sea sintetizado correctamente, P_C, es igual a la fracción correcta de cada operación, f_C, dividido por el número total de operaciones, n: $P_C = (f_C)^n$. Para un error de 1/10.000, $f_C = 0{,}9999$.]

B. La suposición de que las subunidades correctas y las incorrectas se ensamblan con la misma probabilidad, ¿es cierta? ¿Por qué sí o por qué no? ¿De qué forma un cambio en esta suposición afectará el cálculo del apartado A?

3–12 El virus del sarcoma de Rous (RSV: ***Rous sarcoma virus***) transporta un oncogén denominado *Src* que codifica una proteína tirosina quinasa que está siempre activa, la cual da lugar a la proliferación celular descontrolada. Normalmente, Src transporta un grupo ácido graso (el miristoilato) que le permite unirse a la cara citoplasmática de la membrana plasmática. Una versión mutante de Src que no le permite unirse a miristoilato, no se une a la membrana. La infección de células con RSV que codifica la versión normal o la mutante de Src da lugar a la misma elevada actividad proteína tirosina quinasa, pero el mutante no genera proliferación celular.

A. Asumiendo que todo el Src normal está unido a la membrana plasmática y que el mutante se distribuye por todo el citoplasma, calcular su concentración relativa en las cercanías de la membrana plasmática. Suponer para el cálculo que la célula es una esfera de 10 µm de radio y que el mutante se distribuye por todo el citoplasma mientras que el normal está confinado a un espacio de 4 nm de grosor bajo la membrana. [Para este problema considerar que la membrana no tiene grosor. El volumen de una esfera es $(4/3)\pi r^3$.]

B. La diana X para la fosforilación de *Src* reside en la membrana. Explicar por qué el mutante Src no causa proliferación celular.

3–13 Un anticuerpo se une a una proteína con una constante de equilibrio, K, de 5×10^9 M^{-1}. Cuando se une a una segunda proteína, relacionada con la primera, forma tres enlaces de hidrógeno menos, reduciendo su afinidad de unión en 2,8 kcal/mol. ¿Cuál es la K para la unión de esta segunda proteína? (La variación de energía libre se relaciona con la constante de equilibrio mediante la ecuación $\Delta G° = -2{,}3\ RT \log K$, siendo $R = 1{,}98 \times 10^{-3}$ kcal/(mol K) y $T = 310$ K.)

3–14 En bacterias, la proteína SmpB se une a una especie particular de tRNA, el tmRNA, eliminando la proteína incompleta sintetizada a partir de mRNA truncados. Si se hace la gráfica de la unión de SmpB a tmRNA como fracción respecto a la relación entre tmRNA unida y la concentración de SmpB, se obtiene una sigmoide simétrica como la que se presenta en la **Figura P3–3**. Esta curva es un indicador visual de una relación muy frecuente entre K_d y concentración y tiene una aplicación muy general. La expresión general para la fracción unida de ligando deriva de la ecuación para K_d (K_d = [Pr][L]/[Pr–L]), sustituyendo ($[L]_{TOT}$ – [L]) por [Pr–L] y reordenándola. Debido a que la concentración total de ligando ($[L]_{TOT}$) es igual al ligando libre ([L]) más el ligando unido ([Pr–L])

$$\text{fracción unida} = [L]/[L]_{TOT} = [Pr]/([Pr] + K_d)$$

Para SmpB y tmRNA, la fracción unida = $[tmRNA]/[tmRNA]_{TOT}$ = [SmpB]/([SmpB] + K_d). Utilizando esta relación calcular la fracción de tmRNA unida para concentraciones de SmpB iguales a $10^4\ K_d$, $10^3\ K_d$, $10^2\ K_d$, $10^1\ K_d$, K_d, $10^{-1}K_d$, $10^{-2}K_d$, $10^{-3}K_d$ y $10^{-4}\ K_d$.

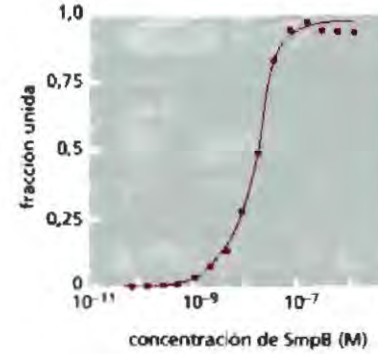


Figura P3–3 Fracción de tmRNA unida respecto a la concentración de SmpB (Problema 3–14).

3–15 Muchas enzimas siguen la ley cinética de Michaelis–Menten, que se puede resumir en la ecuación:

$$\text{velocidad} = V_{max}\,[S]/([S] + K_m)$$

donde V_{max} = velocidad máxima, [S] = concentración de sustrato y K_m = constante de Michaelis.

Resulta instructivo introducir algunos valores de [S] en la ecuación para ver cómo se modifica la velocidad. ¿Cuáles son las velocidades para [S] igual a cero, igual a K_m e igual a infinito?

3–16 La enzima hexoquinasa añade un fosfato a la D-glucosa pero ignora a su imagen especular, la L-glucosa. Supongamos que podemos sintetizar hexoquinasa a partir de D-aminoácidos, que son las imágenes especulares de los L-aminoácidos.

A. Asumiendo que la enzima "D" se pliega adoptando una conformación estable, ¿qué relación se obtendrá de la forma "L" de la enzima?

B. ¿La enzima "D" será capaz de añadir un fosfato a la L-glucosa e ignorar la D-glucosa?

3–17 ¿De qué forma una molécula de hemoglobina es capaz de unir oxígeno de forma eficiente en los pulmones y liberarlo también de forma eficiente en los tejidos?

3–18 La síntesis de los nucleótidos de purina AMP y GMP está precedida por una vía bifurcada que empieza en la ribosa 5-fosfato (R5P), como se muestra esquemáticamente en la **Figura P3–4**. Utilizando los principios de inhibición por retroalimentación, proponen una estrategia de regulación para esta vía que asegure un aporte adecuado tanto de AMP como de GMP y minimice la acumulación de intermediarios (*A–I*) cuando los aportes de AMP y GMP sean adecuados.

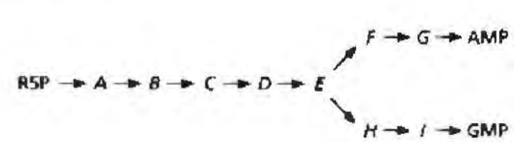


Figura P3–4 Diagrama esquemático de la vía metabólica de síntesis de AMP y de GMP a partir de R5P (Problema 3–18).

BIBLIOGRAFÍA

General

...zko JL & Stryer L (2006) Biochemistry, 6.ª ed. New York: WH ...

... Tooze J (1999) Introduction to Protein Structure, 2.ª ed. New York: ... Science.

... R (2005) Present at the Flood: How Structural Molecular Biology ... About. Sunderland, MA: Sinauer.

... Structure in Protein Chemistry. New York: Routledge.

... & Ringe D (2004) Protein Structure and Function. London: New ... Press.

... (1992) Protein Structure: New Approaches to Disease and Therapy. ... WH Freeman.

... y estructura de las proteínas

... (1973) Principles that govern the folding of protein chains. ... 223–230.

... Flexible peptides and cytoplasmic gels. Genome Biol 6:106–109.

... Strelkov SV (2001) Coiled coils: a highly versatile ... folding motif. Trends Cell Biol 11:82–88.

... & Klug A (1962) Physical principles in the construction of regular ... Cold Spring Harb Symp Quant Biol 27:1–24.

... (1995) The multiplicity of domains in proteins. Annu Rev Biochem ... 314.

... (2003) The discovery of the alpha-helix and beta-sheet, the ... structural features of proteins. Proc Natl Acad Sci USA ...–11210.

... H & Williams RC (1955) Reconstitution of active tobacco ... virus from its inactive protein and nucleic acid components. Proc ... Sci USA 41:690–698.

... & Olson AJ (2000) Structural symmetry and protein function. ... Biophys Biomol Struct 29:105–153.

... C (1992) Viruses. Curr Opin Struct Biol 2:293–299.

... C (2004) Whither structural biology? Nature Struct Mol Biol 11:12–15.

... Johanson L & Deutscher MP (2003) Organization of mammalian ... Mol Cell Biol 23:9318–9326.

... Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial ... and analysis of the human genome. Nature 409:860–921.

... D (2003) Coupled prediction of protein secondary and tertiary ... Proc Natl Acad Sci USA 100:12105–12110.

... (1973) Assembly of bacterial ribosomes. Science 179: 864–873.

... & Thornton JM (2005) Protein families and their evolution ... structural perspective. Annu Rev Biochem 74:867–900.

... & Corey RB (1951) Configurations of polypeptide chains with favored ... around single bonds: two new pleated sheets. Proc Natl Acad ... 37:729–740.

... Corey RB & Branson HR (1951) The structure of proteins: two ... bonded helical configurations of the polypeptide chain. Proc ... Sci USA 37:205–211.

... Schultz J, Copley RR et al. (2000) Evolution of domain families. Adv ... Chem 54:185–244.

... Understanding the functions of titin and nebulin. FEBS ... 44–48.

... ton M, Kerrison ND et al (2004) Structure, function and evolution ... domain proteins. Curr Opin Struct Biol 14:208–216.

... Kim SH (2003) Overview of structural genomics: from structure to ... Curr Opin Chem Biol 7:28–32.

... de las proteínas

... (1998) The cell as a collection of protein machines: preparing the ... generation of molecular biologists. Cell 92:291–294.

... (1992) Catalytic antibodies. Annu Rev Biochem 61:29–54.

... von Hippel PH (1985) Diffusion-controlled macromolecular ... Annu Rev Biophys Biophys Chem 14:131–160.

Bhattacharyya RP, Remenyi A, Yeh BJ & Lim WA (2006) Domains, motifs, and scaffolds: The role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. Annu Rev Biochem 75:655–680.

Bourne HR (1995) GTPases: a family of molecular switches and clocks. Philos Trans R Soc Lond B 349:283–289.

Braden BC & Poljak RJ (1995) Structural features of the reactions between antibodies and protein antigens. FASEB J 9:9–16.

Dickerson RE & Geis I (1983) Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings.

Dressler D & Potter H (1991) Discovering Enzymes. New York: Scientific American Library.

Eisenberg D, Marcotte, EM, Xenarios, I & Yeates TO (2000) Protein function in the post-genomic era. Nature 405:823–826.

Fersht AR (1999) Structure and Mechanisms in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis. New York: WH Freeman.

Johnson, LN & Lewis RJ (2001) Structural basis for control by phosphorylation. Chem Rev 101:2209–2242.

Kantrowitz ER & Lipscomb WN (1988) Escherichia coli aspartate transcarbamoylase: the relation between structure and function. Science 241:669–674.

Khosla C & Harbury PB (2001) Modular enzymes. Nature 409:247–252.

Kim E & Sheng M (2004) PDZ domain proteins of synapses. Nature Rev Neurosci 5:771–781.

Koshland DE, Jr (1984) Control of enzyme activity and metabolic pathways. Trends Biochem Sci 9:155–159.

Kraut DA, Carroll KS & Herschlag D (2003) Challenges in enzyme mechanism and energetics. Annu Rev Biochem 72:517–571.

Krogan NJ, Cagney G, Yu H et al (2006) Global landscape of protein complexes in the yeast Saccharomyces cerevisisae. Nature 440:637–643.

Lichtarge O, Bourne HR & Cohen FE (1996) An evolutionary trace method defines binding surfaces common to protein families. J Mol Biol 257:342–358.

Marcotte EM, Pellegrini M, Ng HL et al (1999) Detecting protein function and protein–protein interactions from genome sequences. Science 285:751–753.

Monod J, Changeux JP & Jacob F (1963) Allosteric proteins and cellular control systems. J Mol Biol 6:306–329.

Pawson T & Nash P (2003) Assembly of regulatory systems through protein interaction domains. Science 300:445–452.

Pavletich NP (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. J Mol Biol 287:821–828.

Pellicena P & Kuriyan J (2006) Protein-protein interactions in the allosteric regulation of protein kinases. Curr Opin Struct Biol 16:702–709.

Perutz M (1990) Mechanisms of Cooperativity and Allosteric Regulation in Proteins. Cambridge: Cambridge University Press.

Raushel F, Thoden, JB & Holden HM (2003) Enzymes with molecular tunnels. Acc Chem Res 36:539–548.

Radzicka A & Wolfenden R (1995) A proficient enzyme. Science 267:90–93.

Sato TK, Overduin M & Emr S (2001) Location, location, location: Membrane targeting directed by PX domains. Science 294:1881–1885.

Schramm VL (1998) Enzymatic transition states and transition state analog design. Annu Rev Biochem 67:693–720.

Schultz PG & Lerner RA (1995) From molecular diversity to catalysis: lessons from the immune system. Science 269:1835–1842.

Vale RD & Milligan RA (2000) The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. Science 288:88–95.

Vocadlo DJ, Davies GJ, Laine R & Withers SG (2001) Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. Nature 412:835–838.

Walsh C (2001) Enabling the chemistry of life. Nature 409:226–231.

Yang XJ (2005) Multisite protein modification and intramolecular signaling. Oncogene 24:1653–1662.

Zhu H, Bilgin M & Snyder M (2003) Proteomics. Annu Rev Biochem 72:783–812.

II

MECANISMOS GENÉTICOS BÁSICOS

Parte II
Capítulos

4 DNA, cromosomas y genomas

5 Replicación, reparación y recombinación del DNA

6 Cómo leen las células el genoma: del DNA a la proteína

7 El control de la expresión génica



DNA, cromosomas y genomas

4

La vida depende de la capacidad de las células para almacenar, recuperar y expresar las instrucciones genéticas necesarias para producir y mantener un organismo vivo. Esta información hereditaria se transmite de una célula a sus descendientes mediante la división celular, y de una generación de organismos a otra mediante las células reproductoras. Estas instrucciones se almacenan dentro de cada una de las células en forma de **genes**, esto es, elementos que contienen la información que determina las características de las especies como conjunto, así como de cada uno de sus individuos.

Desde la aparición de la genética como ciencia, al inicio del siglo XX, los científicos han intentado determinar la estructura química de los genes. La información de los genes se copia y se transmite desde una célula a sus células hijas, millones de veces durante la vida de un organismo pluricelular y supera este proceso con muy pocos cambios. ¿Qué tipo de molécula podría ser capaz de una replicación tan precisa e ilimitada y al mismo tiempo capaz de dirigir el desarrollo de un organismo y la vida diaria de una célula? ¿Qué tipo de instrucciones contiene la información genética? ¿Cómo se organizan físicamente estas instrucciones de modo que en el reducido espacio de una célula pueda caber la gran cantidad de información necesaria para el desarrollo y mantenimiento de un organismo?

Las respuestas a algunas de estas preguntas anteriores se empezaron a obtener durante los primeros años de la década de 1940, cuando se descubrió, a partir de estudios realizados en hongos sencillos, que la información genética consta esencialmente de instrucciones para producir proteínas. Las proteínas son las macromoléculas responsables de la mayor parte de las funciones celulares: actúan como bloques de construcción para las estructuras celulares y forman las enzimas, que catalizan todas las reacciones químicas (Capítulo 3); regulan la expresión génica (Capítulo 7); permiten la comunicación entre las células (Capítulo 15) y el movimiento celular (Capítulo 16). Las propiedades y funciones de una célula están determinadas por las proteínas que sintetiza. En una visión retrospectiva resulta difícil de imaginar qué otro tipo de instrucciones podría haber almacenado la información genética.

Las meticulosas observaciones realizadas en células y embriones a finales del siglo XIX, permitieron averiguar que la información hereditaria está contenida en los *cromosomas*, estructuras filamentosas en el núcleo de la célula eucariota que se hacen visibles al microscopio óptico cuando empieza la división celular (**Figura 4–1**). Más tarde, cuando fue posible realizar el análisis bioquímico, se encontró que los cromosomas están formados por ácido desoxirribonucleico (DNA) y proteína. Durante muchas décadas se creyó que el DNA era un elemento meramente estructural. Sin embargo, el otro avance crucial que tuvo lugar en la década de 1940 fue la identificación del DNA como el probable portador de la información

En este capítulo

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL DNA 197

EL DNA CROMOSÓMICO Y SU EMPAQUETAMIENTO EN LA FIBRA DE CROMATINA 202

REGULACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA 219

ESTRUCTURA GLOBAL DE LOS CROMOSOMAS 233

CÓMO EVOLUCIONAN LOS GENOMAS 245



Figura 4–1 Los cromosomas de las células. (A) Dos células vegetales adyacentes fotografiadas con un microscopio óptico. El DNA se ha teñido con un colorante fluorescente (DAPI) que se une a él. El DNA se encuentra en los cromosomas, que sólo son visibles al microscopio óptico cuando forman estructuras compactas propias del inicio de la división celular, como se muestra a la izquierda. La célula de la derecha, que no está en división, contiene los mismos cromosomas, pero éstos no se pueden distinguir con el microscopio óptico en esta fase del ciclo celular porque se encuentran en una conformación más extendida. (B) El esquema inferior ilustra los límites celulares y el estado de sus cromosomas. (A, por cortesía de Peter Shaw.)

genética. Este avance trascendental en el conocimiento de las células se produjo a partir de estudios de herencia en bacterias (**Figura 4–2**). Pero hasta principios de la década de 1950, tanto el mecanismo mediante el cual la información hereditaria se copia para ser transmitida de célula a célula, como la manera mediante la cual el DNA codifica las proteínas, constituyeron un misterio. El misterio se resolvió en 1953, cuando James Watson y Francis Crick predijeron correctamente la estructura del DNA. Como se menciona en el Capítulo 1, la estructura en doble hélice del DNA solucionó inmediatamente el problema de cómo se puede copiar o *replicar* esta molécula. También aportó los primeros indicios de cómo una molécula de DNA puede codificar la información para sintetizar proteínas utilizando la secuencia de sus subunidades. En la actualidad es tan fundamental para el pensamiento biológico el hecho de que el DNA es el material genético, que se nos hace difícil imaginar el vacío intelectual que llenó este descubrimiento.

Iniciaremos el capítulo describiendo la estructura del DNA. Veremos que, a pesar de su simplicidad química, la estructura y las propiedades químicas del DNA lo convierten en el soporte ideal de los genes. Luego consideraremos de qué forma las proteínas de los cromosomas ordenan y empaquetan el DNA. Este empaquetamiento debe ser ordenado, de manera que los cromosomas puedan ser replicados y distribuidos entre las células hijas en cada división. También se tiene que facilitar el acceso al DNA de los cromosomas, a las enzimas reparadoras de los daños que puede experimentar y a las proteínas especializadas que intervienen en la regulación de los genes. También describiremos cómo en los eucariotas el empaquetamiento del DNA es diferente a lo largo de cada cromosoma y cómo puede almacenar un importante registro del historial del desarrollo de una célula.

En las dos últimas décadas, se ha producido una revolución en nuestra capacidad para determinar la secuencia exacta de subunidades de moléculas de DNA. Como resultado de ello, actualmente conocemos del orden de tres mil millones de subunidades de DNA que contienen la información necesaria para producir un humano adulto a partir de un oocito fecundado, así como la información de miles de secuencias de otros organismos. El análisis detallado de estas secuencias ha aportado una información extraordinaria sobre el proceso de la evolución, tema con el que cerramos el capítulo.

Este es el primero de los cuatro capítulos que tratan de los mecanismos genéticos básicos –el modo a través del cual la célula mantiene, replica, expresa y ocasionalmente repara la información genética contenida en su DNA. Este capítulo presenta una amplia revisión sobre el DNA y cómo se empaqueta en los cromosomas. El Capítulo 5 hace referencia a los mecanismos a través de los cuales las células replican y reparan fielmente su DNA, también se describe cómo se pueden reorganizar las secuencias de DNA a través de la recombinación genética. El Capítulo 6 trata de la expresión génica: proceso a través del cual la información

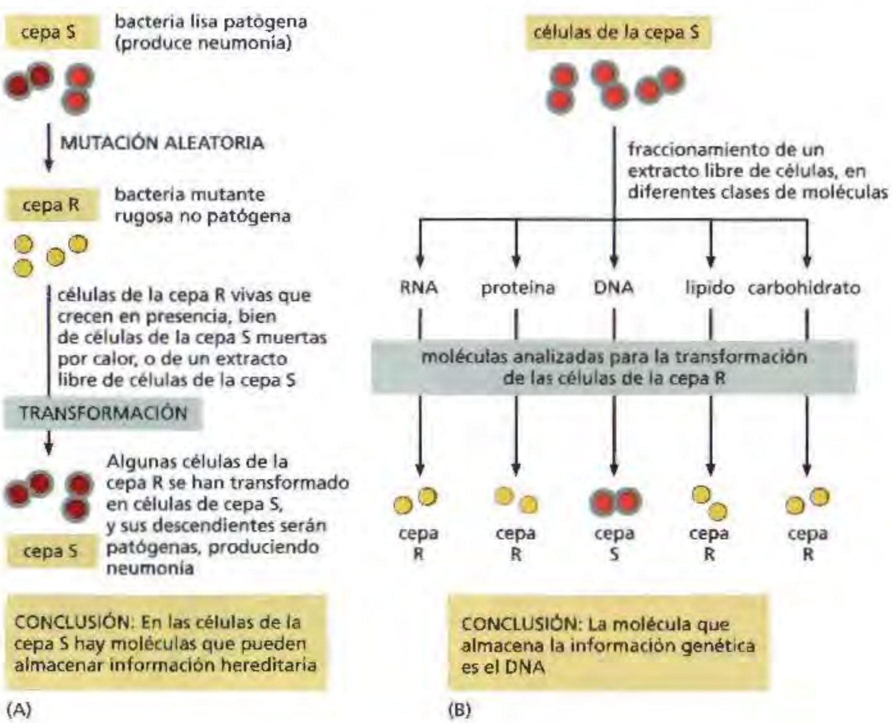


Figura 4–2 La primera demostración experimental de que el DNA es el material genético. Estos experimentos, realizados en la década de 1940, demostraron que al añadir DNA purificado a una bacteria, ésta cambia sus características y estos cambios pasan a las siguientes generaciones. Dos cepas próximas de la bacteria *Streptococcus pneumoniae* difieren entre sí en su apariencia bajo el microscopio y en su patogenicidad. Una cepa tiene aspecto liso (S: *smooth*) y cuando se inyecta en ratones provoca la muerte; la otra parece rugosa (R: *rough*) y no es letal. Los experimentos en (A) muestran que una sustancia presente en la cepa S puede cambiar (o llegar a transformar) la cepa R en la cepa S y que este cambio es heredado por las generaciones posteriores de la bacteria. (B) Este experimento, en el que la cepa R ha sido incubada con diferentes tipos de moléculas biológicas purificadas de la cepa S, permite identificar a la mencionada sustancia como DNA.

genética codificada por el DNA es interpretada por la célula dirigiendo la síntesis de proteínas. En el Capítulo 7, se describe cómo la célula controla la expresión génica asegurando que cada una de las miles de proteínas y moléculas de RNA codificadas en su DNA, se fabrique en el momento y en el lugar oportuno de la vida de la célula.

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL DNA

Los biólogos de la década de 1940 tenían dificultades para concebir el papel del DNA como material genético debido a su aparente sencillez química. Se pensó que el DNA era un simple polímero largo, formado por sólo cuatro tipos de subunidades, parecidas químicamente entre sí. En los primeros años de la década de 1950, se estudió el DNA mediante la técnica de difracción de rayos X, un método que permite determinar la estructura tridimensional de una molécula a una resolución atómica (tratado en el Capítulo 8). Los primeros resultados de difracción de rayos X indicaron que el DNA estaba compuesto por dos hebras del polímero enrolladas en una hélice. La observación de que el DNA era de doble hebra fue crucial y supuso una de las primeras pistas que condujeron al modelo estructural de DNA de Watson y Crick. Sólo cuando este modelo fue propuesto en 1953, resultó evidente la capacidad del DNA para la replicación y el almacenamiento de información. En esta sección examinaremos la estructura de la molécula de DNA y se expondrá de forma muy generalizada por qué puede almacenar información hereditaria.

Una molécula de DNA está formada por dos cadenas complementarias de nucleótidos

Una molécula de **ácido desoxirribonucleico** (**DNA**: *deoxyribonucleic acid*) está formada por dos largas cadenas de polinucleótidos compuestas por cuatro tipos de subunidades nucleotídicas. Cada una de estas cadenas se denomina una *cadena de DNA* o *una hebra de DNA*: las dos cadenas permanecen unidas entre sí mediante *enlaces de hidrógeno* que se forman entre las bases de los nucleótidos (**Figura 4–3**). Como hemos visto en el Capítulo 2 (Panel 2–6, pp. 116–117), los nucleótidos están formados por un azúcar de cinco carbonos que tiene unido uno o más grupos fosfato y una base nitrogenada. En el caso de los nucleótidos del DNA, el azúcar es la desoxirribosa unida a un grupo fosfato (de aquí el nombre de ácido desoxirribonucleico) y la base puede ser *adenina* (A), *citosina* (C), *guanina* (G) o *timina* (T). Los nucleótidos están unidos covalentemente entre sí a través de los azúcares y los fosfatos, formando una cadena que constituye el "esqueleto" de azúcar-fosfato-azúcar-fosfato. Los cuatro tipos de subunidades se diferencian únicamente en la base, por lo que cada cadena de polinucleótidos del DNA puede describirse como un collar (el esqueleto) formado por cuatro tipos de cuentas (las cuatro bases A, C, G y T). Estos mismos símbolos (A, C, G y T) se utilizan comúnmente para identificar los cuatro nucleótidos, es decir, las bases unidas a su azúcar y su grupo fosfato.

Las subunidades nucleotídicas se unen entre sí formando la cadena de DNA, de tal modo que confieren a la molécula una polaridad química. Si imaginamos que cada nucleótido tiene una protuberancia (el fosfato en 5') y un orificio (el hidroxilo en 3')(véase Figura 4–3), cada cadena completa, formada por la unión de protuberancias y orificios, tendrá todas sus subunidades alineadas en la misma orientación. Además, los dos extremos de la cadena serán fácilmente diferenciables, uno será una protuberancia (el 5' fosfato) y el otro será un orificio (el 3' hidroxilo). Esta polaridad del DNA se indica identificando un extremo como *extremo 3'* y el otro como *extremo 5'*.

La estructura tridimensional del DNA –**la doble hélice**– es una consecuencia de las propiedades químicas y estructurales que tienen las cadenas de polinucleótidos. Estas dos cadenas se mantienen unidas entre sí por enlaces de hidrógeno que se forman entre las bases de las diferentes cadenas. Por lo tanto, todas las bases se encuentran en el interior de la doble hélice y el esqueleto de azúcar-fosfato en la periferia (véase Figura 4–3). En cada caso, una base de dos anillos (una purina, véase Panel 2–6, pp. 116–117) se aparea con una base de un solo anillo (una pirimidina); A siempre se aparea con T y G siempre con C (**Figura 4–4**). Este *apareamiento complementario de bases* permite que los **pares de bases** se empaqueten en el interior de la doble hélice de la forma más favorable energéticamente posible. Según esta distribución, cada par de bases tiene aproximadamente el mismo tamaño, mantenien-

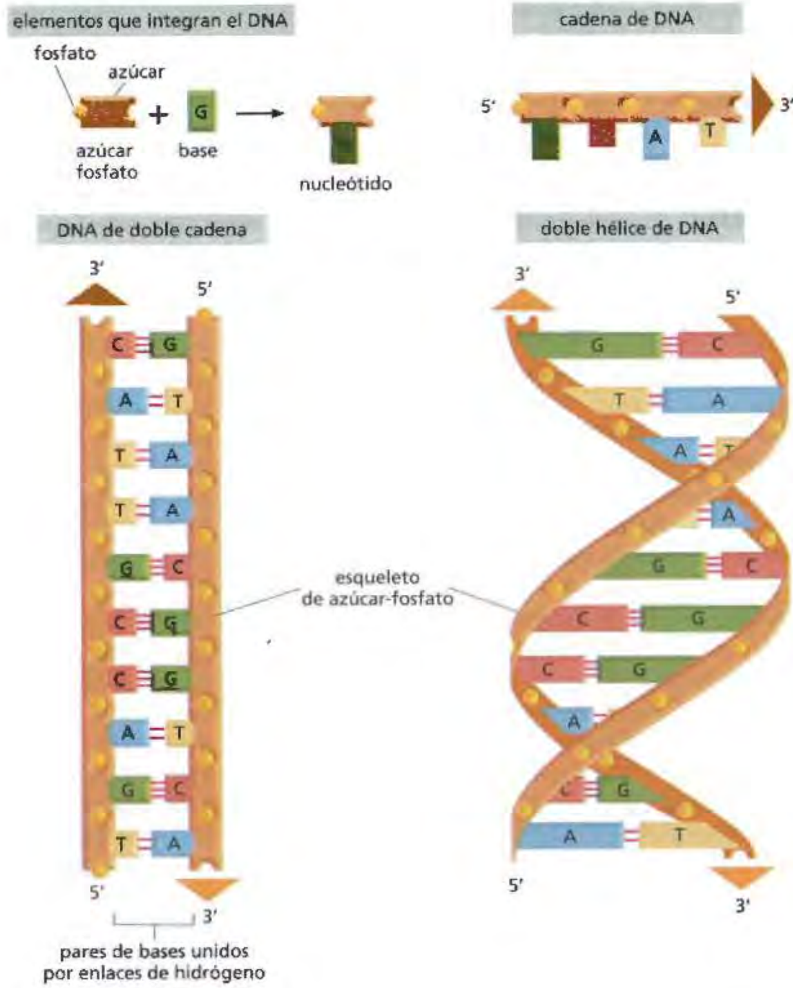


Figura 4-3 El DNA y las unidades de las que está formado. <CAGA> El DNA está formado por cuatro tipos de nucleótidos que están unidos covalentemente entre sí formando una cadena de polinucleótidos (la cadena de DNA) con un esqueleto de azúcar-fosfato del que sobresalen las bases (A, C, G y T). Una molécula de DNA está formada por dos cadenas de DNA que se mantienen unidas por enlaces de hidrógeno entre las bases apareadas. Las *flechas* en los extremos de las hebras de DNA indican la polaridad de las dos cadenas, que en la molécula de DNA son antiparalelas. En el esquema inferior izquierdo de la figura se muestra el DNA estirado; en realidad se encuentra enrollado formando una doble hélice como se muestra a la derecha. Para más detalles véase la Figura 4-5.

do así el esqueleto azúcar-fosfato a la misma distancia a lo largo de la molécula de DNA. Además, los dos esqueletos de azúcar-fosfato se enrollan uno en torno al otro formando una doble hélice que da una vuelta completa cada 10 pares de bases (**Figura 4-5**).

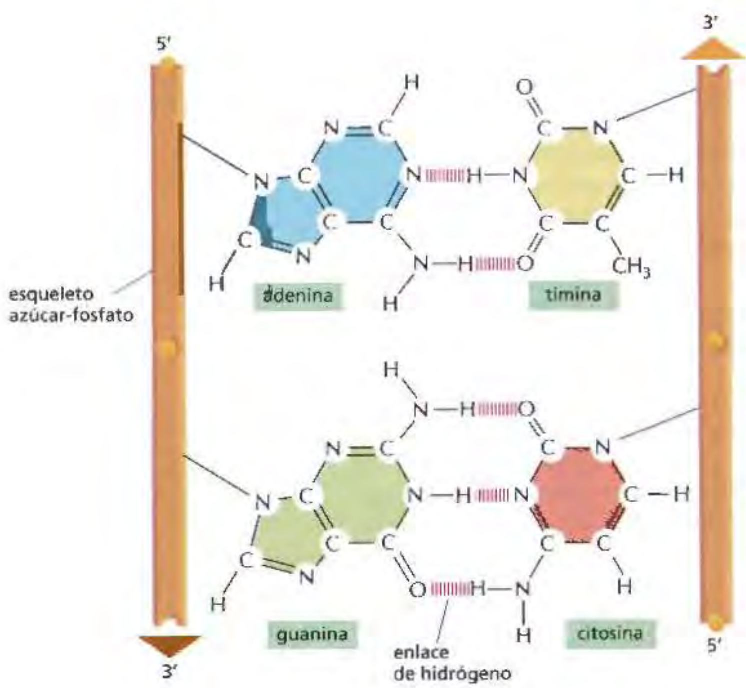


Figura 4-4 Complementariedad de los pares de bases en la doble hélice de DNA. La forma y la estructura química de las bases sólo permiten la formación eficiente de enlaces de hidrógeno entre A y T y entre G y C, ya que en ellas los átomos capaces de formar parte de un enlace de hidrógeno (véase Panel 2-3, pp. 110-111) pueden aproximarse suficientemente sin distorsionar la doble hélice. Entre A y T se forman dos enlaces de hidrógeno, mientras que entre G y C se forman tres. Las bases sólo se pueden aparear de este modo si las dos cadenas complementarias son antiparalelas.

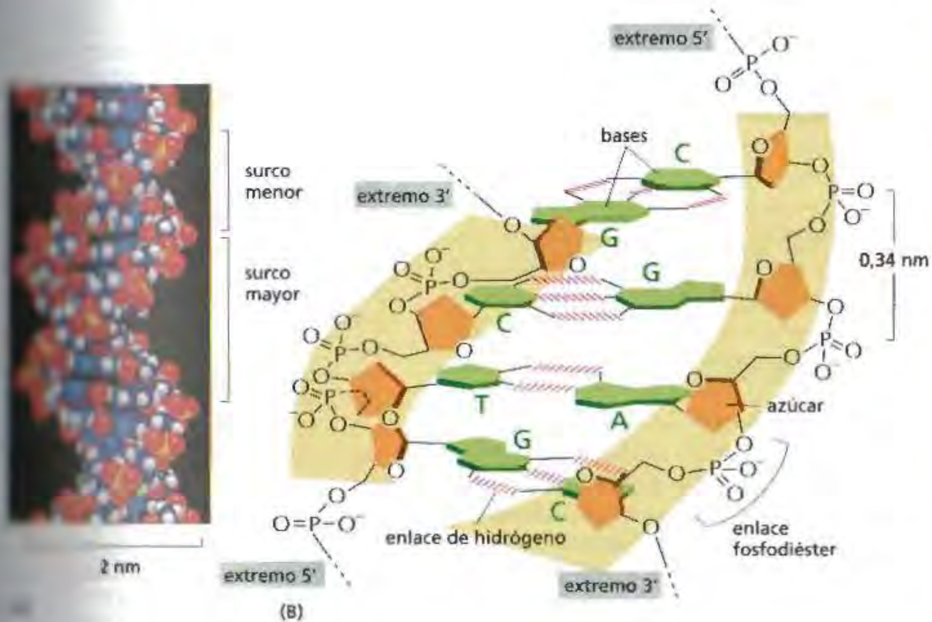


Figura 4–5 La doble hélice de DNA. (A) Modelo de bolas de 1,5 vueltas de una doble hélice de DNA. Cada vuelta de DNA está formada de 10,4 pares de nucleótidos, siendo 3,4 nm la distancia entre los centros de pares de nucleótidos adyacentes. El enrollamiento de las dos hebras, una alrededor de la otra, da lugar a dos surcos en la doble hélice: el más ancho se denomina surco mayor y el más estrecho, surco menor. (B) Sección corta de la doble hélice vista lateralmente, mostrando cuatro pares de bases. Los nucleótidos están unidos covalentemente por enlaces fosfodiéster entre el grupo 3'-hidroxilo (–OH) de un azúcar y el grupo 5'-hidroxilo del siguiente. Así, cada cadena de polinucleótidos tiene una polaridad química; es decir, ambos extremos son químicamente diferentes. El extremo 5' del polímero de DNA se suele representar por convención llevando un grupo fosfato unido, mientras que el extremo 3' se representa con un grupo hidroxilo.

Los miembros de cada par de bases sólo pueden unirse dentro de la doble hélice si las dos cadenas son **antiparalelas**, es decir, si la polaridad de una cadena está orientada de manera opuesta a la de la otra cadena (véase Figuras 4–3 y 4–4). Una consecuencia de los requerimientos del apareamiento de las bases es que cada una de las cadenas de una molécula de DNA contiene una secuencia de nucleótidos exactamente **complementaria** a la secuencia de nucleótidos de la otra.

La estructura del DNA explica el mecanismo de la herencia

Los genes contienen una información biológica que debe ser copiada cuidadosamente y transmitida cuando una célula se divide formando dos células hijas. Esta idea plantea dos problemas biológicos: ¿Cómo se puede almacenar químicamente la información necesaria para formar un organismo vivo?, y ¿cómo puede ser replicada con fidelidad esta información? El descubrimiento de la estructura del DNA como una doble hélice constituyó un hito en la biología del siglo XX, ya que inmediatamente sugirió respuestas a estas dos cuestiones, además de aportar una explicación molecular al problema de la herencia. En esta sección expondremos de forma resumida la respuesta a ambas preguntas para examinarlas con mayor detalle en capítulos posteriores.

El DNA codifica información en el orden o secuencia de los nucleótidos a lo largo de cada cadena. Cada una de las bases –A, C, T o G– puede considerarse como una letra de un alfabeto de cuatro letras que se utiliza para escribir mensajes biológicos en la estructura química del DNA. Como se expuso en el Capítulo 1, los organismos difieren entre sí porque sus moléculas de DNA tienen secuencias diferentes de nucleótidos y, como consecuencia de ello, codifican diferentes mensajes biológicos. Pero, ¿cómo se utiliza el alfabeto de nucleótidos para codificar mensajes y cómo se deletrean?

Como hemos mencionado anteriormente, antes de que se determinara la estructura del DNA se sabía que los genes contienen instrucciones para la producción de proteínas. Por tanto, los mensajes del DNA tienen que codificar proteínas de alguna manera (**Figura 4–6**). La naturaleza química de las proteínas permite aclarar inmediatamente este problema. Tal como se describió en el Capítulo 3, las propiedades de una proteína, responsable de su función biológica, están determinadas por su estructura tridimensional y ésta es una consecuencia de la secuencia lineal de aminoácidos que la forman. De alguna forma, la secuencia de nucleótidos de un gen tiene que deletrear la secuencia de aminoácidos de una proteína. La correspondencia exacta entre el alfabeto de nucleótidos del DNA –de cuatro letras– y el de aminoácidos de las proteínas –de veinte letras– no es obvia a partir de la estructura del DNA; transcurrió alrededor de una década desde el descubrimiento de la doble hélice hasta que se resolvió en su totalidad esta correspondencia. En el Capítulo 6 se describirá este código y los



Figura 4–6 Relación entre la información genética contenida en el DNA y en las proteínas (tratado en el Capítulo 1).

mecanismos mediante los cuales una célula primero convierte la secuencia de nucleótidos de un gen en la secuencia de nucleótidos de una molécula de RNA y, posteriormente, en la secuencia de aminoácidos de una proteína, lo que se conoce como *expresión génica*.

El conjunto completo de la información almacenada en el DNA de un organismo se denomina **genoma** y contiene la información de todas las proteínas y moléculas de RNA que va a sintetizar dicho organismo. (El término genoma también se utiliza para describir el DNA que contiene dicha información.) La cantidad total de esta información es asombrosa: cada célula humana diploide contiene 2 metros de DNA de doble hélice. Si escribimos la secuencia de nucleótidos en el alfabeto de cuatro letras, la secuencia de un gen humano pequeño ocupa la cuarta parte de una página de texto (**Figura 4–7**), mientras que la secuencia de DNA del genoma humano llenaría más de 1000 libros del tamaño de éste. Además de otras informaciones cruciales, el genoma humano contiene la información sobre unas 24.000 proteínas distintas.

La célula debe copiar su genoma en cada división celular a fin de transmitirlo a cada una de las células hijas; la estructura del DNA también reveló cómo era posible la replicación. Cada cadena de DNA contiene una secuencia de nucleótidos que es exactamente complementaria a la de su pareja, por lo que cada una de estas cadenas puede actuar como un **molde** o **patrón** para la síntesis de otra cadena complementaria. En otras palabras, si denominamos a las dos cadenas complementarias como S y S', la cadena S puede servir como molde para sintetizar una nueva cadena S', mientras que la cadena S' se usará como molde para producir una nueva cadena S (**Figura 4–8**). Así pues, la información genética del DNA puede ser copiada fielmente mediante el sencillo proceso por el que las cadenas S y S' se separan, y cada una de ellas por separado se utiliza como molde para la producción de una cadena complementaria idéntica a su complementaria original.

La capacidad de cada cadena de DNA para actuar como molde en la producción de una cadena complementaria capacita a la célula para copiar o *replicar* su genoma antes de pasarlo a sus descendientes. En el próximo capítulo describiremos la magnífica maquinaria que utilizan las células para realizar esta función.

En las células eucariotas, el DNA está confinado en el núcleo

Como ya se ha descrito en el Capítulo 1, casi todo el DNA de una célula eucariota se halla recluido en el núcleo, que en muchas células ocupa alrededor del 10% del volumen celular. El núcleo está delimitado por una *envoltura nuclear* formada por dos membranas concéntricas (**Figura 4–9**). Estas membranas están perforadas a intervalos por poros nucleares, a través de los cuales se produce el transporte activo de determinadas moléculas entre el núcleo y el citoplasma. La envoltura nuclear está conectada directamente con las extensas membranas del retículo endoplasmático, que se extienden por el citoplasma desde el núcleo. La organización estructural del núcleo se mantiene por una red de filamentos intermedios denominada *lámina nuclear*, que forma una fina lámina que recubre la membrana nuclear interna (Figura 4–9B).

La existencia de la envoltura nuclear permite que muchas de las proteínas que interaccionan con el DNA se concentren donde la célula las necesita y, como veremos en siguientes capítulos, que las enzimas citosólicas y nucleares estén separadas, lo cual es trascendental para el funcionamiento de las células eucariotas. La compartimentación, como por ejemplo la nuclear, es un principio muy importante en biología, ya que permite establecer un entor-

```
CCCTGTGGAGCCACACCCTAGGGTTGGCCA
ATCTACTCCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAG
CCAGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAG
CCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGACAC
AACTGTGTTCACTAGCAACTCAAACAGACA
CCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGAGAAGT
CTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGA
ACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGG
GCAGGTTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGT
TTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTG
GAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATA
GGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGTCTAT
TTTCCCACCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTAC
CCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTT
GGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATG
GGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAG
AAAGTGCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCCTG
GCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTT
GCCACACTGAGTGAGCTGCACTGTGACAAG
CTGCACGTGGATCCTGAGAACTTCAGGGTG
AGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCC
CCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCAT
AGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGTACAGTTT
AGAATGGGAAACAGACGAATGATTGCATCA
GTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTC
TTTTATTTGCTGTTCATAACAATTGTTTTC
TTTTGTTTAATTCTTGCTTTCTTTTTTTTT
CTTCTCCGCAATTTTTACTATTATACTTAA
TGCCTTAACATTGTGTATAACAAAAGGAAA
TATCTCTGAGATACATTAAGTAACTTAAAA
AAAAACTTTACACAGTCTGCCTAGTACATT
ACTATTTGGAATATATGTGTGCTTATTTGC
ATATTCATAATCTCCCTACTTTATTTTCTT
TTATTTTTAATTGATACATAATCATTATAC
ATATTTATGGGTTAAAGTGTAATGTTTTAA
TATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGT
AATTTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCT
TTCTTCTTTTAATATACTTTTTTGTTTATC
TTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTC
TTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCAT
GCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAACAG
TGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAAT
ATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAA
ATTGTAACTGATGTAAGAGGTTTCATATTG
CTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTC
TGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTG
GATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTT
GCTAATCATGTTCATACCTCTTATCTTCCT
CCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTG
TGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATT
CACCCCACCAGTGCAGGCTGCCTATCAGAA
AGTGGTGGCTGGTGTGGCTAATGCCCTGGC
CCACAAGTATCACTAAGCTCGCTTTCTTGC
TGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCCTTTGTT
CCCTAAGTCCAACTACTAAACTGGGGGATA
TTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTG
CCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCAA
TGATGTATTTAAATTATTTCTGAATATTTT
ACTAAAAAGGGAATGTGGGAGGTCAGTGCA
TTTAAAACATAAAGAAATGATGAGCTGTTC
AAACCTTGGGAAAATACACTATATCTTAAA
CTCCATGAAAGAAGGTGAGGCTGCAACCAG
CTAATGCACATTGGCAACAGCCCCTGATGC
CTATGCCTTATTCATCCCTCAGAAAAGGAT
TCTTGTAGAGGCTTGATTTGCAGGTTAAAG
TTTTGCTATGCTGTATTTTACATTACTTAT
TGTTTTAGCTGTCCTCATGAATGTCTTTTC
```

Figura 4–7 Secuencia de nucleótidos del gen humano de la β-globina. Por convención, la secuencia de nucleótidos se escribe del extremo 5' al 3' y debe leerse de izquierda a derecha en las sucesivas líneas como si se tratase de un texto normal en castellano. Este gen contiene la información para la secuencia de aminoácidos de uno de los dos tipos de subunidades de la molécula de hemoglobina, proteína que transporta el oxígeno a través de la sangre. Un gen diferente, el gen de la α-globina, contiene la información para el otro tipo de subunidad de hemoglobina (una molécula de hemoglobina está formada por cuatro subunidades, dos de cada tipo). Sólo se muestra una de las dos cadenas de la doble hélice del DNA del gen de la β-globina; la otra cadena tiene la secuencia complementaria exacta. Las secuencias coloreadas en *amarillo* muestran las tres regiones del gen que especifican la secuencia de aminoácidos de la proteína β-globina. En el Capítulo 6 se describirá cómo la célula distribuye estas tres secuencias en el RNA mensajero para sintetizar una proteína β-globina completa.

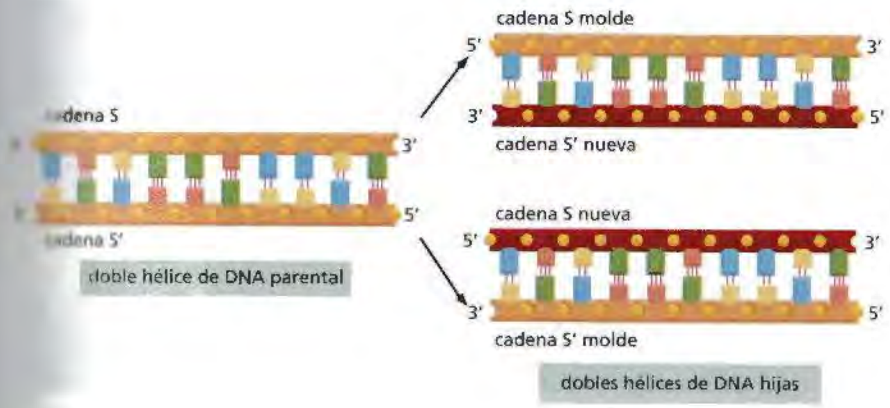


Figura 4–8 El DNA actúa como molde para su propia duplicación. Dado que el nucleótido A sólo se apareará con éxito con T, y el G con C, cada cadena de DNA puede actuar como un molde que especifica la secuencia de nucleótidos de su cadena complementaria. De esta forma, la doble hélice de DNA se puede copiar fielmente, de modo que cada hélice parental produce dos hélices de DNA hijas idénticas.

en el cual las reacciones bioquímicas sean más fáciles debido a la elevada concentración tanto de sustratos como de las enzimas que actúan sobre ellos. La compartimentación también evita que las enzimas necesarias en una parte de la célula interfieran en las vías bioquímicas ordenadas de otra parte de la célula.

Resumen

La información genética está alojada en la secuencia lineal de los nucleótidos que constituyen el DNA. Cada molécula del DNA es una doble hélice, constituida por dos hebras de nucleótidos complementarias, unidas entre sí mediante los enlaces de hidrógeno que se forman entre los pares de bases G-C y A-T. La duplicación de la información genética se realiza a partir de una de las hebras del DNA que actúa de molde para la fabricación de su hebra complementaria. El genoma es la información genética contenida en el DNA de los organismos que contiene las instrucciones necesarias para sintetizar todas las proteínas del organismo. En los organismos eucariotas, el DNA está en el núcleo de las células, un amplio compartimiento membranoso.

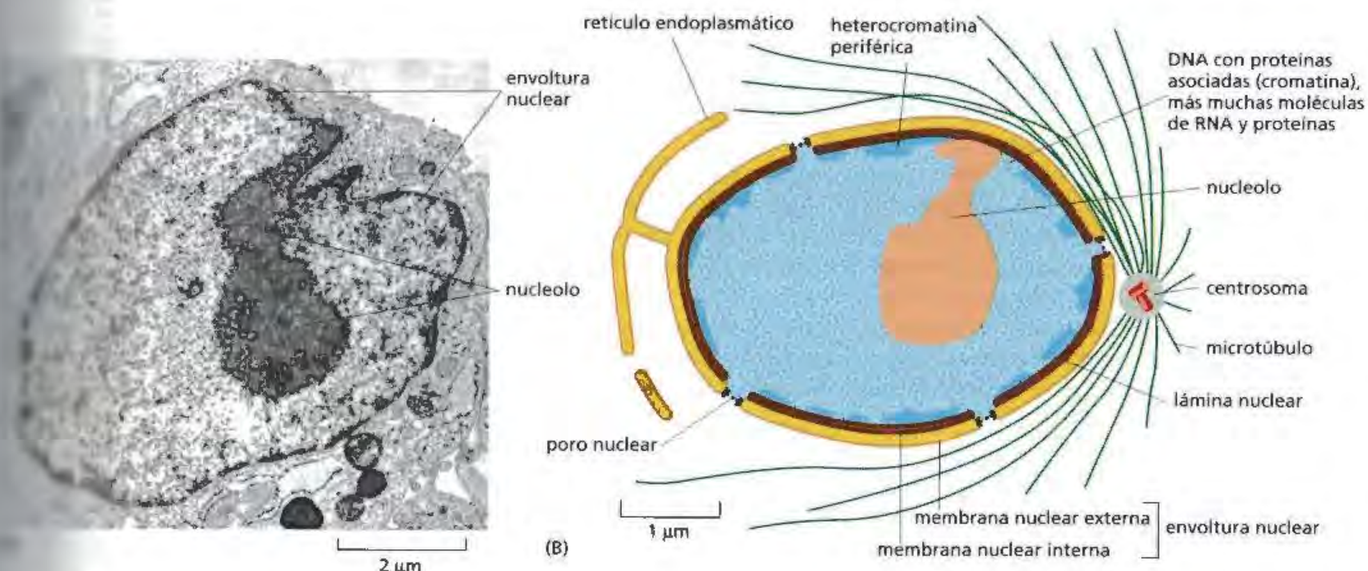


Figura 4–9 Sección transversal de un núcleo celular normal. (A) Electromicrografía de una sección ultrafina del núcleo de un fibroblasto humano. (B) Esquema mostrando que la envoltura nuclear está formada por dos membranas de las cuales la exterior es continua con la membrana del retículo endoplasmático (véase también la Figura 12-8). El espacio interior del retículo endoplasmático (lumen del ER) está coloreado en *amarillo*; es continuo con el espacio intermembrana de la envoltura nuclear. Las bicapas lipídicas de las membranas nucleares interna y externa están conectadas a través de los poros nucleares. Una red laminar de filamentos intermedios (*marrón*) dentro del núcleo proporciona soporte mecánico a la envoltura nuclear y forma una estructura especial de soporte que recibe el nombre de lámina nuclear (para más detalles, véase el Capítulo 12). La heterocromatina situada próxima a la lámina nuclear contiene regiones especiales de DNA condensado que se describirán más adelante.

EL DNA CROMOSÓMICO Y SU EMPAQUETAMIENTO EN LA FIBRA DE CROMATINA

La función más importante del DNA es contener los genes, la información sobre todas las proteínas y moléculas de RNA que componen un organismo –incluyendo la información sobre cuándo, en qué tipo de células y en qué cantidad se tiene que fabricar cada proteína. El genoma de los eucariotas está distribuido entre cromosomas; en este apartado veremos cómo se ordenan los genes de forma particular en cada cromosoma. Además describiremos aquellas secuencias de DNA específicas que se requieren para asegurar la duplicación fiel del DNA y su transmisión de una generación a la siguiente.

También expondremos el gran desafío que supone empaquetar el DNA. Si uniéramos todos los trozos de doble hélice que componen los 46 cromosomas de una célula humana, alcanzarían aproximadamente 2 metros, mientras que el núcleo que contiene todo este DNA tiene un diámetro aproximado de 6 μm. Este hecho es geométricamente equivalente al empaquetamiento de unos 40 km de un hilo extremadamente fino en el interior de una pelota de tenis. Esta compleja tarea de empaquetar el DNA la realizan unas proteínas especializadas que se asocian al DNA plegándolo y facilitando la formación de enrollamientos y bucles que contribuyen progresivamente al establecimiento de niveles de organización superiores del DNA, evitando que se convierta en un enmarañado e inmanejable ovillo con el que no se pueda trabajar. Sorprendentemente, a pesar de que el DNA se empaqueta de una forma muy compacta, lo hace de tal manera que permanece accesible a las enzimas que intervienen en su replicación, en su reparación y en la utilización de los genes para producir moléculas de RNA y proteínas.

El DNA de la célula eucariota se empaqueta en un conjunto de cromosomas

En los organismos eucariotas, el DNA está distribuido en un conjunto de diferentes **cromosomas** que se encuentran en el núcleo. Por ejemplo, el genoma humano –de aproximadamente unos $3{,}2 \times 10^9$ nucleótidos– está distribuido en 24 cromosomas diferentes. Cada cromosoma está formado por una sola molécula de DNA, muy larga, asociada a proteínas que pliegan y empaquetan la fina hebra de DNA formando una estructura más compacta. El complejo de DNA y proteínas se denomina *cromatina* (del griego *chroma*, "coloreado", debido a sus afinidades tintoriales). Muchas de las proteínas asociadas al DNA de los cromosomas están implicadas en su empaquetamiento, pero los cromosomas también se asocian con otras proteínas y moléculas de RNA implicadas en la expresión génica, en la replicación y en la reparación del DNA.

Las bacterias normalmente tienen todos sus genes en una sola molécula de DNA, a menudo circular (véase la Figura 1–29), que también se asocia con proteínas (aunque diferentes de las de las células eucariotas) que condensan el DNA. Aunque frecuentemente a este conjunto se le denomina el "cromosoma" bacteriano, no tiene la misma estructura que los cromosomas de las células eucariotas; conocemos peor la forma en que se empaqueta el DNA de la célula bacteriana, siendo aún menos conocida la forma en que se empaqueta el DNA en las arqueobacterias. La descripción que se hará en este capítulo de la estructura del cromosoma, se centrará únicamente en los cromosomas de las células eucariotas.

Las células humanas, con excepción de las células germinales (como se expone en el Capítulo 21) y algunas células muy especializadas que no pueden reproducirse y que no tienen DNA (p. ej., los glóbulos rojos), contienen dos copias de cada cromosoma, una heredada de la madre y la otra del padre. Los cromosomas materno y paterno de una pareja se denominan **cromosomas homólogos**. La única pareja de cromosomas no homólogos es la de los cromosomas sexuales en los machos, de los cuales un *cromosoma Y* es heredado del padre y un *cromosoma X* de la madre. Así pues, cada célula humana tiene 46 cromosomas: 22 pares son comunes para hombres y mujeres, los otros dos se denominan cromosoma sexuales (X e Y en hombres y dos X en mujeres). La *hibridación de DNA* es una técnica mediante la cual se utiliza como "sonda" una cadena de ácido nucleico marcada para localizar una cadena complementaria, tal y como se describirá detalladamente en el Capítulo 8. Esta técnica puede utilizarse para distinguir los cromosomas humanos, "pintando" cada uno de ellos de un color (**Figura 4–10**). La tinción de los cromosomas se realiza en la fase del ciclo

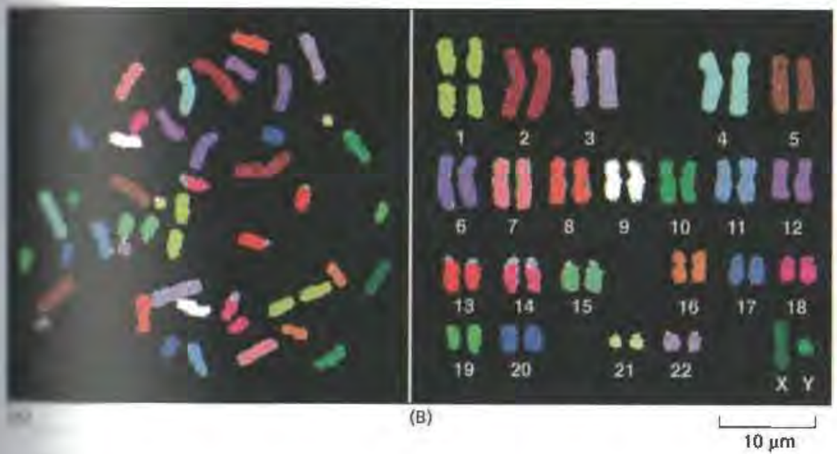


Figura 4–10 El conjunto completo de cromosomas humanos. Aislamiento de los cromosomas de un hombre a partir de una célula que estaba dividiendo su núcleo (mitosis), por lo que se encontraban muy compactados. Cada cromosoma ha sido "pintado" de un color diferente que permite su identificación sin ambigüedades bajo el microscopio óptico. La tinción de los cromosomas se ha realizado exponiendo los cromosomas a una colección de moléculas de DNA acopladas a una combinación de colorantes fluorescentes. Por ejemplo, las moléculas de DNA derivadas del cromosoma 1 se han marcado con una combinación específica de colorante, las del cromosoma 2 con otra, etc. Debido a que el DNA marcado sólo puede formar pares de bases, o hibridar, con el cromosoma del que deriva (véase el Capítulo 8), cada cromosoma tiene un marcaje diferente. En estos experimentos los cromosomas son sometidos a tratamientos que separan la doble hélice del DNA en cadenas individuales, a fin de permitir el apareamiento de sus bases con el DNA de cadena simple marcado, al mismo tiempo que mantienen la estructura del cromosoma relativamente intacta. (A) Los cromosomas tal como se ven, desordenados, a partir de la célula lisada. (B) Los mismos cromosomas alineados y ordenados artificialmente. Esta disposición ordenada de los cromosomas se denomina cariotipo. (De E. Schröck et al., *Science* 273:494-497, 1996. Con la autorización de AAAS.)

llamada mitosis, en la que los cromosomas están condensados al máximo y son fáciles de visualizar (véase más adelante).

Uno de los métodos tradicionales que permite distinguir unos cromosomas de otros se basa en utilizar colorantes que producen un llamativo y fiable patrón de bandas características a lo largo de cada cromosoma mitótico (**Figura 4–11**). El fundamento estructural por el cual se originan las bandas no se conoce muy bien. Sin embargo, el patrón de bandas de cada cromosoma es único y permite que cada uno de los cromosomas humanos pueda ser identificado y numerado.



Figura 4–11 Patrón de bandas de los cromosomas humanos. Los cromosomas del 1 al 22 se han numerado según el orden aproximado de su tamaño. Una célula somática humana normal (es decir, no germinal) contiene dos de cada uno de estos cromosomas, además de los dos cromosomas sexuales: dos cromosomas X si es una hembra; un X y un Y si es un varón. Los cromosomas utilizados para hacer estos mapas fueron teñidos en una fase inicial de la mitosis, cuando los cromosomas no estaban condensados por completo. La *línea horizontal roja* representa la posición del centrómero (véase la Figura 4–21), que aparece como una constricción en los cromosomas mitóticos. Las protuberancias rojas en los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22 indican la posición de los genes que codifican los RNA ribosómicos grandes (véase el Capítulo 6). Estos patrones se han obtenido mediante tinción de los cromosomas con la solución de Giemsa y pueden observarse con el microscopio óptico. (Para micrografías véase la Figura 21-18; adaptado de U. Franke, *Cytogenet. Cell Genet.* 31:24-32, 1981. Con la autorización de Karger.)

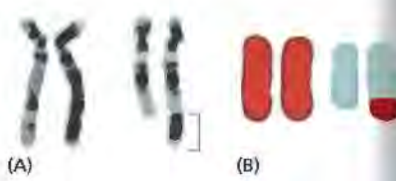


Figura 4–12 Cromosoma humano aberrante. (A) Dos parejas de cromosomas, teñidos con Giemsa (véase la Figura 4–11), de un enfermo de ataxia, enfermedad que se caracteriza por un deterioro progresivo de la destreza motora. En el enfermo, el par cromosómico 4s (*par de la izquierda*) es normal, pero tiene un cromosoma 12 normal y el otro aberrante, como puede apreciarse por su mayor longitud (*par de la derecha*). El material adicional que tiene el cromosoma 12 aberrante (*corchete rojo*), como puede deducirse de su patrón de bandas, es una copia de un fragmento del cromosoma 4 que se ha fusionado con el cromosoma 12, en un proceso de recombinación anormal denominada translocación cromosómica. (B) Los mismos pares cromosómicos coloreados, en *rojo* el DNA del cromosoma 4 y en *azul* el del cromosoma 12. Ambas técnicas conducen a la misma conclusión respecto a la naturaleza del cromosoma 12 aberrante, pero la tinción cromosómica ofrece una mejor resolución y permite la identificación de fragmentos cromosómicos que se han translocado. No obstante, la tinción con Giemsa es más fácil de realizar. (Adaptado de E. Schröck et al., *Science* 273:494-497, 1996. Con la autorización de AAAS.)

El aspecto que muestran los 46 cromosomas humanos en la mitosis recibe el nombre de **cariotipo**. Los cambios en el patrón de bandas o en el patrón de tinción de los cromosomas permiten detectar la pérdida de una parte de un cromosoma o el desplazamiento de trozos de un cromosoma a otro (**Figura 4–12**). En citogenética se utilizan las alteraciones en el patrón de bandas para detectar anomalías cromosómicas asociadas con algunos defectos genéticos, así como para caracterizar ciertos tipos de cáncer asociados a reordenamientos cromosómicos específicos en células somáticas (se describirá en el Capítulo 20).

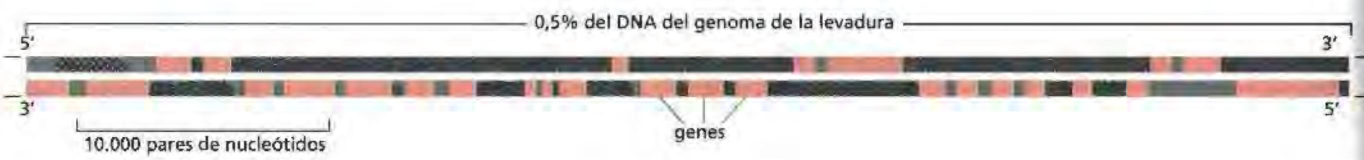
Los cromosomas contienen largas tiras de genes

Los cromosomas contienen los genes, es decir, las unidades funcionales de la herencia. Un gen se define habitualmente como un segmento de DNA que contiene las instrucciones para fabricar una determinada proteína (o un grupo de proteínas que están muy estrechamente relacionadas entre sí). A pesar de que esta definición la cumplen la mayoría de genes, existe un porcentaje de genes cuyo producto final es una molécula de RNA en lugar de una proteína. Igual que las proteínas, estas moléculas de RNA desempeñan diversas funciones estructurales y catalíticas en las células, aspectos que se tratarán de forma más detallada en posteriores capítulos.

Como era de esperar, existe cierta correlación entre la complejidad de un organismo y el número de genes de su genoma (véase la Tabla 1–1, p. 18). Por ejemplo, algunas bacterias simples contienen sólo 500 genes, comparado con los cerca de 25.000 de los humanos. Las bacterias y algunos organismos eucariotas unicelulares, como las levaduras, tienen un genoma especialmente compactado, la secuencia completa de sus genomas pone de manifiesto que las moléculas de DNA de sus cromosomas son poco más que simples hileras de genes intensamente empaquetadas (**Figura 4–13**). Por otro lado, los cromosomas de muchos eucariotas (incluyendo los humanos) contienen, además de los genes, una gran cantidad de DNA intercalado, que parece no contener información relevante. A veces, se le ha denominado "DNA basura" para expresar el hecho de que no se ha demostrado su utilidad para la célula y que, por la particularidad de su secuencia de nucleótidos, la mayoría de este DNA podría no ser importante. Sin embargo, parte de este DNA es crucial para la correcta expresión de ciertos genes, como describiremos de una forma más detallada.

Debido a las diferencias en la cantidad de DNA intercalado entre los genes, el tamaño del genoma puede variar mucho (véase la Figura 1–37). Por ejemplo, el genoma humano es 200 veces mayor que el de la levadura *S. cerevisiae*, pero unas 30 veces más pequeño que el de algunas plantas y anfibios, y 200 veces más pequeño que el de las amebas. Además, en genomas de organismos similares (p. ej. el pez óseo) su contenido en DNA puede ser centenares de veces diferente, lo cual es debido al DNA en exceso que contienen aunque tengan aproximadamente el mismo número de genes. A pesar de la presencia de DNA en exceso, parece claro que tenerlo en grandes cantidades no supone ningún obstáculo para las células eucariotas superiores.

Figura 4–13 Organización de los genes en el genoma de *S. cerevisiae*. *S. cerevisiae* es una levadura ampliamente utilizada para hacer cerveza y pan. El genoma de esta levadura está distribuido en 16 cromosomas. Se ha seleccionado arbitrariamente una pequeña región de un cromosoma para mostrar la gran densidad de genes característica de estas especies. Como se indica en *rojo pálido*, algunos genes son transcritos de la cadena inferior, mientras que otros lo son de la cadena superior. El genoma completo contiene alrededor de 6300 genes, conteniendo algo más de 12 millones de pares de nucleótidos. (Para ver el gran empaquetamiento de los genes del genoma en una bacteria con 4,6 millones de nucleótidos de largo, véase la Figura 1-29.)





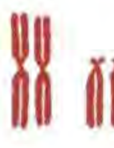


Figura 4–14 **Dos especies de cérvidos estrechamente relacionadas, con un número de cromosomas muy diferente.** Durante la evolución en el ciervo muntjac indio se han fusionado cromosomas que inicialmente estaban separados, sin que esto afecte prácticamente al animal. Las dos especies tienen aproximadamente el mismo número de genes (Adaptado de M. W. Strickberger, Evolution, 3.ª edición, 2000, Sudbury, MA: Jones & Bartlett Publishers.)

La distribución del genoma en los cromosomas de las diferentes especies eucariotas [illegible] es diferente. Por ejemplo, en comparación con los 46 cromosomas de las células [illegible] humanas, las de los pequeños cérvidos sólo tienen 6, mientras que las de especies [illegible] tienen más de 100. Igualmente, especies muy próximas entre sí que tienen un genoma de tamaño similar, pueden presentar un número y una dimensión de cromosomas [illegible] (Figura 4–14). Así pues, no existe ninguna relación directa entre el número de cromosomas, la complejidad de las especies y el tamaño del genoma. Más bien da la impresión de que cada uno de los genomas y de los cromosomas de las especies actuales hayan surgido de un proceso histórico de acontecimientos genéticos único, realizado al azar y sometido a las presiones ejercidas por la selección a lo largo de la evolución.

La secuencia de nucleótidos del genoma humano muestra cómo están organizados nuestros genes

En el Capítulo 1 hemos mostrado, en términos generales, cómo se lee y se utiliza la información del DNA para construir proteínas a través de intermediarios de RNA (véase Figura 1–4). [illegible] fue posible apreciar por primera vez cómo se organizan los genes a lo largo de un cromosoma en los vertebrados (**Figura 4–15**). En la actualidad con la publicación del "primer [illegible]" del genoma humano completo en 2001, y la "finalización" de la secuenciación del DNA en 2004, está disponible la información genética de todos los cromosomas huma-

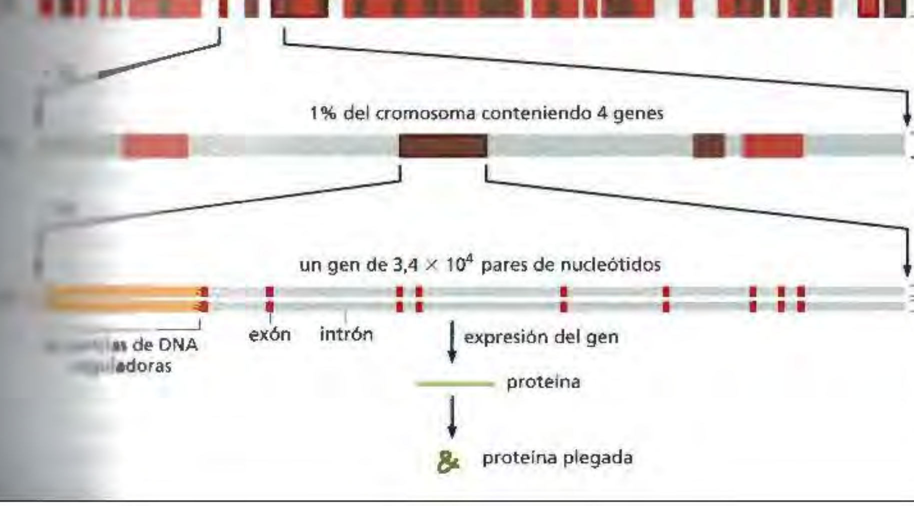


Figura 4–15 **Organización de los genes en un cromosoma humano.** (A) El cromosoma 22, uno de los cromosomas humanos más pequeños, contiene 48×10^6 pares de bases y constituye el 1,5% del genoma humano. La mayor parte del brazo izquierdo del cromosoma 22 está constituida por secuencias de DNA cortas y repetidas que están empaquetadas de una forma particular (heterocromatina), como se describirá al final de este capítulo. (B) Ampliación (×10) de un fragmento del cromosoma 22 que contiene alrededor de 40 genes. En *marrón oscuro* se indican los genes conocidos y en *rojo* los predecibles. (C) Región ampliada de B en la que se muestra el tamaño total de algunos genes. (D) Disposición de intrones y exones de un gen normal después de ampliar 10 veces el segmento indicado. Cada exón (*rojo*) codifica una porción de la proteína, en cambio el DNA de los intrones (*gris*) es relativamente poco importante, como se analiza en detalle en el Capítulo 6.

El genoma humano ($3,2 \times 10^9$ pares de nucleótidos) contiene toda la información genética correspondiente a nuestra especie. Casi la totalidad de este genoma está distribuido en 22 cromosomas autosómicos y 2 cromosomas sexuales (véase las Figuras 4–10 y 4–11) contenidos en el interior del núcleo. Una pequeña parte del genoma humano (16.569 pares de nucleótidos –con múltiples copias en cada célula) se encuentra en la mitocondria (introducida en el Capítulo 1 y descrita en detalle en el Capítulo 14). El término *secuencia del genoma humano* hace referencia a la secuencia completa de nucleótidos del DNA de los 24 cromosomas nucleares y de la mitocondria. Las células somáticas, al ser diploides, contienen cerca del doble de esta cantidad de DNA, o $6,4 \times 10^9$ pares de nucleótidos cuando no se están duplicando sus cromosomas preparando la división celular. (Adaptado de International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* 409:860-921, 2001. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

nos. La cantidad de información proporcionada por el Proyecto Genoma Humano es asombrosa (**Figura 4–16** y **Tabla 4–1**). En el momento culminante, este proyecto generaba secuencias de nucleótidos a una velocidad de 1000 nucleótidos por segundo. Serán necesarias varias décadas para que esta información sea analizada totalmente, a pesar de lo cual ya ha estimulado la realización de nuevos experimentos que han influido en el contenido de todos los capítulos de este libro.

La primera característica que llama la atención del genoma humano es que una parte muy pequeña de su DNA (un porcentaje muy bajo) codifica proteínas (**Figura 4–17**). La mayor parte del DNA restante lo forman fragmentos de secuencias cortas de DNA, móviles, que se han insertado en los cromosomas durante la evolución. Estos *elementos transponibles* se tratarán más detalladamente en capítulos posteriores.

La segunda característica destacable del genoma humano es el enorme tamaño que tienen sus genes por término medio (unos 27.000 pares de nucleótidos). Como hemos indicado, un gen normal contiene la información de la secuencia lineal de los aminoácidos que constituyen una proteína. Para la fabricación de una proteína de tamaño medio (unos 430 aminoácidos en humanos) son necesarios 1300 pares de nucleótidos. La mayor parte del resto del DNA de un gen consiste en largas extensiones de DNA no codificante que interrumpen los segmentos relativamente cortos que codifican las proteínas. Como se explicará en detalle en el Capítulo 6, las secuencias codificantes se denominan **exones** y las secuencias intercaladas no codificantes se llaman **intrones** (véase la Figura 4–15 y la Tabla 4–1). La mayoría de los genes humanos constan, pues, de largas ristras de exones e intrones dispuestos alternativamente. En cambio la mayoría de genes de los organismos con genomas compactos no tienen intrones. Esto justifica que estos genes sean más pequeños (alrededor de una veinteava parte de los de los humanos) y que sus cromosomas tengan una mayor proporción de DNA codificante.

Además de los intrones y exones, cada gen está unido a *secuencias de DNA reguladoras*, las cuales son las responsables de asegurar que un gen se active o desactive en el momento preciso, se exprese en el nivel apropiado y sólo en el tipo de célula apropiado. En los humanos, las secuencias reguladoras de un gen normal ocupan decenas de miles de pares de nucleótidos. Como era de esperar, estas secuencias están más comprimidas en los organismos que tienen un genoma compactado. La forma de funcionar de las secuencias reguladoras se trata en el Capítulo 7.

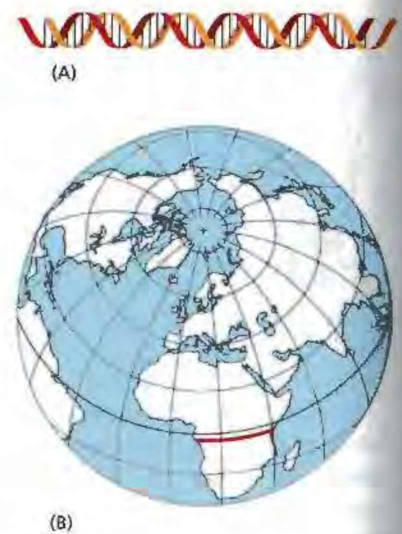


Figura 4–16 Escala del genoma humano. Si cada par de nucleótidos ocupara 1 mm como en el esquema (A), el genoma humano tendría una longitud de 3200 km, longitud que corresponde a la extensión del centro de África, lugar del origen del hombre (*línea roja* en B). A esta escala, cada 130 m habría un gen que codifica una proteína y el tamaño medio de un gen sería de 30 metros, pero las secuencias codificantes de este gen sólo corresponderían a poco más de un metro.

Tabla 4–1 Algunos datos estadísticos del genoma humano

	GENOMA HUMANO
Longitud del DNA	$3{,}2 \times 10^9$ pares de nucleótidos*
Número de genes	aproximadamente 25.000
Gen más grande	$2{,}4 \times 10^6$ pares de nucleótidos
Tamaño medio de un gen	27.000 pares de nucleótidos
Número mínimo de exones por gen	1
Número máximo de exones por gen	178
Promedio de exones por gen	10,4
Tamaño del exón más grande	17.106 pares de nucleótidos
Tamaño medio de los exones	145 pares de nucleótidos
Número de pseudogenes**	más de 20.000
Porcentaje de la secuencia de DNA en exones (secuencias que codifican proteínas)	1,5%
Porcentaje de DNA en otras secuencias altamente conservadas***	3,5%
Porcentaje de DNA en elementos de copia altamente repetida	50% aproximadamente

* Se conoce de forma precisa la secuencia de 2850 millones de nucleótidos (con un error de alrededor de uno por 100.000 nucleótidos). El resto del DNA consiste esencialmente en secuencias cortas repetidas en tándem, cuyo número de repeticiones varía entre individuos.

** Un pseudogén es una secuencia de nucleótidos muy parecida a la de un gen funcional, pero que contiene muchas mutaciones que evitan su expresión adecuada. La mayoría de pseudogenes han surgido de la duplicación de un gen funcional que posteriormente ha acumulado mutaciones nocivas en una copia.

*** Regiones funcionalmente conservadas; entre ellas DNA que codifica UTR 5' y 3' (regiones no traducidas), RNA estructurales y funcionales y regiones conservadas del DNA de unión a proteínas.

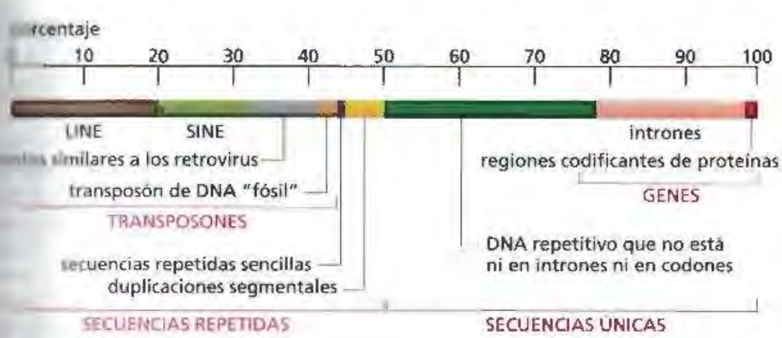


Figura 4-17 Representación de la secuencia de nucleótidos contenida en el genoma humano completamente secuenciado. Los LINE, SINE, elementos semejantes a retrovirus y a transposones de DNA, son elementos genéticos móviles que se han multiplicado en nuestro genoma por autorreplicación e inserción de las nuevas copias en posiciones diferentes. Los elementos génicos móviles son tratados en el Capítulo 5 (véase la Tabla 5-3, p. 318). Las secuencias repetidas sencillas son secuencias cortas (menos de 14 pares de nucleótidos) repetidas varias veces y que forman largos segmentos. Las duplicaciones segmentales son extensos bloques del genoma (1000-200.000 pares de nucleótidos) que están presentes en dos o más posiciones del genoma. Los bloques de DNA más repetidos en la heterocromatina aún no han sido secuenciados, por lo tanto, cerca del 10% de las secuencias de DNA no están representadas en este diagrama. (Datos por cortesía de E. Margulies.)

...ente, la secuenciación del genoma humano ha puesto de manifiesto que la in... crítica para generar un ser humano parece estar inmersa en un alarmante estado ... Un comentarista describió nuestro genoma de la siguiente forma: "De alguna ... de parecer nuestro garaje/habitación/nevera/vida: extremadamente individua... descuidado; con pocas evidencias de organización, mucho desorden acumulado, ... desperdicios", prácticamente no se ha tirado nunca nada y parece que los pocos ... realmente valiosos han sido distribuidos por todas partes de forma indiscrimi... ...uidada".

...mparación del genoma revela secuencias de DNA ...rvadas evolutivamente

... de que probablemente una gran parte del genoma no sea importante, es el mayor ... para la interpretación de la secuencia de nucleótidos de los cromosomas huma... ... las regiones codificantes del genoma (los exones) constituyen segmentos cor... ... tamaño medio aproximado de 145 pares de bases) flotando en un mar de DNA ...ncia es poco trascendental. Esta distribución dificulta mucho la identificación de ...xones de la extensa secuencia de DNA; pero todavía resulta más difícil determinar ...pieza y dónde termina un gen y cuántos exones lo forman exactamente.

... identificación génica precisa es necesario realizar aproximaciones que incorpo... ...ación inherente de la baja relación entre la señal y el ruido de fondo en el genoma ... Describiremos algunas de ellas en el Capítulo 8. Aquí sólo trataremos una aproxi... ...eral, basada en la observación de que las secuencias funcionales se han conser...amente durante la evolución, mientras que las que no tienen función son libres ...utaciones al azar. Esta estrategia consiste en comparar la secuencia humana con ... correspondientes de un genoma relacionado, como por ejemplo el de ratón. Se ... los humanos y los ratones se empezaron a separar de un mamífero ancestral co... unos 80×10^6 años. Este periodo es suficiente para que la mayoría de los nucleó... ...noma hayan podido experimentar procesos de mutación al azar. De modo que ...secuencias que se han mantenido similares en los dos genomas son aquellas que ...adas por mutaciones podían haber dañado su funcionalidad y provocar que los ... portadores estuvieran en desventaja y fueran eliminados de la población por se...tural. Estas regiones tan similares se conocen por lo general como *regiones con...* Las regiones conservadas incluyen los exones funcionalmente importantes y las ... de regulación del DNA. Por el contrario, las *regiones no conservadas* correspon...A cuya secuencia no parece ser crítica para su funcionalidad.

...encia de este método se puede aumentar comparando nuestro genoma con el de ...les cuyos genomas han sido completamente secuenciados, como la rata, el po... ...pancé y el perro. El estudio comparativo de las secuencias de DNA revela los re... ... un larguísimo "experimento" natural, llevado a cabo durante cientos de millones ... ha permitido identificar las regiones del genoma que son más interesantes. Las ...ones revelan que aproximadamente el 5% del genoma humano consiste en se...onservadas en varias especies, como se detalla hacia el final de este capítulo. Sor...niente, sólo un tercio de estas secuencias codifican proteínas. Algunas de las ... no codificantes conservadas corresponden a grupos de lugares de unión a pro...licados en la regulación génica, mientras que otras producen moléculas de RNA ...aducen a proteína. Pero la función de la mayoría de estas secuencias sigue sien-

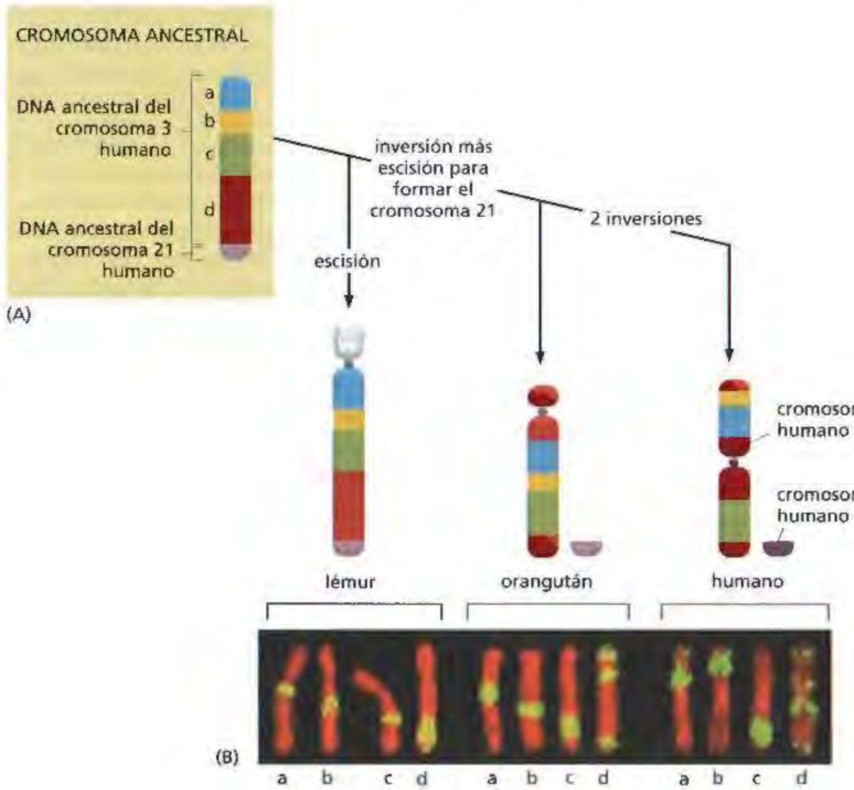


Figura 4–18 Historia propuesta de la evolución del cromosoma 3 humano y su equivalente en otros mamíferos. (A) Se indica el orden de los segmentos del cromosoma 3 que hipotéticamente estaban presentes en el cromosoma de un mamífero antepasado (sombreado en *amarillo*). También se indican los cambios mínimos necesarios para explicar la formación de cada uno de los tres cromosomas actuales a partir de este antepasado. A esta resolución, los cromosomas actuales de los humanos y de los simios de África son idénticos. Los *círculos pequeños* indican la ubicación de los centrómeros en los cromosomas actuales. Se considera que en los mamíferos los procesos de escisión e inversión que conducen a cambios en la organización de los cromosomas ocurren una vez cada 5-10 $\times$ 10^6 años. (B) Algunos de los experimentos de tinción de cromosomas que han contribuido a la elaboración del diagrama (A). Cada imagen muestra el cromosoma más estrechamente relacionado con el cromosoma 3 humano, teñido de *verde* mediante hibridación con diferentes segmentos de DNA. Las letras a, b, c y d situadas en la *parte inferior* de la imagen se corresponden con los segmentos coloreados del esquema (A). (De S. Müller et al., *Proc. Natl Acad. Sci.* U.S.A. 97:206-211, 2000. Con la autorización de National Academy of Sciences.)

do desconocida. Este descubrimiento inesperado ha llevado a los científicos a concluir que comprendemos menos de lo que imaginábamos sobre la biología celular de los vertebrados. Ciertamente, hay enormes oportunidades para que se produzcan nuevos hallazgos y todavía tenemos que esperar más sorpresas en el futuro.

Estudios comparativos de este tipo han puesto de manifiesto que no sólo los humanos y otros mamíferos compartimos la mayor parte de los mismos genes, sino también que grandes bloques de nuestros genomas contienen estos genes dispuestos en el mismo orden, característica denominada *sintenia conservada*. En consecuencia, grandes bloques de nuestro genoma se pueden reconocer en otras especies. Esto permite utilizar la técnica de tinción de cromosomas para reconstruir la historia evolutiva reciente de los cromosomas humanos (**Figura 4–18**).

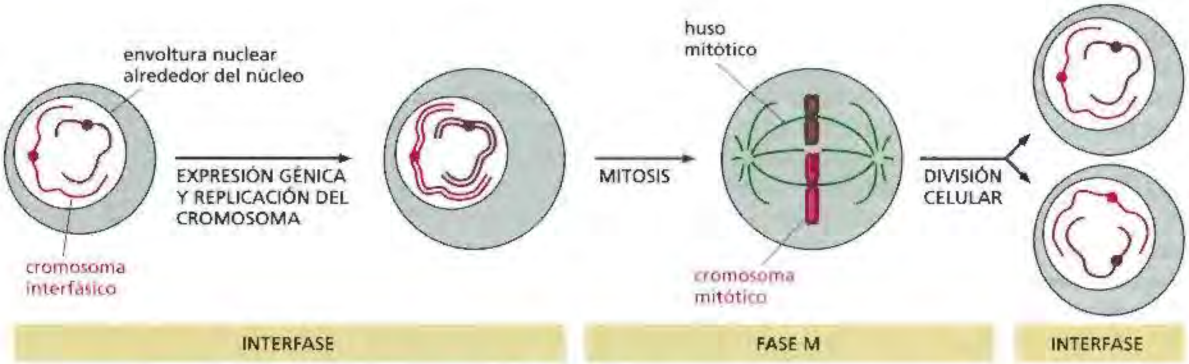


Figura 4–19 Una visión simplificada del ciclo celular eucariota. Durante la interfase, la célula expresa activamente sus genes y sintetiza proteínas. Todavía durante la interfase, antes de la división celular, el DNA se replica y cada cromosoma se duplica produciendo dos cromosomas hermanos estrechamente apareados (aquí se ilustra una célula con sólo dos cromosomas). Cuando se ha completado la replicación del DNA, la célula puede entrar en la *fase M*, en la que tiene lugar la mitosis y el núcleo se divide en dos núcleos. Durante esta fase los cromosomas se condensan, se rompe la envoltura nuclear y se forma el huso mitótico a partir de microtúbulos y de otras proteínas. Los cromosomas condensados son capturados por el huso mitótico y se estira un juego completo de cromosomas hacia cada uno de los extremos de la célula separando cada par de cromosomas hijos. En torno a cada juego de cromosomas se forma una nueva envoltura nuclear y, en la etapa final de la fase M, la célula se divide generando dos células hijas. La mayor parte del ciclo celular corresponde a la interfase; en comparación la fase M es breve, en muchas células de mamífero dura aproximadamente una hora.

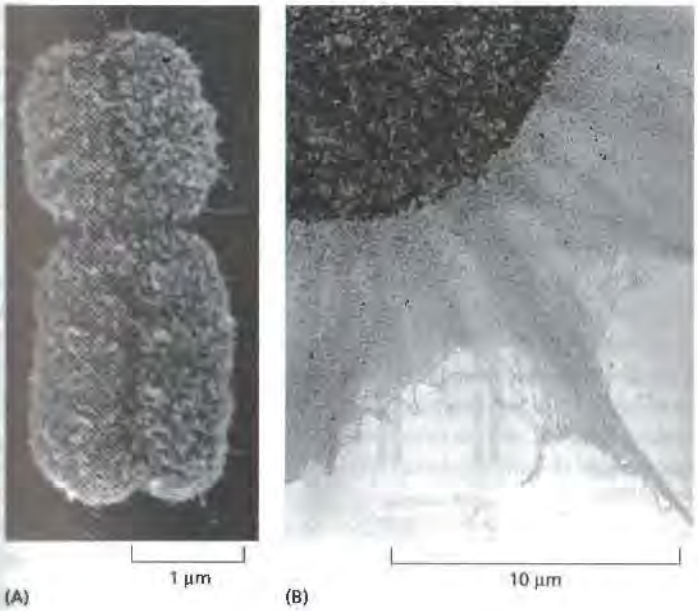


Figura 4–20 Comparación entre la cromatina interfásica extendida y la cromatina del cromosoma mitótico. (A) Electromicrografía de un cromosoma mitótico: un cromosoma duplicado condensado en el que los dos nuevos cromosomas aún están unidos (véase la Figura 4–21). La zona constreñida indica la posición del centrómero, descrito en la Figura 4–21. (B) Electromicrografía que muestra un enorme ovillo de cromatina saliendo de un núcleo interfásico lisado. Obsérvese la diferencia de escala. (A, cortesía de Terry D. Allen; B, cortesía de Victoria Foe.)

A lo largo de la vida de una célula los cromosomas adoptan diferentes estados

Hemos descrito cómo los genes se distribuyen en los cromosomas, pero para formar un cromosoma funcional, una molécula de DNA debe ser capaz de hacer algo más que simplemente contener genes: tiene que ser capaz de replicarse y las copias replicadas tienen que separarse y ser distribuidas fielmente entre las células hijas en cada división. Este proceso tiene lugar a través de una serie de etapas ordenadas que en conjunto se conocen con el nombre de **ciclo celular**, en el cual se produce una separación temporal entre la duplicación de los cromosomas y su segregación en las dos células hijas. El ciclo celular se ha resumido esquemáticamente en la **Figura 4–19** y es tratado con más detalle en el Capítulo 17. En este capítulo solamente nos interesan ciertas etapas del ciclo celular. En la *interfase* los cromosomas se duplican y durante la *mitosis* se empaquetan densamente y después se separan y se distribuyen en los dos núcleos de las células hijas. Los cromosomas altamente condensados de las células en división se conocen como *cromosomas mitóticos* (**Figura 4–20A**). En esta situación los cromosomas son más fáciles de observar, de hecho todas las imágenes de cromosomas mostradas a lo largo de este capítulo son cromosomas mitóticos. Durante la división celular, el estado condensado de los cromosomas mitóticos es importante para la separación precisa de los cromosomas duplicados mediante el huso mitótico, como veremos en el Capítulo 17.

Durante el periodo del ciclo celular en el que la célula no se está dividiendo, los cromosomas están extendidos y buena parte de su cromatina forma una larga, fina y enmarañada masa dentro del núcleo. Por este motivo, los cromosomas no pueden distinguirse con facilidad durante este periodo (Figura 4–20B). En este estado descondensado, los cromosomas se denominan *cromosomas interfásicos*. Dado que las células están la mayoría del tiempo en interfase, momento en que su información genética es leída, los cromosomas son de mayor interés para los biólogos cuando son visibles.

Cada molécula de DNA que forma un cromosoma lineal debe contener un centrómero, dos telómeros y orígenes de replicación

Un cromosoma actúa como una unidad estructural diferenciada: para que cada célula hija reciba una copia en cada división celular, cada cromosoma tiene que ser capaz de replicarse, y las copias replicadas deben separarse y repartirse correctamente entre las dos células hijas. Estas funciones básicas están controladas por tres tipos de secuencias de DNA especializadas que se encuentran en todos los cromosomas de las células eucariotas, a cada una de estas secuencias se unen proteínas específicas que guían la maquinaria que replica y separa los cromosomas (**Figura 4–21**).

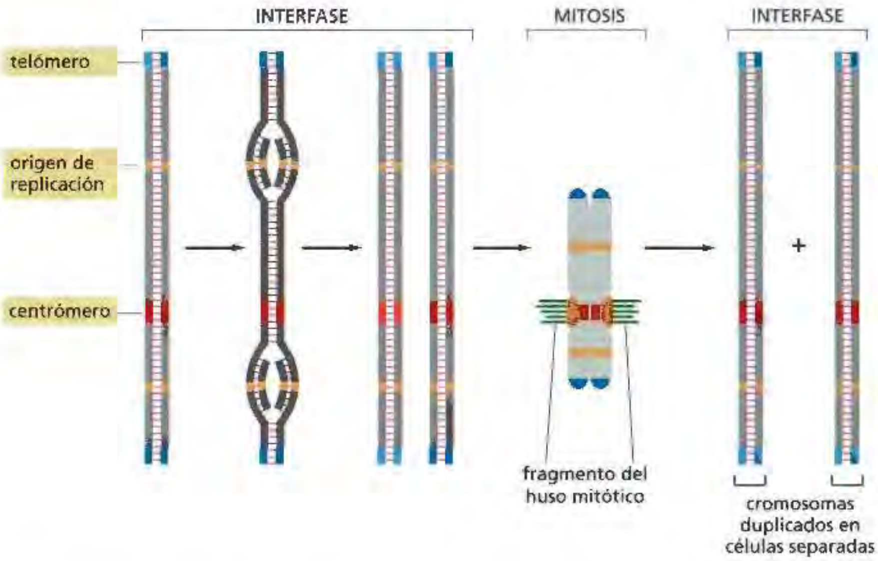


Figura 4–21 Los tres elementos de secuencia de DNA necesarios para producir un cromosoma eucariota que pueda ser replicado y segregado en la mitosis. Cada cromosoma tiene varios orígenes de replicación, un centrómero y dos telómeros. Se muestra esquemáticamente la secuencia de procesos que sigue un cromosoma normal durante el ciclo celular. El DNA se replica en la interfase iniciándose el proceso en los orígenes de replicación y continuando en ambos sentidos a lo largo de todo el cromosoma. En la fase M, el centrómero une los cromosomas duplicados al huso mitótico de forma que se distribuye una copia del cromosoma a cada célula hija durante la mitosis. El centrómero también ayuda a mantener juntos los cromosomas hasta que están listos para separarse. Los telómeros forman capuchas especiales en cada extremo del cromosoma.

Experimentos realizados en levaduras, cuyos cromosomas son relativamente pequeños y fáciles de manipular, han permitido identificar la secuencia mínima de estos elementos responsables de cada una de estas funciones. Un tipo de secuencia de nucleótidos actúa como un **origen de replicación** del DNA, lugar donde se inicia la replicación del DNA. La mayoría de los cromosomas de las células eucariotas contienen muchos orígenes de replicación, lo que asegura que todo el cromosoma se replique con rapidez, como se describirá más detalladamente en el Capítulo 5.

Después de la duplicación, los dos cromosomas hermanos permanecen unidos entre sí y a medida que va progresando el ciclo, se van condensando hasta convertirse en los cromosomas mitóticos. La presencia de una segunda secuencia especializada de DNA, denominada **centrómero**, permite que cuando una célula se divide, cada copia de un cromosoma replicado sea arrastrada a cada una de las células hijas. En el centrómero se forma un complejo de proteínas denominado *cinetocoro*, que une los cromosomas duplicados al huso y facilita su posterior separación (véase el Capítulo 17).

La tercera secuencia especializada de DNA, denominada **telómero**, se localiza en cada uno de los dos extremos de un cromosoma. Los telómeros contienen secuencias de nucleótidos repetidas que permiten la replicación eficiente de los extremos de los cromosomas. Los telómeros tienen otra función: las secuencias repetidas del telómero, junto con las regiones colindantes, forman estructuras que protegen el extremo de ser confundido por las células como una molécula de DNA rota que necesita ser reparada. Este tipo de reparación y la estructura y función de los telómeros se tratan en el Capítulo 5.

En las células de levadura, los tres tipos de secuencias necesarios para que un cromosoma se transmita son relativamente cortas (por lo general tienen menos de 1000 pares de bases cada una), por lo que sólo utilizan una pequeña fracción de la capacidad total de almacenamiento de información del cromosoma. Aunque las secuencias teloméricas son bastante sencillas y cortas en todos los eucariotas, las secuencias de DNA que forman los centrómeros y los orígenes de replicación son más largas en los organismos más complejos que en la levadura. Por ejemplo, ciertos experimentos sugieren que los centrómeros humanos tienen más de 100.000 pares de nucleótidos y podrían no necesitar una cadena de DNA con una secuencia definida de nucleótidos. En cambio, como veremos más adelante en este capítulo, parece que consisten en una gran estructura ácido nucleico-proteína repetida regularmente, que se puede heredar cuando el cromosoma se replica.

Las moléculas de DNA están altamente condensadas en los cromosomas

Todos los organismos eucariotas tienen mecanismos especiales que empaquetan su DNA en cromosomas. Por ejemplo, si los 48 millones de pares de nucleótidos de DNA del cromosoma humano 22 pudieran disponerse en una larga doble hélice perfecta, la molécula tendría alrededor de 1,5 centímetros extendida de punta a punta. En cambio el cromosoma 22

en mitosis sólo tiene una longitud de unos 2 μm (véase las Figuras 4–10 y 4–11), lo que representa una compactación longitudinal de cerca de 10.000 veces. Esta proeza la llevan a cabo proteínas que van enrollando y plegando progresivamente el DNA en niveles de organización cada vez de orden superior. Aunque mucho menos condensado que los cromosomas mitóticos, el DNA de los cromosomas interfásicos humanos también está empaquetado, con un grado medio de compactación de aproximadamente 500 veces (la longitud de la hélice de DNA de un cromosoma, dividida entre la longitud de punta a punta de ese cromosoma).

Al leer esta sección es importante tener presente que los cromosomas son estructuras dinámicas. Hemos visto que cada cromosoma se condensa en un grado inusual en la fase M del ciclo celular. Aunque mucho menos visible, pero de un enorme interés e importancia, algunas regiones específicas de los cromosomas interfásicos se descondensan de forma que las células pueden tener acceso a secuencias específicas de DNA para la expresión de genes o la reparación y replicación del DNA, y luego se recondensan cuando estos procesos se han completado. El empaquetamiento de los cromosomas tiene que producirse de tal forma que permita localizar rápidamente las demandas de acceso al DNA. En las siguientes secciones hablaremos sobre las proteínas especializadas que hacen posible este empaquetamiento.

Los nucleosomas son una unidad básica de la estructura de la cromatina

Tradicionalmente las proteínas que se unen al DNA de los cromosomas eucariotas se clasifican en dos grupos: las **histonas** y las *proteínas cromosómicas no-histonas*. El complejo formado por el DNA cromosómico y las dos clases de proteínas se denomina **cromatina**. Las histonas están presentes en grandes cantidades (alrededor de 60 millones de moléculas de cada tipo por célula humana), de forma que en la cromatina la masa total de histonas es aproximadamente igual a la del DNA.

Las histonas son responsables del primer y más básico nivel de empaquetamiento del cromosoma, el **nucleosoma**, un complejo proteína-DNA descubierto en 1974. Cuando los núcleos interfásicos se fragmentan suavemente y se examina su contenido al microscopio electrónico, la mayor parte de la cromatina se encuentra formando una fibra de un diámetro aproximado de 30 nm (**Figura 4–22A**). Si esta cromatina se somete a tratamientos que la descondensan, es posible verla al microscopio electrónico como una serie de "cuentas de collar" (Figura 4–22B). El collar es el DNA y cada una de las cuentas es el "núcleo de una partícula nucleosomal" que está formado por DNA que envuelve el núcleo de proteínas formado por histonas. <ACTC>

La organización estructural de los nucleosomas se determinó después de aislarlos a partir de cromatina descondensada, por digestión con un tipo de enzimas (denominadas nucleasas) que rompen el DNA cortándolo entre los nucleótidos. Tras una digestión suave, el DNA expuesto ubicado entre los núcleos de las partículas nucleosomales, el *DNA espaciador*, es degradado. Cada nucleosoma está formado por un complejo de ocho proteínas histonas –dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4– y un DNA de doble cadena de 147 pares de bases. El *octámero de histonas* forma un núcleo de proteínas alrededor del cual se enrolla el DNA de doble cadena (**Figura 4–23**).

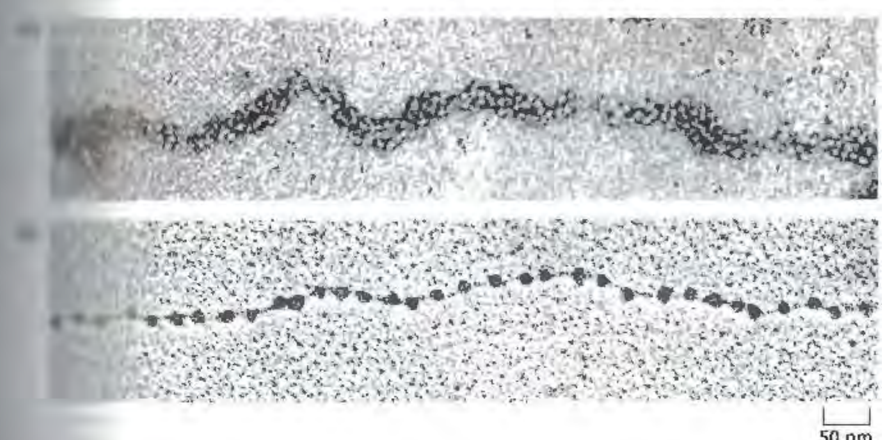


Figura 4–22 Nucleosomas observados con el microscopio electrónico. (A) Al microscopio electrónico, la cromatina aislada directamente a partir de un núcleo interfásico aparece como una fibra de 30 nm de diámetro. (B) Esta electromicrografía muestra una cierta longitud de cromatina que después del aislamiento ha sido desempaquetada o "descondensada" experimentalmente, para poder observar los nucleosomas. (A, cortesía de Barbara Hamkalo; B, cortesía de Victoria Foe.)

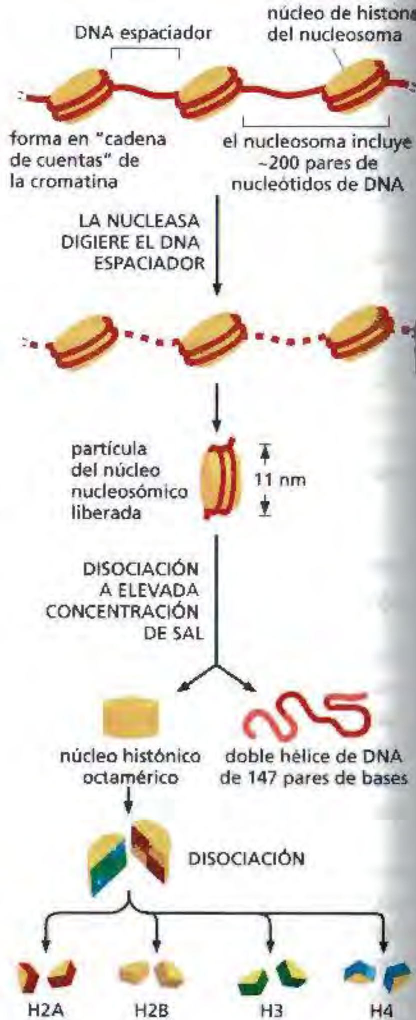


Figura 4–23 Organización estructural del nucleosoma. Un nucleosoma contiene un núcleo proteico formado por ocho moléculas de histona. Experimentalmente, la partícula del núcleo nucleosómico se puede liberar de la cromatina aislada mediante digestión del DNA espaciador con una nucleasa, una enzima que degrada el DNA. (La nucleasa puede degradar el DNA expuesto pero no puede atacar el DNA unido alrededor del núcleo del nucleosoma.) Tras la disociación de los nucleosomas aislados en sus componentes (el núcleo de proteínas y el DNA), se puede determinar la longitud del DNA que estaba enrollado alrededor del núcleo. Su longitud de 147 pares de nucleótidos es suficiente para rodear casi 1,7 veces el núcleo de histonas.

Cada nucleosoma está separado del siguiente por una región de DNA puente o espaciador, de una longitud que varía de unos pocos hasta más de 80 pares de nucleótidos. (El término *nucleosoma* técnicamente se refiere a un núcleo de partícula nucleosomal más el DNA espaciador adyacente, pero a menudo se utiliza para referirse a la partícula del núcleo del nucleosoma.) Por término medio, los nucleosomas se repiten a intervalos de 200 pares de nucleótidos. Por ejemplo, una célula humana diploide con $6{,}4 \times 10^9$ pares de bases puede tener unos 30 millones de nucleosomas. La formación de los nucleosomas convierte a la molécula de DNA en una hebra de cromatina de aproximadamente un tercio de su longitud original.

La estructura de la partícula del núcleo del nucleosoma muestra cómo se empaqueta el DNA

La estructura de alta resolución de la partícula del núcleo del nucleosoma, resuelta en 1997, muestra que cada partícula consta de un núcleo de histonas en forma de disco, alrededor del cual se disponen 1,7 vueltas de DNA que se enrollan hacia la izquierda (**Figura 4–24**). Las cuatro histonas que integran el nucleosoma son proteínas relativamente pequeñas (entre 102-135 aminoácidos) que comparten un mismo motivo estructural que se conoce como *pliegue de la histona* y que se forma a partir de tres hélices α conectadas por dos lazos (**Figura 4–25**). Durante el ensamblaje del nucleosoma, primero se unen las histonas por sus pliegues de la histona, formando los dímeros H3-H4 y H2A-H2B, y los dímeros H3-H4 se combinan entre sí formando tetrámeros. Posteriormente cada tetrámero H3-H4 se combina

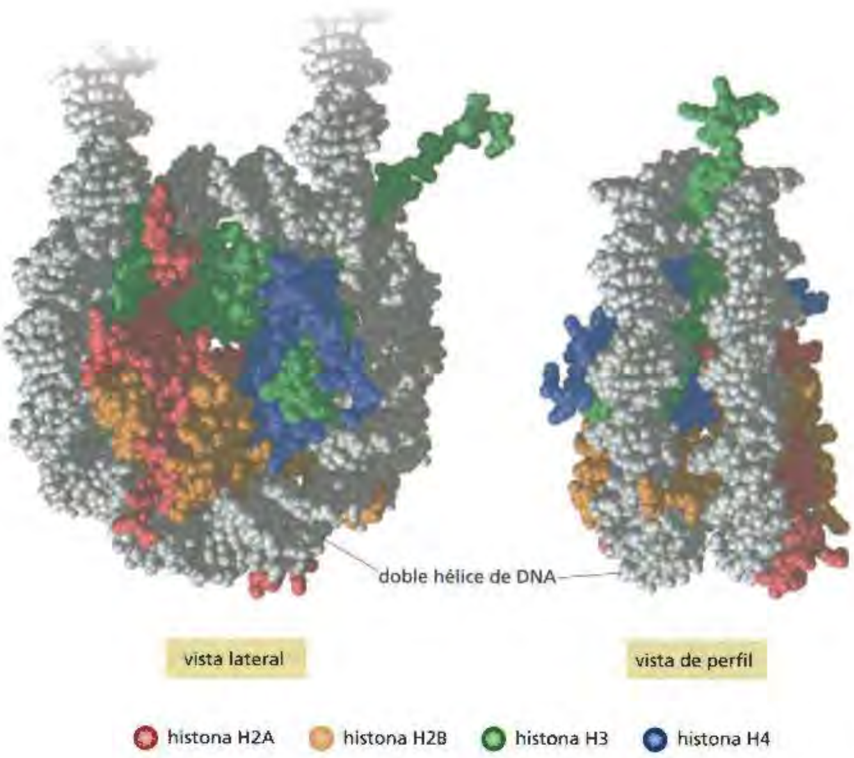
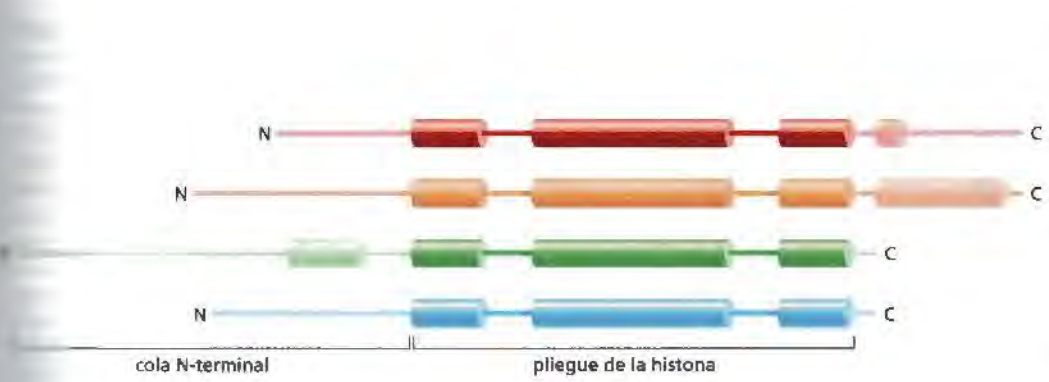


Figura 4–24 Estructura del núcleo del nucleosoma determinada por análisis de cristales por difracción con rayos X. Las histonas se han coloreado como en el esquema de la Figura 4–23 y la doble hélice del DNA en gris claro. (De K. Luger et al., *Nature* 389:251-260, 1997. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)



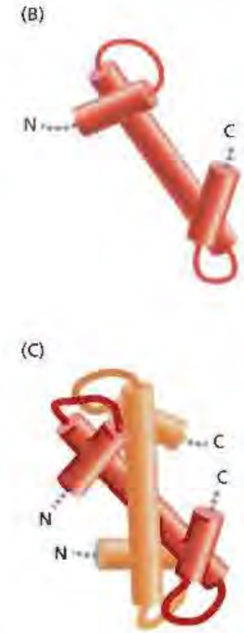


Figura 4–25 **Organización estructural de las histonas del núcleo del nucleosoma.** (A) Cada una de las histonas tiene una cola N-terminal, objeto de diversas modificaciones covalentes, y una región plegada, como se observa en la ilustración. (B) Estructura del pliegue de la histona, formada por las cuatro histonas del núcleo nucleosómico. (C) Las histonas 2A y 2B forman un dímero mediante una interacción conocida como "apretón de manos". Las histonas H3 y H4 forman un dímero mediante el mismo tipo de interacción.

los dos dímeros H2A-H2B formándose un octámero que constituye el núcleo compacto alrededor del cual se enrolla el DNA (**Figura 4–26**).

La interfase entre el DNA y las histonas es muy extensa, y se establecen en cada nucleosoma 142 enlaces de hidrógeno entre el DNA y el núcleo de histonas. Cerca de la mitad de este número de enlaces se forman entre el esqueleto de los aminoácidos de las histonas y el esqueleto fosfodiéster del DNA. También se establecen numerosas interacciones hidrofóbicas y uniones salinas que, junto con las anteriores, mantienen unidos al DNA y las proteínas del nucleosoma. Por ejemplo, más de la quinta parte de los aminoácidos en el núcleo de cada una de las histonas son lisina o arginina (dos aminoácidos con radicales básicos) pudiendo, con sus cargas positivas, neutralizar eficazmente las cargas negativas del esqueleto del DNA. Estas numerosas interacciones explican en parte por qué prácticamente cualquier secuencia de DNA puede unirse a un octámero de histonas. El trayecto del DNA alrededor del núcleo de las histonas no es liso, sino que más bien se observan retorcimientos del DNA, como cabría de esperar de una superficie no uniforme como la del núcleo de las histonas. Este enrollamiento requiere una compresión importante del surco menor de la hélice de DNA. Ciertos dinucleótidos del surco menor son especialmente fáciles de comprimir y algunas secuencias de nucleótidos se unen con mayor fuerza al nucleosoma que otras (Figura 4–27). Esto explica probablemente algunos casos llamativos, aunque inusuales, de nucleosomas en posiciones muy precisas a lo largo de un tramo de DNA. Sin embargo, para la mayoría de secuencias de DNA de los cromosomas, la preferencia de los nucleosomas por secuencias determinadas debe ser suficientemente baja para permitir que predominen otros factores, ya que en la mayoría de regiones cromosómicas los nucleosomas pueden ocupar cualquiera de una serie de posiciones posibles en la secuencia de DNA.

Además del pliegue de las histonas, cada núcleo de histonas tiene una "cola" correspondiente a los aminoácidos N-terminales de las histonas, que se proyecta hacia fuera del núcleo DNA-histona (véase la Figura 4–26). Estas colas de las histonas están sujetas a diferentes tipos de modificaciones covalentes que, a su vez, controlan aspectos críticos de la estructura y de la función de la cromatina, como veremos en breve.

Las histonas son unas de las proteínas eucariotas más conservadas de la célula, lo que refleja su papel fundamental sobre la función del DNA a través del control de la estructura de la cromatina. Por ejemplo, sólo existen dos diferencias en los 102 aminoácidos entre la secuencia de aminoácidos de la histona H4 de guisante y la de vaca. Este elevado grado de conservación evolutivo sugiere que en la función de estas histonas participan casi todos sus aminoácidos, de modo que cualquier cambio en cualquier posición resulta deletéreo para la célula. Esta suposición se ha podido verificar en levaduras, en las que es posible mutar *in vitro* una histona dada e introducirla en el genoma de la levadura en lugar del gen normal. Como era de esperar, la mayor parte de las mutaciones son letales; algunas que no lo son producen cambios en el patrón normal de expresión génica, así como otras anormalidades.

A pesar del elevado grado de conservación del núcleo de las histonas, muchos organismos eucariotas también producen pequeñas cantidades de variantes especializadas de las histonas del núcleo, que difieren de las histonas principales en su secuencia de aminoácidos. Como veremos, estas variantes, combinadas con una sorprendente variedad de modificaciones covalentes que pueden ser añadidas a las histonas del nucleosoma, hacen posible las estructuras tan diferentes de la cromatina necesarias para la función del DNA en los eucariotas superiores.

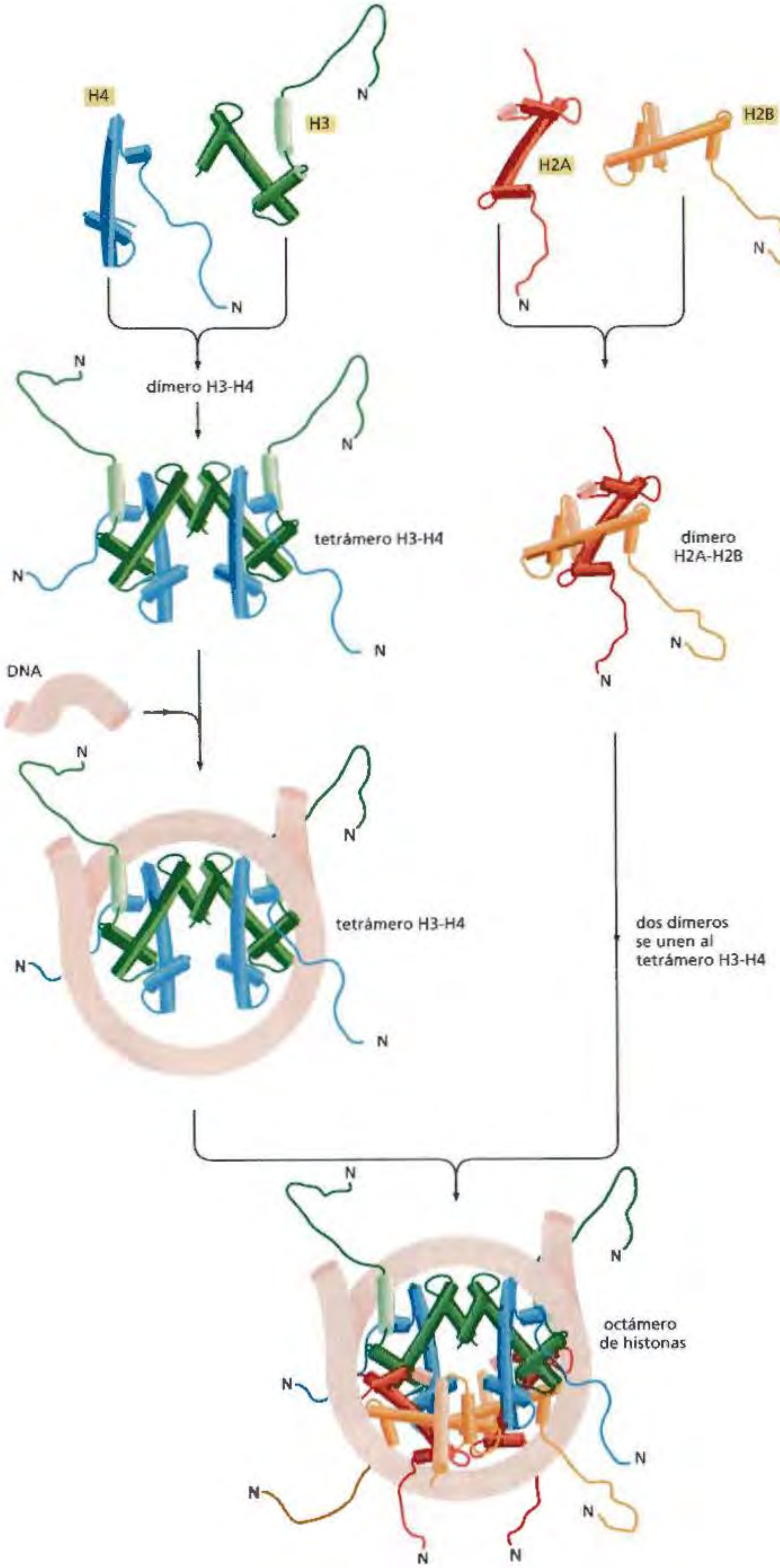


Figura 4–26 Ensamblaje de un octámero de histonas al DNA. El dímero de las histonas H3-H4 y el dímero H2A-H2B se forman a través de interacciones del tipo "apretón de manos". Se forma un tetrámero de H3-H4 y se une al DNA. Luego se incorporan dos dímeros de H2A-H2B completando el nucleosoma. La coloración de las histonas es la misma que en la Figuras 4-24 y 4-25. Puede apreciarse que las ocho colas N-terminal de las histonas sobresalen de la estructura en forma de disco del núcleo. Su conformación es muy flexible.

En el interior celular, las reacciones de ensamblaje del nucleosoma mostradas están mediadas por *chaperonas de las histonas*, algunas específicas para H3-H4 y otras para H2A-H2B. (Adaptado a partir de figuras de J. Waterborg.)

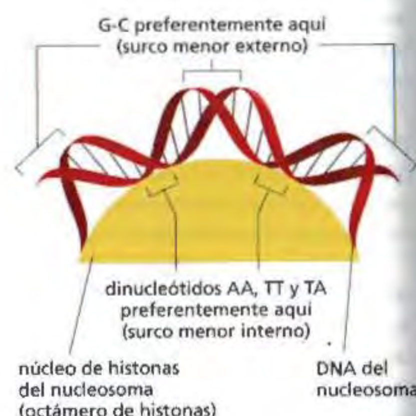


Figura 4–27 Curvatura del DNA en un nucleosoma. La hélice de DNA da 1,7 vueltas alrededor del octámero de histonas. Este esquema ilustra cómo se comprime el surco menor en la parte interior del giro. Debido a ciertas características de la molécula de DNA, los dinucleótidos indicados tienden a acomodarse sobre todo en el surco menor, lo que ayuda a explicar por qué ciertas secuencias de DNA se unirán con más fuerza que otras al núcleo del nucleosoma.

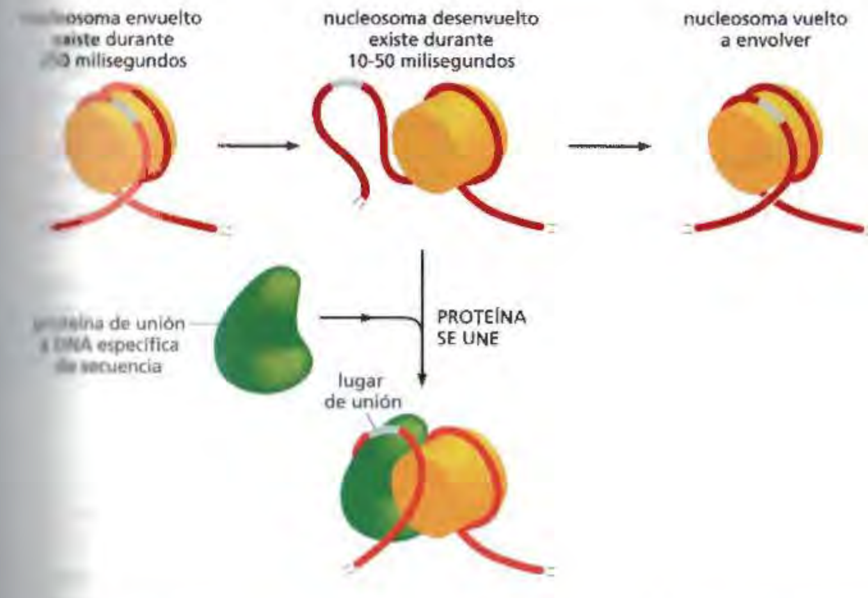


Figura 4–28 Nucleosomas dinámicos. Diferentes análisis cinéticos han mostrado que el DNA de un nucleosoma aislado es sorprendentemente dinámico, y se desenrolla y enrolla de nuevo rápidamente alrededor de su nucleosoma. Como se indica, este hecho hace que la mayor parte de su secuencia unida sea accesible a otras proteínas de unión a DNA. (Datos de G. Li y J. Widom, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:763-769, 2004. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

Los nucleosomas tienen una estructura dinámica y con frecuencia están sujetos a cambios catalizados por complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP

Durante muchos años, los biólogos creyeron que cuando el nucleosoma se había formado en una posición concreta del DNA, permanecía fijado en ese lugar debido a la fuerte asociación entre las histonas de su núcleo y el DNA. De ser cierto, esta teoría plantearía problemas en los mecanismos de lectura génica, que en principio requieren un acceso rápido a muchas secuencias específicas de DNA, así como al rápido tránsito de la maquinaria de transcripción y replicación del DNA a través de la cromatina. Pero experimentos dinámicos muestran que el DNA en un nucleosoma aislado se desenrolla desde cada extremo a una velocidad de 4 veces por segundo, quedando expuesto entre 10 y 50 milisegundos antes de que la estructura desenrollada vuelva a replegarse. Así, la mayor parte del DNA de un nucleosoma aislado está disponible para que se una a otras proteínas (**Figura 4–28**).

La cromatina en una célula necesita claramente una mayor pérdida de contacto DNA-histona, porque las células eucariotas contienen una gran variedad de *complejos remodeladores de cromatina* dependientes de ATP. La subunidad que hidroliza el ATP en estos complejos está relacionada evolutivamente con las helicasas de DNA (tratadas en el Capítulo 5) y se une tanto al núcleo proteico del nucleosoma como a la doble cadena de DNA enrollada en él. Esta subunidad cambia la estructura del nucleosoma temporalmente utilizando la energía de la hidrólisis del ATP para desplazar el DNA unido al núcleo nucleosómico y disminuir la fuerza con la que el DNA está unido a las histonas. A través de repetidos ciclos de hidrólisis de ATP, los complejos remodeladores pueden catalizar el *desplazamiento de los nucleosomas* y, al empujar de este modo el núcleo del nucleosoma a lo largo de la doble hélice

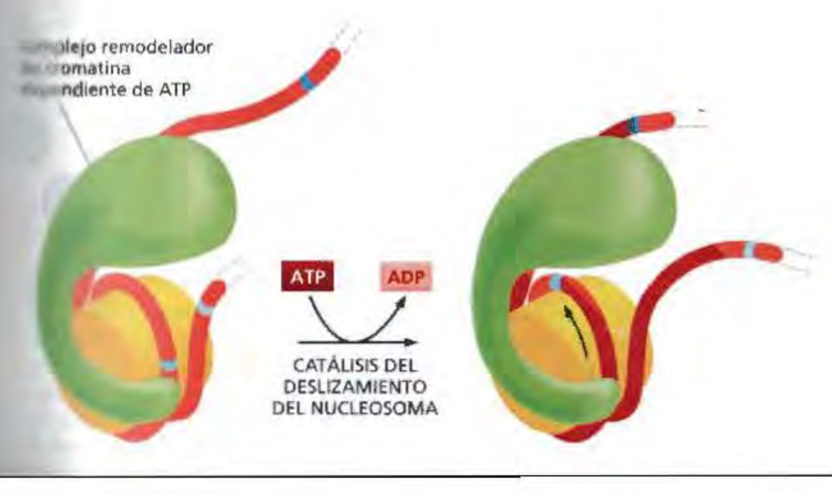


Figura 4–29 Deslizamiento del nucleosoma catalizado por complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP. Parece que los complejos remodeladores utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para desplazar el DNA de su unión al nucleosoma y separarlo del núcleo del nucleosoma. Cada ciclo de unión de ATP, hidrólisis de ATP y liberación de los productos ADP y P_i desplaza el DNA respecto al octámero de histonas en el sentido indicado por la flecha en el diagrama. Se requieren muchos ciclos como este para producir el deslizamiento mostrado del nucleosoma. (Véase también la Figura 4–46B.)

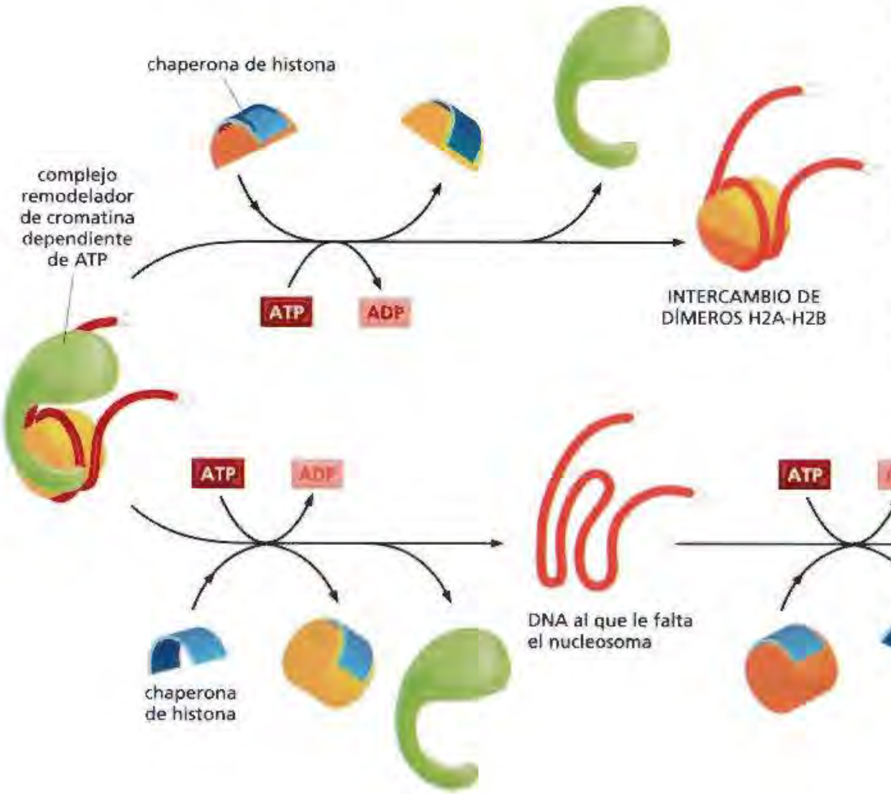


Figura 4–30 Eliminación del nucleosoma y cambio de histonas catalizado por complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP. Mediante la cooperación con chaperonas de histonas específicas, algunos complejos remodeladores eliminan los dímeros H2A-H2B de un nucleosoma (serie de reacciones superior) y los sustituyen por dímeros que contienen una variante de histona, como el dímero H2AZ-H2B (véase la Figura 4–41). Otros complejos remodeladores son atraídos a lugares específicos de la cromatina eliminando el octámero de histonas completamente y/o sustituyéndolo por un núcleo nucleosómico diferente (serie de reacciones inferior).

de DNA, hacen que el DNA nucleosomal sea accesible a otras proteínas celulares (**Figura 4–29**). Además, mediante la cooperación con proteínas cargadas negativamente que actúan de chaperonas para las histonas, algunos complejos remodeladores son capaces de suprimir, totalmente o en parte, el núcleo de un nucleosoma –catalizando el recambio de una de sus histonas H2A-H2B, o eliminando completamente el núcleo octamérico del DNA (**Figura 4–30**).

Las células tienen docenas de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP diferentes y especializados en diferentes funciones. La mayoría son grandes proteínas que pueden tener 10 o más subunidades. La actividad de estos complejos está regulada cuidadosamente por la célula. Dado que los genes se activan y desactivan, los complejos remodeladores de cromatina son conducidos a regiones específicas de DNA donde actúan de forma local influyendo en la estructura de la cromatina (tratado en el Capítulo 7; véase también la Figura 4–46, más adelante).

Como se mencionó anteriormente, para la mayoría de secuencias de DNA de los cromosomas, los experimentos muestran que un nucleosoma ocupa cualquiera de una serie de posibles posiciones de la secuencia del DNA. Parece que lo que más influye en la localización del nucleosoma es la presencia de otras proteínas fuertemente unidas el DNA. Ciertas proteínas unidas favorecen la formación de un nucleosoma adyacente a ellas. Otras, constituyen obstáculos que determinan el ensamblaje de los nucleosomas entre ellas. El posicionamiento exacto de los nucleosomas a lo largo de la hebra de DNA depende principalmente de la presencia y naturaleza de otras proteínas unidas al DNA. Debido a la presencia de los complejos remodeladores dependientes de ATP, la disposición de los nucleosomas en el DNA puede ser muy dinámica y cambiar con rapidez de acuerdo con las necesidades de la célula.

Los nucleosomas suelen estar empaquetados juntos formando una fibra compacta de cromatina

A pesar de que el DNA cromosómico está formado por largas cadenas de nucleosomas, es poco probable que en una célula viva la cromatina se disponga en la forma de "collar de cuentas". En lugar de ello, los nucleosomas se empaquetan uno sobre otro y adoptan disposiciones regulares en las que el DNA se encuentra incluso más condensado. Así pues, si se

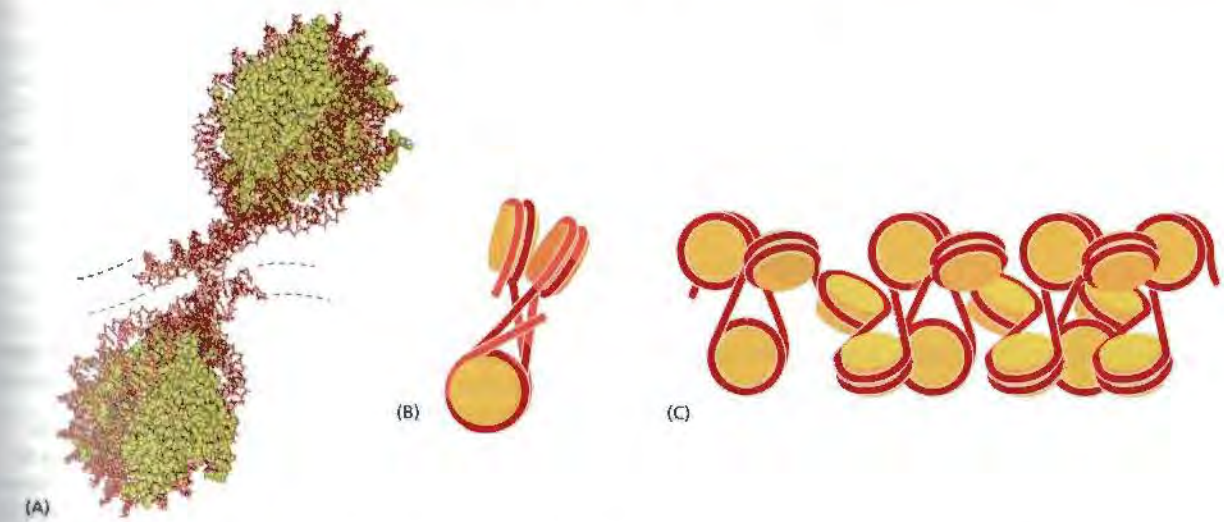


Figura 4–31 **Modelo en zigzag de la fibra de cromatina de 30 nm.** (A) La conformación de dos de los cuatro nucleosomas en un tetranucleosoma, estructura determinada por cristalografía de rayos X. (B) Esquema del tetranucleosoma entero; el cuarto nucleosoma no es visible y queda detrás del nucleosoma inferior de este diagrama. (C) Ilustración esquemática de una posible estructura en zigzag que podría explicar la fibra de cromatina de 30 nm. (Adaptado de C.L. Woodcock, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12:639-640, 2005. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

Observan al microscopio electrónico núcleos celulares sometidos a lisis suave, se aprecia que la mayor parte de la cromatina se encuentra organizada en fibras de un diámetro de alrededor de 30 nm, que es considerablemente superior al diámetro de la cromatina en forma de "collar de cuentas" (véase la Figura 4–22).

¿Cómo se empaquetan los nucleosomas en la fibra de cromatina de 30 nm? Esta cuestión todavía no ha sido resuelta definitivamente, pero se ha obtenido información importante relativa a la estructura. En particular, se han llevado a cabo análisis estructurales de alta resolución en cadenas cortas homogéneas de nucleosomas, preparados a partir de histonas y moléculas de DNA purificados. La estructura de un tetranucleosoma, obtenida mediante cristalografía de rayos X, ha sido utilizada para apoyar un modelo de empaquetamiento en zigzag para los nucleosomas en la fibra de 30 nm (**Figura 4–31**). Pero la microscopía crioelectrónica de largas cadenas de nucleosomas apoya una estructura muy diferente: solenoides con nucleosomas intercalados (**Figura 4–32**).

¿Qué es lo que provoca que los nucleosomas se empaqueten entre sí con tanta fuerza formando una fibra de 30 nm? Las interacciones nucleosoma-nucleosoma establecidas entre las colas de las histonas, especialmente la cola de la H4 (**Figura 4–33**), constituyen un fac-

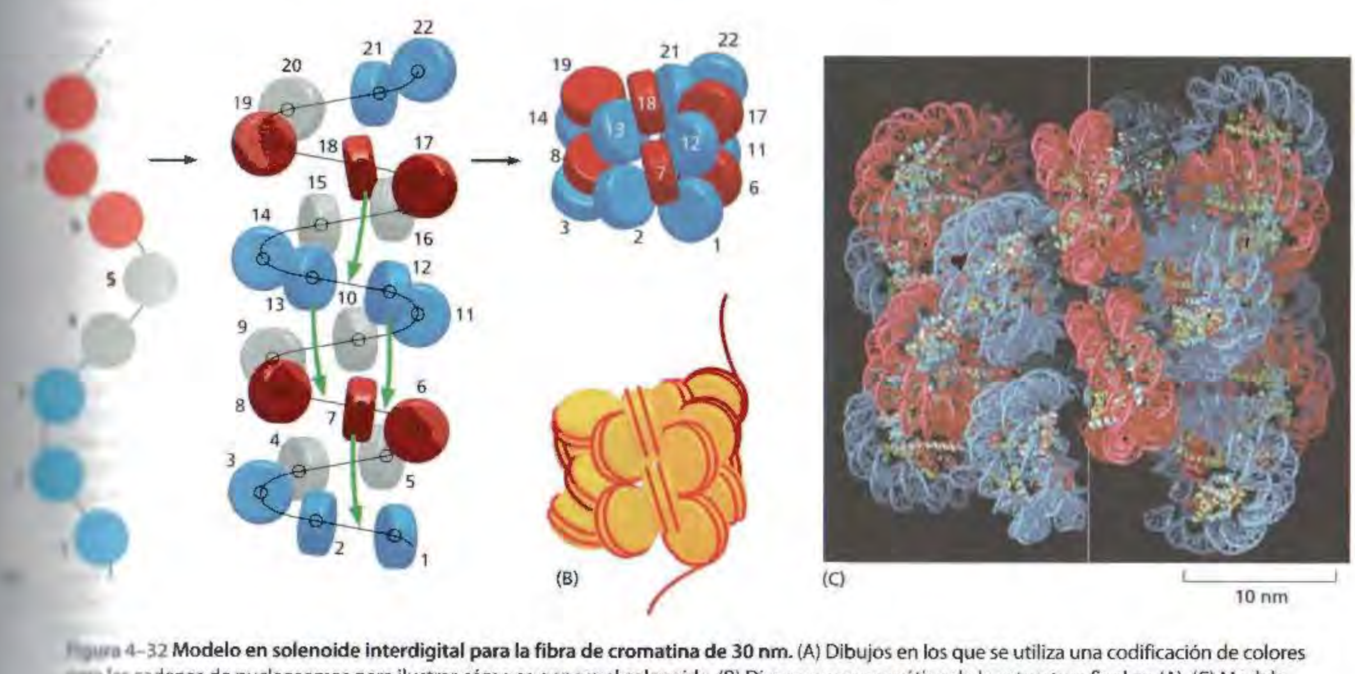


Figura 4–32 **Modelo en solenoide interdigital para la fibra de cromatina de 30 nm.** (A) Dibujos en los que se utiliza una codificación de colores para las cadenas de nucleosomas para ilustrar cómo se genera el solenoide. (B) Diagrama esquemático de la estructura final en (A). (C) Modelo estructural. El modelo deriva de imágenes de microscopía crioelectrónica de alta resolución de conjuntos de nucleosomas reconstituidos a partir de histonas purificadas y de moléculas de DNA de secuencia y longitud específicas. Los octámeros del nucleosoma y la histona puente o espaciadora (se describe más adelante) se utilizaron para producir conjuntos de repeticiones regulares que contenían más de 72 nucleosomas. (Adaptado de P. Robinson, L. Fairall, V. Huynh y D. Rhodes, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 103:6506-6511, 2006. Con la autorización de National Academy of Sciences.)



Figura 4–33 **Modelo especulativo sobre el papel de las colas de las histonas en la formación de la fibra de 30 nm.** (A) El esquema muestra la ubicación aproximada de las proyecciones de las 8 colas de histonas, una por cada histona, que sobresalen de cada nucleosoma. La estructura actual se muestra a su derecha. En la estructura de alta resolución del nucleosoma, las colas están muy desestructuradas, lo que sugiere que son muy flexibles. (B) Modelo especulativo que muestra cómo las colas de las histonas pueden ayudar a los nucleosomas a empaquetarse formando una fibra de 30 nm. Este modelo está basado en (1) la evidencia experimental de que las colas de las histonas ayudan a la formación de la fibra de 30 nm, y (2) en la estructura de rayos X del cristal de nucleosomas, que muestra que las colas de las histonas de un nucleosoma entran en contacto con el núcleo de histonas del nucleosoma adyacente.

tor importante. Otro factor importante es la **histona H1**, una histona adicional que con frecuencia se encuentra en una proporción de 1 a 1 con los núcleos de nucleosoma. Esta histona, llamada también histona de enlace, es de mayor tamaño que las histonas del núcleo y está menos conservada. A cada nucleosoma se le une una sola molécula de histona H1, que entra en contacto con el DNA y con las proteínas, y provoca un cambio de sentido del DNA que sale del nucleosoma. Aunque no se conoce con mucho detalle cómo la histona H1 agrupa los nucleosomas en una fibra de 30 nm, el cambio de sentido del DNA parece ser crucial para el empaquetamiento del DNA nucleosómico, ya que se engrana y forma la fibra de 30 nm (**Figura 4–34**). La mayoría de organismos eucariotas generan varias histonas H1 relacionadas pero que tienen secuencias de aminoácidos bastante distintas.

Es posible que la estructura de 30 nm encontrada en los cromosomas sea un mosaico fluido de diferentes variantes. Por ejemplo, en los conjuntos de nucleosomas estudiados en la Figura 4–32 se presentaba una histona de la familia H1, que no aparecía en el tetranucleosoma en la Figura 4–31. Además, vimos anteriormente que la longitud del DNA espaciador que conecta nucleosomas vecinos puede ser variable; es probable que estas variaciones del espaciador introduzcan perturbaciones locales en la estructura. Por último, seguramente la presencia de muchas otras proteínas que se unen al DNA, así como de proteínas que se unen de forma directa a las histonas, añadan importantes factores adicionales a cualquier conjunto de nucleosomas.

Resumen

Un gen es una secuencia de nucleótidos de una molécula de DNA que actúa como una unidad funcional en la producción de una proteína, una molécula de RNA estructural o una molécula de RNA regulador o catalítico. En los organismos eucariotas, los genes que codifican proteínas están formados habitualmente por una tira de exones e intrones alternados, asociados a regiones de DNA regulador. Un cromosoma está formado por una sola molécula de DNA lineal, muy larga, que contiene una serie lineal de muchos genes. El genoma haploide humano contiene $3{,}2 \times 10^9$ pares de nucleótidos de DNA, distribuidos en 22 autosomas diferentes y 2 cromosomas sexuales. Únicamente una pequeña parte de este DNA codifica proteínas o moléculas funcionales de RNA. Una molécula de DNA cromosómico también tiene otros tres tipos de secuencias de nucleótidos funcionalmente importantes: los orígenes de replicación y los telómeros, que permiten la replicación eficiente del DNA, y el centrómero, que es necesario para unir las moléculas de DNA hermanas al huso mitótico, asegurando su segregación precisa en las células hijas durante la fase M del ciclo celular.

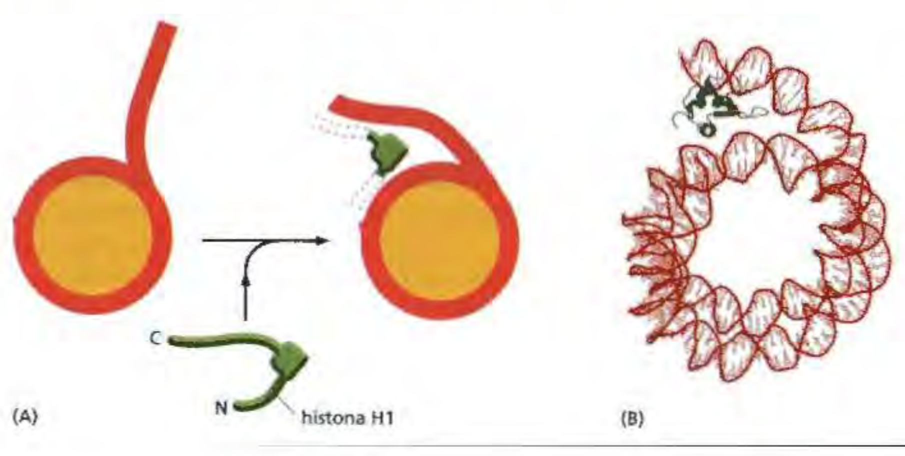


Figura 4–34 **Cómo se une al nucleosoma la histona espaciadora o puente.** Se muestra la posición y la estructura de la región globular de la histona H1. Como se indica, esta región condiciona a los 20 pares de nucleótidos de DNA adicionales en el lugar en el que ésta sale del nucleosoma. Parece que este tipo de unión mediante H1 es importante para formar la fibra de 30 nm. La larga cola C-terminal de la histona H1 también es necesaria para la unión de alta afinidad de la H1 a la cromatina, pero se desconoce la función y la posición de la cola N-terminal. (A) Esquema, (B) estructura. (B, de D. Brown, T. Izard y T. Misteli, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:250-255, 2006. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

En las células eucariotas, el DNA se encuentra unido a una masa igual de histonas, formando un conjunto repetitivo de partículas de DNA y proteína denominadas nucleosomas. El nucleosoma está formado por un núcleo octamérico de proteínas histonas alrededor del cual se enrolla la doble hélice de DNA. Los nucleosomas están separados a intervalos de unos 200 pares de nucleótidos y se suelen empaquetar juntos (con la ayuda de moléculas de la histona H1) y adoptan disposiciones regulares que forman una fibra de cromatina de 30 nm. Pese al elevado grado de condensación que alcanza la cromatina, su estructura debe ser especialmente dinámica para permitir a la célula su acceso al DNA. Hay cierta grado de desenrollamiento y enrollamiento espontáneo del DNA en el propio nucleosoma; sin embargo, la estrategia general para producir cambios locales reversibles en la estructura de la cromatina radica en los complejos remodeladores de la cromatina dirigidos por ATP. Las células contienen una gran cantidad de estos complejos que son dirigidos a regiones específicas de la cromatina en el momento adecuado. Los complejos remodeladores colaboran con las chaperonas de las histonas permitiendo a los núcleos de los nucleosomas recolocarse, reconstituidos con diferentes histonas, o ser completamente eliminados dejando expuesto el DNA subyacente.

REGULACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA

Después de describir cómo se empaqueta el DNA en los nucleosomas dando lugar a una fibra de cromatina, ahora nos centraremos en los mecanismos que generan diferentes estructuras de cromatina en diferentes regiones del genoma celular. Sabemos que para controlar muchos genes en los organismos eucariotas se utilizan mecanismos de este tipo. Más importante es que ciertos tipos de estructura de la cromatina se pueden heredar, es decir, la estructura puede ser transmitida desde una célula a sus descendientes. Debido a que la memoria celular resultante se basa en la herencia de una estructura proteica en vez de en un cambio en la secuencia de DNA, esto es un tipo de **herencia epigenética**. El prefijo *epi* significa "sobre" en griego, lo cual resulta apropiado porque la epigenética representa un tipo de herencia que se superpone a la herencia genética basada en el DNA (**Figura 4–35**).

En el Capítulo 7 introduciremos las múltiples maneras diferentes que existen de regular la expresión de un gen, analizaremos la herencia epigenética en detalle y presentaremos varios mecanismos distintos que la pueden producir. Aquí sólo nos referimos a uno de ellos, basado en la estructura de la cromatina. Empezamos esta sección con una introducción a las estructuras de cromatina heredadas y luego describiremos su base: la modificación covalente de histonas en nucleosomas. Veremos que estas modificaciones actúan como lugares de reconocimiento para módulos proteicos que conducen complejos proteicos determinados a las regiones apropiadas de cromatina y producen efectos específicos en la expresión de genes o inducen otras funciones biológicas. A través de estos mecanismos, la estructura de la cromatina desempeña un papel central en el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de los organismos eucariotas, incluidos nosotros mismos.

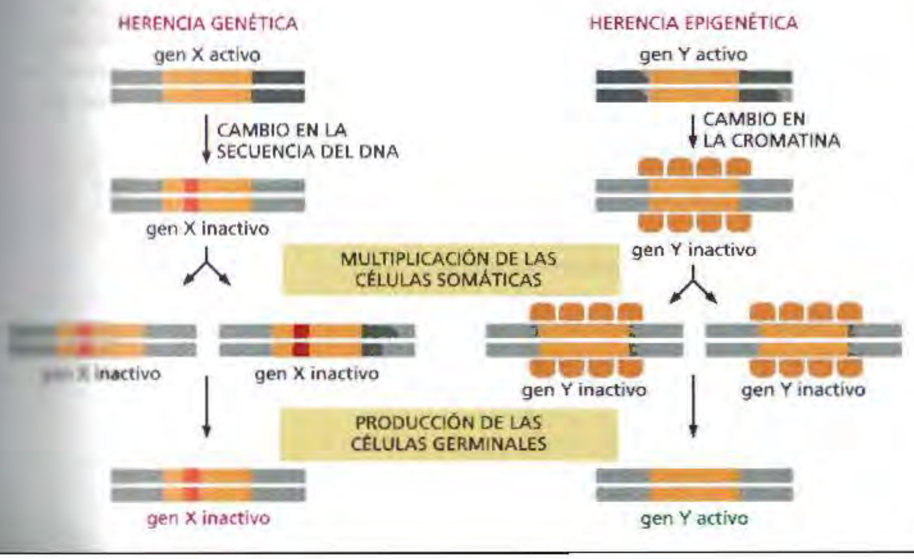


Figura 4–35 Comparación entre la herencia genética y una herencia epigenética basada en las estructuras de la cromatina. La herencia genética se basa en la herencia directa de la secuencia de nucleótidos del DNA durante su replicación. Los cambios en la secuencia del DNA se transmiten de forma eficiente no sólo de una célula somática a toda su descendencia sino también a través de las células germinales, de una generación a la siguiente. El campo de la genética, revisado en el Capítulo 8, se basa en la herencia de estos cambios entre las sucesivas generaciones. La herencia epigenética mostrada se basa en otras moléculas unidas al DNA y, por lo tanto, es menos permanente que un cambio en la secuencia del DNA; por lo general (aunque no siempre) la información epigenética es eliminada durante la formación de los óvulos y los espermatozoides.

En este capítulo sólo se analiza un mecanismo epigenético, basado en la herencia de las estructuras de la cromatina. En el Capítulo 7 se presentan otros mecanismos epigenéticos, centrados en el control de la expresión génica (véase la Figura 7-86).

Algunas incógnitas iniciales referentes a la estructura de la cromatina

Hace treinta años, la hipótesis admitida era que las histonas eran proteínas relativamente poco interesantes. Se sabía que los nucleosomas cubrían todo el DNA cromosómico y se creía que las histonas permitían que la enorme cantidad de DNA de muchas células eucariotas se empaquetara formando cromosomas compactos. Extrapolando lo que se conocía en las bacterias, muchos científicos postulaban que la regulación génica en los eucariotas simplemente se saltaba los nucleosomas, tratándolos como meros espectadores.

Pero aparecieron razones para cambiar este punto de vista. Así, por ejemplo, los bioquímicos determinaron que la cromatina de los mamíferos consistía en una masa aproximadamente igual de histonas y de proteínas no-histona. Esto implicaría que, de *promedio*, cada 200 pares de nucleótidos de DNA de nuestras células está asociado con más de 1000 aminoácidos de proteínas no-histona, esto es, una masa de proteína equivalente a la suma del total de histonas del octámero más la histona H1. En la actualidad sabemos que muchas de estas proteínas se unen a los nucleosomas y su abundancia puede sugerir que son algo más que meras proteínas de empaquetamiento.

Un segundo motivo para cambiar la visión respecto a la no implicación de las histonas en la regulación génica se basaba en la sorprendentemente baja tasa de cambios evolutivos en la secuencia de las cuatro histonas del núcleo nucleosómico. El hecho, mencionado con anterioridad, de que sólo existan dos aminoácidos diferentes entre la secuencia de la histona 4 en mamíferos y la del guisante, implica que al menos un cambio en cualquiera de los 102 aminoácidos en la H4 debe ser deletéreo para estos organismos ¿Qué tipo de proceso puede hacer la vida de un organismo tan sensible a la estructura exacta del núcleo del nucleosoma, que sólo hayan cambiado dos aminoácidos en más de 500 millones de años de variaciones al azar seguidas de selección natural?

Finalmente, pero no por último, la combinación entre genética y citología ha revelado que un tipo particular de cromatina silencia los genes que empaqueta independientemente de cuál sea su secuencia de nucleótidos –y lo hace de tal manera que es heredada directamente por ambas células hijas cuando una célula se divide. Volveremos más adelante sobre este tema.

La heterocromatina está muy organizada y habitualmente es resistente a la expresión génica

Los estudios realizados en la década de 1930 con microscopía óptica permitieron distinguir dos tipos de cromatina en el núcleo interfásico de los organismos eucariotas superiores: una forma altamente condensada denominada **heterocromatina** y el resto, que está menos condensada, denominada **eucromatina**. La heterocromatina representa un nivel especialmente compacto de cromatina (véase la Figura 4–9) y finalmente estamos empezando a entender aspectos importantes de sus propiedades moleculares. Aunque se encuentra en muchos lugares de los cromosomas, también se encuentra concentrada en zonas específicas, muy especialmente en los centrómeros y en los telómeros, de los que hemos hablado previamente (véase la Figura 4–21). En una célula normal de mamífero, más del 10% del genoma se encuentra empaquetado de este modo.

La mayor parte del DNA que está empaquetado en forma de heterocromatina tiene muy pocos genes; los genes eucromáticos que están empaquetados en la heterocromatina resultan inactivados por este tipo de empaquetamiento. Sin embargo, sabemos que el término *heterocromatina* incluye diferentes tipos de estructuras de la cromatina que comparten como característica común un grado de organización especialmente elevado. Así pues, la heterocromatina no deber ser considerada como DNA "muerto" encapsulado, sino más bien como diferentes tipos de cromatina condensada con diversas funciones que la hacen altamente resistente a la expresión génica para la gran mayoría de genes.

Si un gen que normalmente se expresa en la eucromatina es desplazado de forma experimental a una región de la heterocromatina, dejará de expresarse; se dice que el gen está *silenciado*. Estas diferencias en la expresión génica son ejemplos de los **efectos de posición**, según los cuales la expresión de un gen depende de su posición relativa a una región cercana de heterocromatina de un cromosoma. Estos efectos de posición primero se observaron en *Drosophila* pero actualmente se han observado en muchos organismos eucariotas incluidos levaduras, plantas y humanos.

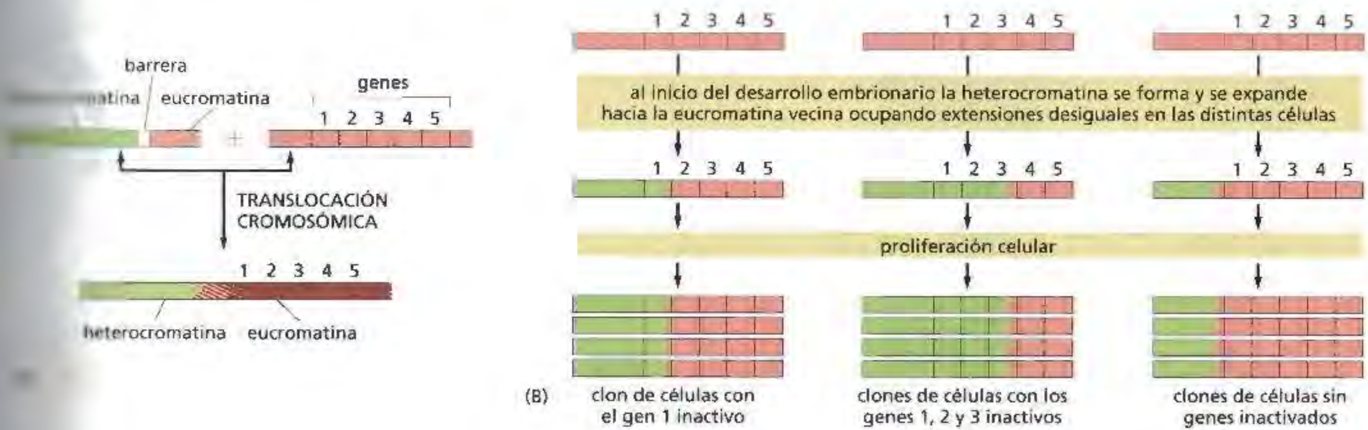


Figura 4–36 Origen del efecto de variegación de posición en *Drosophila*. (A) Habitualmente la expansión de la heterocromatina (*verde*) hacia regiones adyacentes eucromatina (*rojo*) es evitada por secuencias especiales de DNA *barrera*, de las que hablaremos en breve. Sin embargo, en las moscas que heredan ciertas reorganizaciones cromosómicas esta barrera no se mantiene durante mucho tiempo. (B) Durante las fases iniciales del desarrollo de estas moscas, la heterocromatina puede extenderse hacia el DNA cromosómico contiguo, procedente de diferentes distancias en diferentes células. Esta expansión se detiene rápidamente pero el patrón de heterocromatina establecido se hereda de tal forma que se originan grandes clones de progenies celulares en las cuales se hallan empaquetados en forma de heterocromatina los mismos genes colindantes, los cuales por lo tanto están inactivados (esta es la causa por la que aparece el "variegado" en algunas de estas moscas, véase Figura 4–37). Aunque la expansión es utilizada para explicar la formación de nueva heterocromatina en las proximidades de la heterocromatina preexistente, este término no es muy preciso. Existen evidencias de que durante la "expansión", la heterocromatina puede "saltar" por encima de algunas regiones de la cromatina y aumentar los genes que quedan dentro de los efectos represores.

[illegible] efectos de posición asociados a la heterocromatina muestran una característica de[illegible]la *efecto de posición de variegación*, que retrospectivamente ha aportado claves acer[illegible] función de la heterocromatina. En *Drosophila* la conexión directa de una región de [illegible]omatina con una región de eucromatina a causa de una rotura del cromosoma tien[illegible]ctivar los genes cercanos. La zona de inactivación se propaga a distancias diferentes [illegible]entes células primarias del embrión de la mosca, pero una vez se establece esta con[illegible]terocromática, tiende a ser estable hereditariamente en toda la progenie celular (**Fi[illegible]**). Este fenómeno remarcable se observó por primera vez a través del análisis [illegible]o de la pérdida moteada del pigmento rojo de los ojos de las moscas (**Figura 4–37**), [illegible]nparte muchas características con la gran extensión de heterocromatina que se inac[illegible]no de los dos cromosomas X en las hembras de los mamíferos (véase la p. 473).

[illegible] llevó a cabo un cribaje genético masivo tanto en *Drosophila* como en hongos, en bus[illegible] productos génicos que tanto activan como reprimen el despliegue de la heterocro[illegible] y su herencia estable,es decir, genes que una vez mutados, actúan de activadores o [illegible]sores del efecto de posición de variegación. De esta forma, se han identificado más [illegible]nes que tienen un papel crítico en estos procesos. En los últimos años, la caracteri[illegible]detallada de las proteínas producidas por estos genes ha revelado que muchas de [illegible] proteínas cromosómicas no histonas; el conjunto constituye un mecanismo desta[illegible] control génico en eucariotas que requiere la secuencia precisa de aminoácidos de [illegible]nas del nucleosoma. Además, este mecanismo de control génico ayuda a explicar la [illegible] lentitud en los cambios de las histonas a lo largo del tiempo.

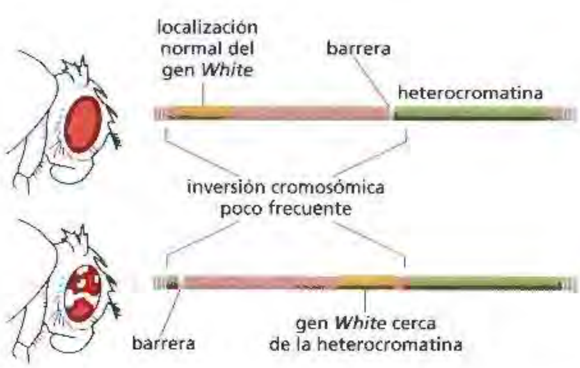
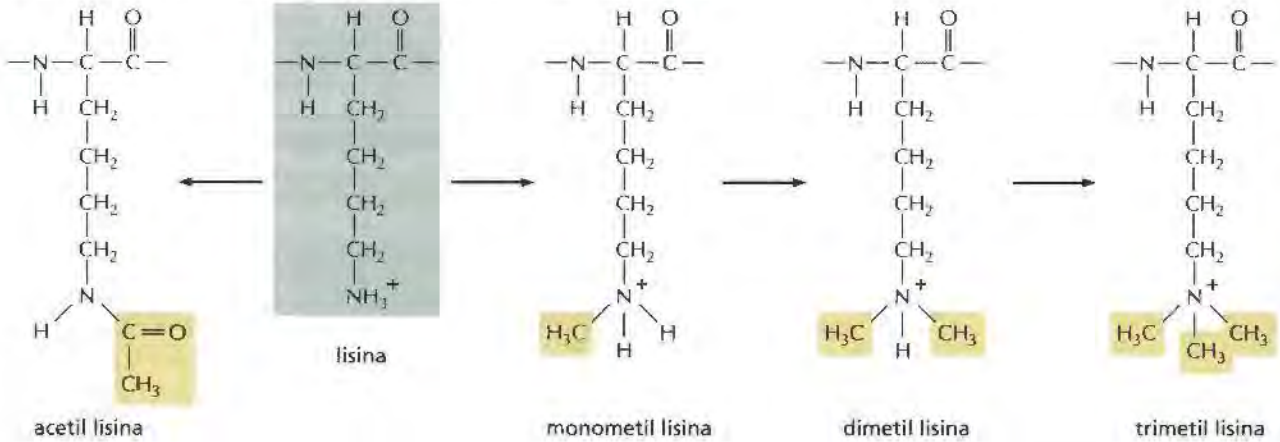


Figura 4–37 Descubrimiento del efecto de posición en la expresión génica. El gen *White* controla la producción de pigmento ocular en la mosca de la fruta *Drosophila* y se denomina así por la mutación que permitió su identificación. Las moscas salvajes con un gen *White* normal (*White*$^+$) tienen una producción normal de pigmento que colorea sus ojos de rojo, pero si el gen *White* muta o es inactivado, la moscas mutantes (*White*$^-$) no fabrican pigmento y tienen los ojos *blancos*. En moscas con un gen normal *White*$^+$ que se ha colocado en la proximidad de una región de la heterocromatina, los ojos son moteados con zonas *rojas* y zonas *blancas*. Las zonas *blancas* están formadas por células en las que el gen *White*$^+$ ha sido silenciado por efecto de la heterocromatina. En cambio, las zonas *rojas* son células que expresan el gen *White*$^+$, ya que la heterocromatina no se ha extendido hacia este gen al inicio del desarrollo, momento en el que se forma inicialmente la heterocromatina (véase Figura 4-36). La presencia de grandes zonas de células *rojas* y de células *blancas* indica que se hereda el estado transcripcional del gen, una vez se ha determinado el empaquetamiento de cromatina en un embrión temprano.

(A) LA ACETILACIÓN Y LA METILACIÓN DE LA LISINA SON REACCIONES QUE COMPITEN



(B) FOSFORILACIÓN DE LA SERINA

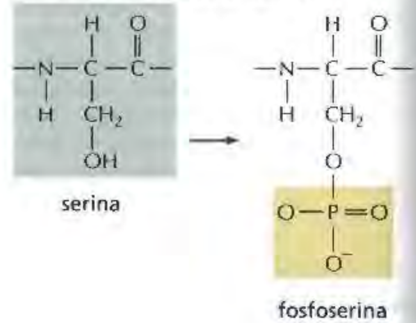


Figura 4–38 Algunos tipos relevantes de modificaciones covalentes de las cadenas laterales de aminoácidos encontrados en las histonas. (A) Se muestran tres niveles diferentes de metilación de la lisina; cada uno de ellos puede ser reconocido por una proteína de unión diferente y, por lo tanto, puede tener un significado diferente para la célula. La acetilación elimina la carga positiva de la lisina y, lo que todavía es más importante, una lisina acetilada no puede ser metilada, y *a la inversa*. (B) La fosforilación de una serina añade una carga negativa a la histona. No se muestran modificaciones como la mono- o dimetilación de la arginina, la fosforilación de la treonina, la adición de ADP-ribosa al ácido glutámico y la adición de un grupo ubiquitil, sumoil o biotina a la lisina.

Las histonas del nucleosoma están modificadas covalentemente en muchos lugares

Las colas N-terminales de las cuatro histonas del núcleo del nucleosoma están sometidas a una gran variedad de modificaciones covalentes, como la acetilación de lisinas, la mono-, di- y trimetilación de lisinas y la fosforilación de serinas (**Figura 4–38**). Una gran parte de estas modificaciones en las cadenas laterales se produce en las ocho colas N-terminales de las histonas, relativamente desestructuradas, que sobresalen del nucleosoma (**Figura 4–39**). Sin embargo, también existen modificaciones específicas en cadenas laterales en el núcleo globular del nucleosoma (**Figura 4–40**).

Todas estas modificaciones son reversibles. La modificación de la cadena lateral de un aminoácido particular del nucleosoma está generada por una enzima específica, de forma que la mayoría de estas enzimas actúan en uno o en unos cuantos lugares. Una enzima diferente está encargada de eliminar cada una de las modificaciones en las cadenas laterales. Así, por ejemplo, los grupos acetil son añadidos a lisinas específicas por diferentes acetil transferasas de las histonas (HAT: ***histone acetyl transferases***) y son eliminados por complejos histona deacetilasas (HDAC: ***histone deacetylases***). Del mismo modo, los grupos metilo son añadidos a las cadenas laterales de lisina por diferentes metil transferasas de las histonas y eliminados por desmetilasas de las histonas. En momentos concretos de la vida de cada célula, cada una de estas enzimas es reclutada hacia zonas específicas de la cromatina. Para la mayoría de estas enzimas, el reclutamiento depende inicialmente de *proteínas reguladoras de genes* que se unen a secuencias específicas de DNA a lo largo de los cromosomas, las cuales se producen en diferentes momentos durante la vida de un organismo, como se describe en el Capítulo 7. Pero, al menos en algunos casos, las modificaciones covalentes de los nucleosomas pueden persistir durante mucho tiempo después de que las proteínas reguladoras de genes que inicialmente las indujeron hayan desaparecido, constituyendo de este modo un recuerdo del historial evolutivo de la célula. En diferentes grupos de nucleosomas se encuentran patrones muy diferentes de modificaciones covalentes, en función de su posición exacta en el cromosoma y del estado de la célula.

Las modificaciones de las histonas están controladas cuidadosamente y tienen consecuencias importantes. La acetilación de las lisinas en las colas N-terminales tiende a desestabilizar la estructura de la cromatina, en parte debido a que al añadir un grupo acetil a la lisina

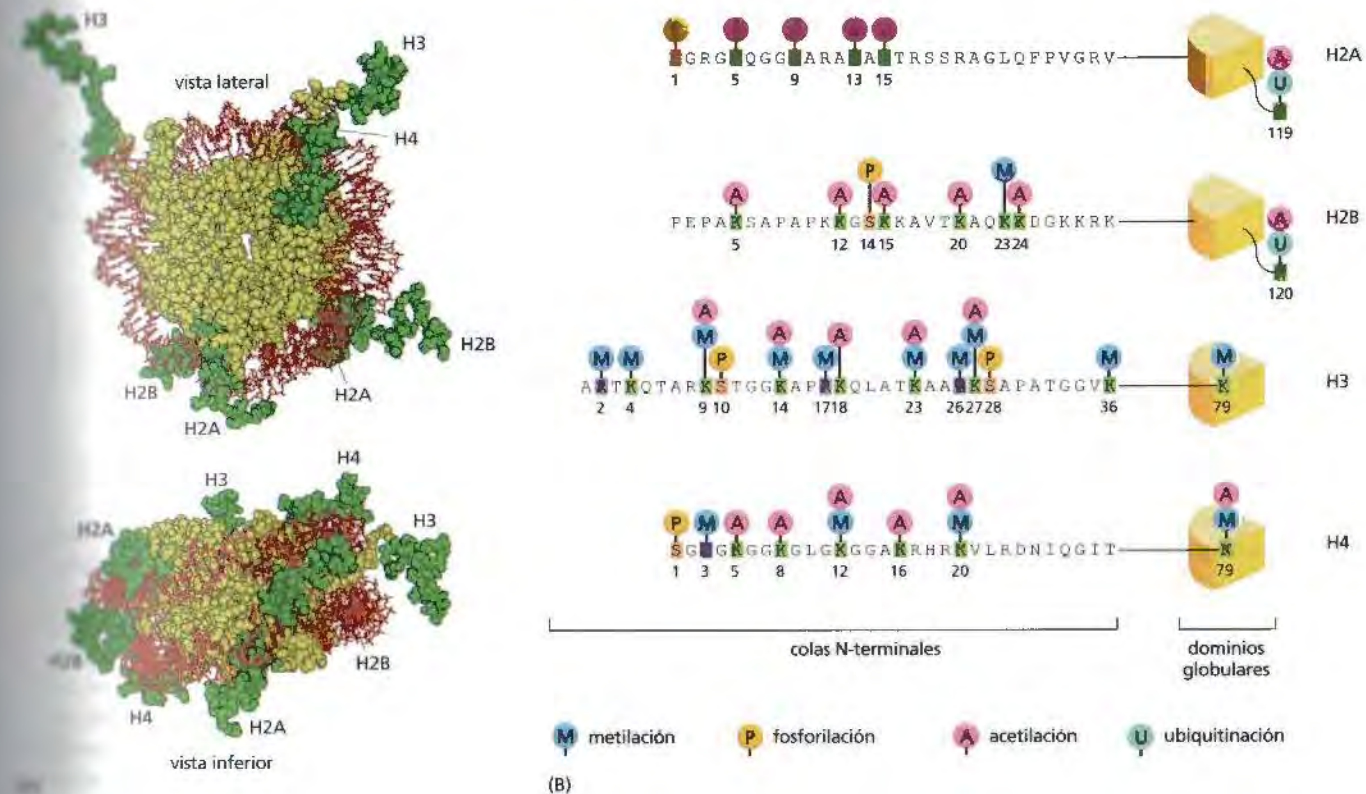


Figura 4–39 Modificaciones covalentes de las colas de las histonas del núcleo. (A) Estructura del nucleosoma resaltando la localización de los 30 primeros aminoácidos en cada una de las ocho colas N-terminales de sus histonas (*verde*). (B) Se indican las modificaciones mejor conocidas de las 4 histonas del núcleo. Aunque sólo se utiliza un símbolo para la metilación (*M*), cada lisina (*K*) o arginina (*R*) puede metilarse de diferentes modos. Obsérvese que algunas posiciones (p. ej. la lisina 9 de H3) pueden modificarse por metilación o acetilación, pero no por ambas a la vez. En la mayoría de las modificaciones mostradas se añaden moléculas relativamente pequeñas a las colas de las histonas, con la excepción de la ubiquitina que es una proteína de 76 aminoácidos utilizada en otros procesos celulares (véase Figura 6-92). (Adaptado de H. Santos-Rosa y C. Caldas, *Eur. J. Cancer* 41:2381-2402, 2005. Con la autorización de Elsevier.)

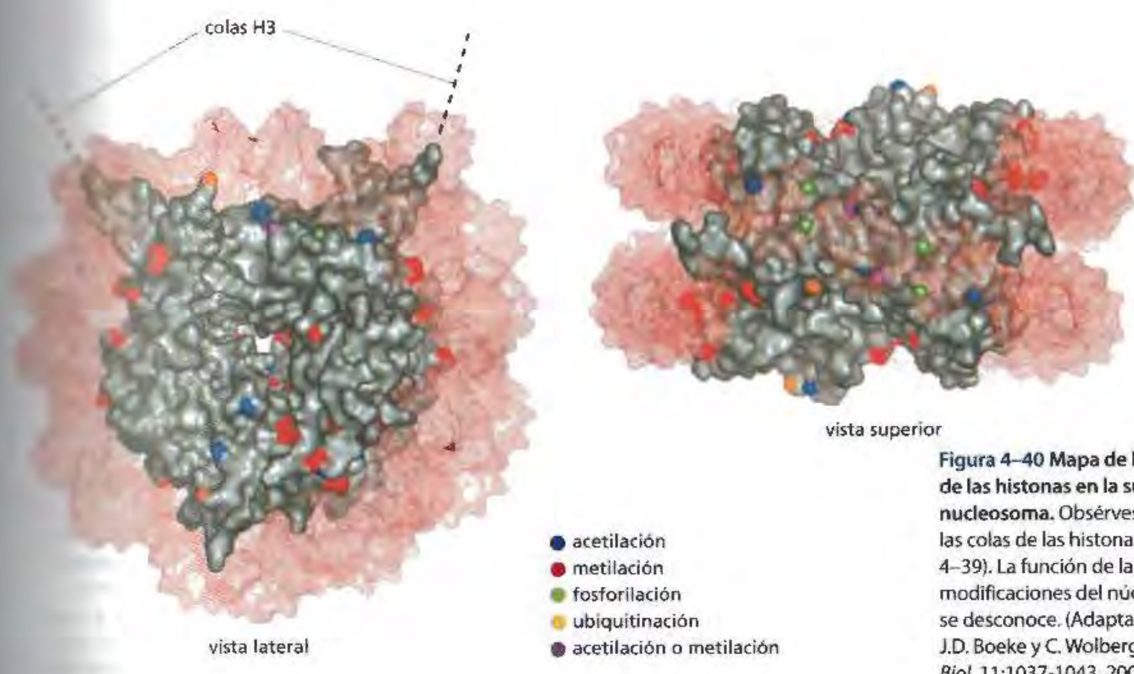


Figura 4–40 Mapa de las modificaciones de las histonas en la superficie del núcleo del nucleosoma. Obsérvese que se han omitido las colas de las histonas (compárese con la Figura 4–39). La función de la mayoría de estas modificaciones del núcleo nucleosómico todavía se desconoce. (Adaptado de M.S. Cosgrove, J.D. Boeke y C. Wolberger, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:1037-1043, 2004. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

se elimina su carga positiva, reduciendo la afinidad de las colas por los nucleosomas adyacentes (véase la Figura 4–33). Sin embargo, el efecto más importante de las histonas modificadas, es su capacidad para atraer específicamente determinadas proteínas hacia la región de la cromatina que ha sido modificada convenientemente. Estas nuevas proteínas determinan cómo y cuándo se van a expresar los genes, así como otras funciones biológicas. En este sentido, la estructura precisa de un dominio de cromatina determina la expresión de los genes que tiene empaquetados y, por tanto, la estructura y la función de la célula eucariota.

La cromatina adquiere variaciones adicionales a través de la inserción de un pequeño grupo de variantes de histonas en lugares específicos

A pesar de que las secuencias de aminoácidos de las histonas del núcleo han sido altamente conservadas a lo largo de cientos de millones de años, los eucariotas también tienen unas cuantas variantes de histonas que se ensamblan en los nucleosomas. Estas histonas se encuentran en cantidades mucho menores que las histonas mayoritarias y se han conservado peor a lo largo de la evolución. Existen variantes de cada una de las histonas del nucleosoma, excepto para la histona H4; algunos ejemplos se muestran en la **Figura 4–41**.

Las histonas mayoritarias se sintetizan principalmente durante la fase S del ciclo celular (véase la Figura 17–4) y se ensamblan formando los nucleosomas en las hélices de DNA hijas, justo detrás de la horquilla de replicación (véase la Figura 5–38). En cambio, la mayoría de variantes de histonas se sintetizan durante toda la interfase. Con frecuencia están insertadas en la cromatina ya formada, lo que requiere un proceso de intercambio de histonas catalizado por los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP, que hemos descrito previamente. Estos complejos de remodelación tienen subunidades que los unen a sitios específicos de la cromatina y a chaperonas de histonas que transportan una variante concreta. Como resultado de ello, cada variante de histona está insertada de forma altamente selectiva en la cromatina (véase la Figura 4–30).

Las modificaciones covalentes y las variantes de histonas actúan conjuntamente produciendo un "código de histonas" que ayuda a determinar la función biológica

El número de posibles marcajes distintos en un nucleosoma es enorme. Incluso reconociendo que algunas modificaciones son mutuamente excluyentes (p. ej., una lisina no puede estar acetilada y metilada al mismo tiempo), y que otras modificaciones son generadas simultáneamente como un conjunto, está claro que pueden existir miles de modificaciones.

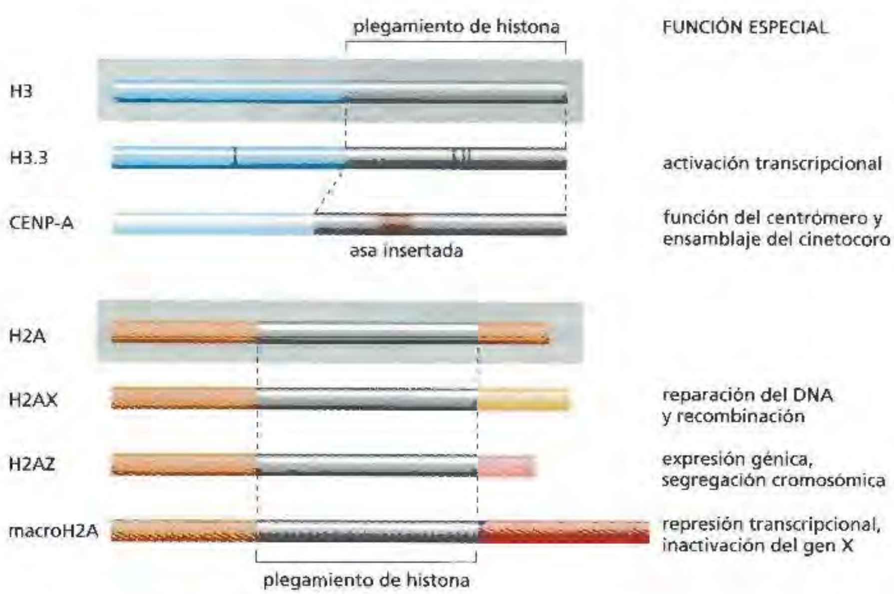
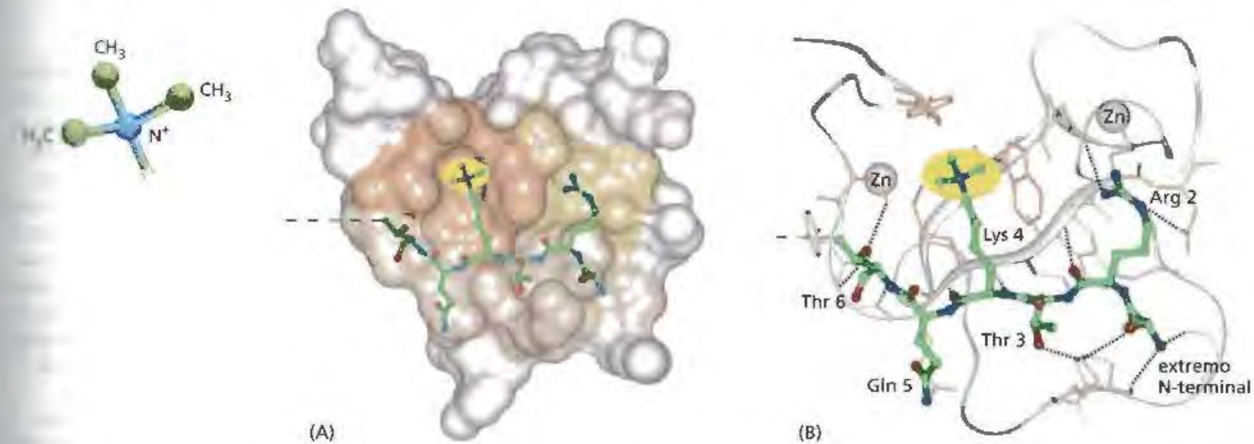


Figura 4–41 Estructura de algunas variantes de histona comparadas con la histona mayoritaria que sustituyen. Estas histonas se insertan en los nucleosomas en lugares específicos de los cromosomas mediante enzimas remodeladoras de cromatina dependientes de ATP que actúan de forma coordinada con chaperonas de histonas (véase la Figura 4–30). Más adelante, en este mismo capítulo, tratamos de CENP-A, una variante de la histona H3 (véanse las Figuras 4-48 a 4-51); otras variantes se presentan en el Capítulo 7. Las secuencias coloreadas de un modo diferente en cada variante son diferentes a las correspondientes en la histona mayoritaria. (Adaptado de K. Sarma y D. Reinberg, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6:139-149, 2005. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)



Además, existe una diversidad adicional debida a los nucleosomas que contienen variantes de histonas.

Muchas de las modificaciones parecen tener un significado particular para la célula porque determinan cómo y cuándo es accesible el DNA empaquetado en los nucleosomas, lo que lleva a la hipótesis del **código de histonas**. Por ejemplo, un tipo de marcaje señaliza que un trozo de cromatina se ha replicado recientemente, otro que el DNA de la cromatina ha sido dañado y necesita repararse, mientras que otros muchos señalizan cuándo y cómo debe tener lugar la expresión génica. Pequeños módulos de proteína se unen a marcajes específicos, como por ejemplo a la trimetilación de la lisina 4 en la histona H3 (**Figura 4–42**). Se

Figura 4–42 Cómo es leído cada marcaje de un nucleosoma. Se muestra la estructura de un módulo proteico que reconoce específicamente la histona H3 trimetilada en la lisina 4. (A) Modelo espacial de un dominio ING PHD unido a una cola de histona (*verde*, con el grupo trimetil resaltado en *amarillo*). (B) Modelo en cinta que muestra cómo son reconocidos los seis aminoácidos N-terminales de la cola de H3. Las *líneas punteadas* representan enlaces de hidrógeno. Este es uno de los muchos dominios PHD que reconocen lisinas metiladas en las histonas; diferentes dominios se unen fuertemente a lisinas situadas en diferentes lugares, y pueden discriminar entre lisinas mono-, di- o trimetiladas. De un modo similar, otros pequeños módulos proteicos reconocen cadenas laterales específicas de histonas que han sido marcadas con grupos acetilo, fosfato etc. (Adaptado de P.V. Pena et al., *Nature* 442:100-103, 2006. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

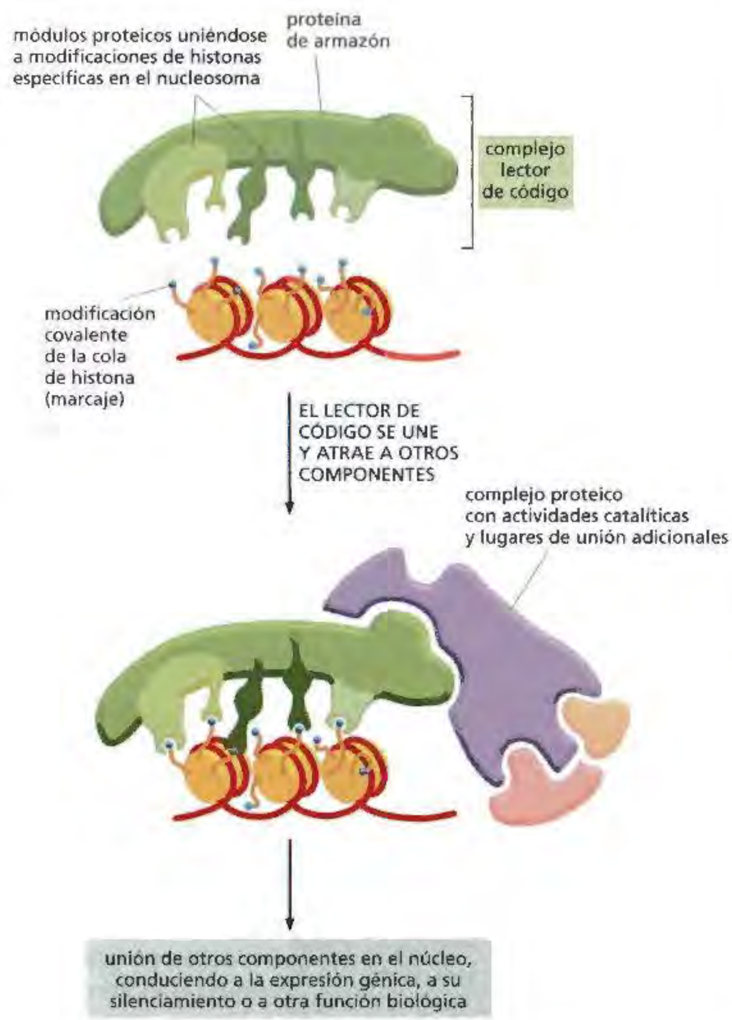


Figura 4–43 Esquema mostrando cómo puede ser leído el código de histonas por un complejo lector. Se ilustra de forma esquemática un gran complejo proteico (*verde*) que contiene una serie de módulos, cada uno de los cuales reconoce un marcaje de histona específico. Este complejo lector de código sólo se unirá a una región de cromatina que contenga algunas de las diferentes marcas de histonas que puede reconocer. Por lo tanto, sólo una combinación específica de marcajes provocará que el complejo se una a la cromatina y que atraiga complejos proteicos adicionales (*púrpura*) que catalicen una función biológica.

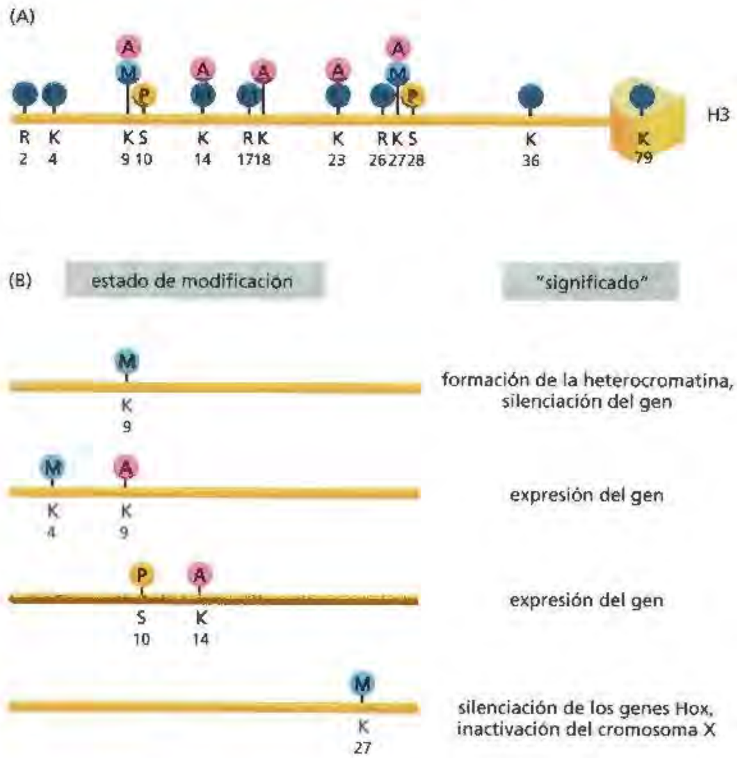


Figura 4–44 Algunos significados específicos del código de histonas. (A) De nuevo se muestran, repetidas de la Figura 4–39, las modificaciones de la cola N-terminal de la histona H3. (B) La cola de H3 puede estar marcada por diferentes combinaciones de modificaciones que confieren un significado específico a la región de cromatina donde se producen. Sólo se conoce el significado de alguna de estas modificaciones, incluidos los cuatro ejemplos mostrados. La trimetilación de la lisina 9, por centrarnos en un ejemplo, atrae a la proteína HP1 específica de heterocromatina, la cual induce una onda expansiva de trimetilaciones en lisinas 9 más lejanas, seguida de la unión de más proteínas HP1, tal y como se muestra en el esquema general que se ilustrará en la Figura 4–46. No se muestra el hecho de que, como acabamos de indicar (Figura 4–43), la lectura del código de histonas generalmente implica la unión tras el reconocimiento de marcajes en otros sitios del nucleosoma junto con el ya mencionado en la cola de H3. Además, se requieren niveles específicos de metilación (mono-, di- o trimetilación) como en la Figura 4–42.

cree que estos módulos actúan conjuntamente con otros módulos como parte de un *complejo de lectura de código*, de forma que permite que una combinación concreta de marcajes en la cromatina atraiga complejos de proteínas adicionales que ejecuten la función biológica apropiada en el momento correcto (**Figura 4–43**).

Los marcajes en los nucleosomas debidos a las adiciones covalentes en las histonas son dinámicos, siendo eliminados y añadidos constantemente a una velocidad que depende de su localización cromosómica. Dado que las colas de las histonas se extienden hacia fuera desde el núcleo del nucleosoma y parece que son accesibles incluso cuando la cromatina se condensa, se cree que constituyen una estructura especialmente indicada para generar marcajes de modo que pueda ser alterado fácilmente en función de los cambios necesarios para la célula. A pesar de que todavía queda mucho por aprender sobre el significado de las muchas combinaciones de códigos de las histonas, en la **Figura 4–44** se enumeran algunos ejemplos bien estudiados de la información codificada en la cola de la histona H3.

Un complejo de proteínas lectoras y escritoras de código pueden distribuir modificaciones específicas en largas distancias de cromatina a lo largo de un cromosoma

El fenómeno de los efectos de variegación descritos anteriormente, requiere que al menos algunas formas modificadas de cromatina tengan la capacidad de extenderse a distancias sustanciales a lo largo de la molécula de DNA cromosómico (véase la Figura 4–36). ¿Cómo es posible esto?

Las enzimas que modifican o eliminan las modificaciones de las histonas en los nucleosomas forman parte de complejos de muchas subunidades. Inicialmente, pueden ser transportadas a una región particular de la cromatina por una de las proteínas de unión específicas de secuencia de DNA (proteínas reguladoras de genes) mostradas en los Capítulos 6 y 7 (véase la Figura 7–87 para un ejemplo específico). Pero cuando ya han realizado la modificación, la enzima "escribe" su marcaje en uno o en varios nucleosomas vecinos, lo que puede generar una reacción en cadena. En este caso, la enzima "escritora de códigos" trabaja conjuntamente con una proteína lectora de códigos localizada en el mismo complejo proteico. Esta segunda proteína contiene un módulo lector de códigos que reconoce los marcajes y se une fuertemente al nucleosoma recién modificado (véase Figura 4–42) y posiciona su enzima escritora adjunta cerca del nucleosoma adyacente. A través de muchos ciclos de lectura-escritura, la proteína lectora puede desplazar a la enzima escritora a lo largo

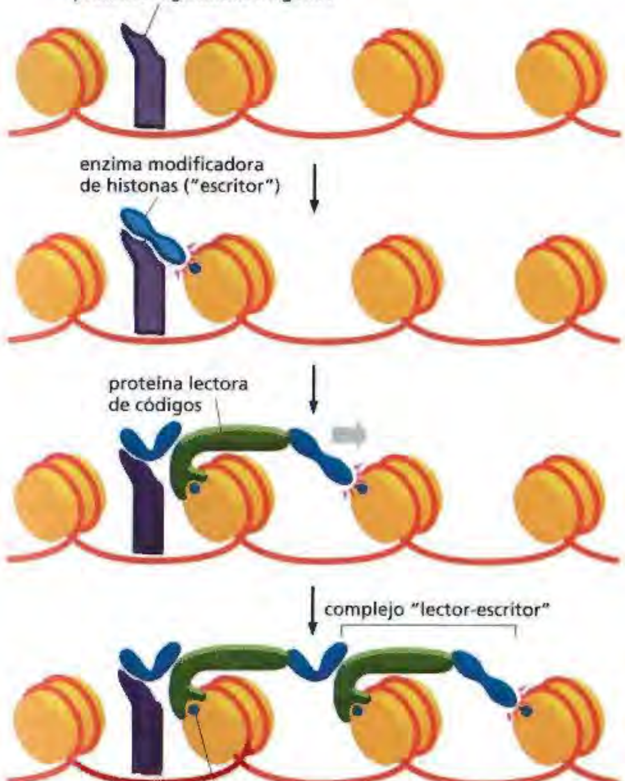


Figura 4–45 Cómo el reclutamiento de un complejo lector-escritor de código puede difundir cambios en la cromatina a lo largo del cromosoma. El escritor de códigos es una enzima que genera una modificación específica en una o varias de las cuatro histonas del nucleosoma. Después de su reclutamiento a un lugar específico del cromosoma mediante una proteína reguladora de genes, el escritor colabora con la proteína lectora de códigos difundiendo el marcaje, de nucleosoma en nucleosoma, mediante el indicado complejo lector-escritor. Para que este mecanismo funcione el lector ha de reconocer las modificaciones de histonas que produce el escritor (véase también la Figura 4–43).

del DNA –expandiendo, como si se tratase de un mano a mano, el marcaje a lo largo del cromosoma (**Figura 4–45**).

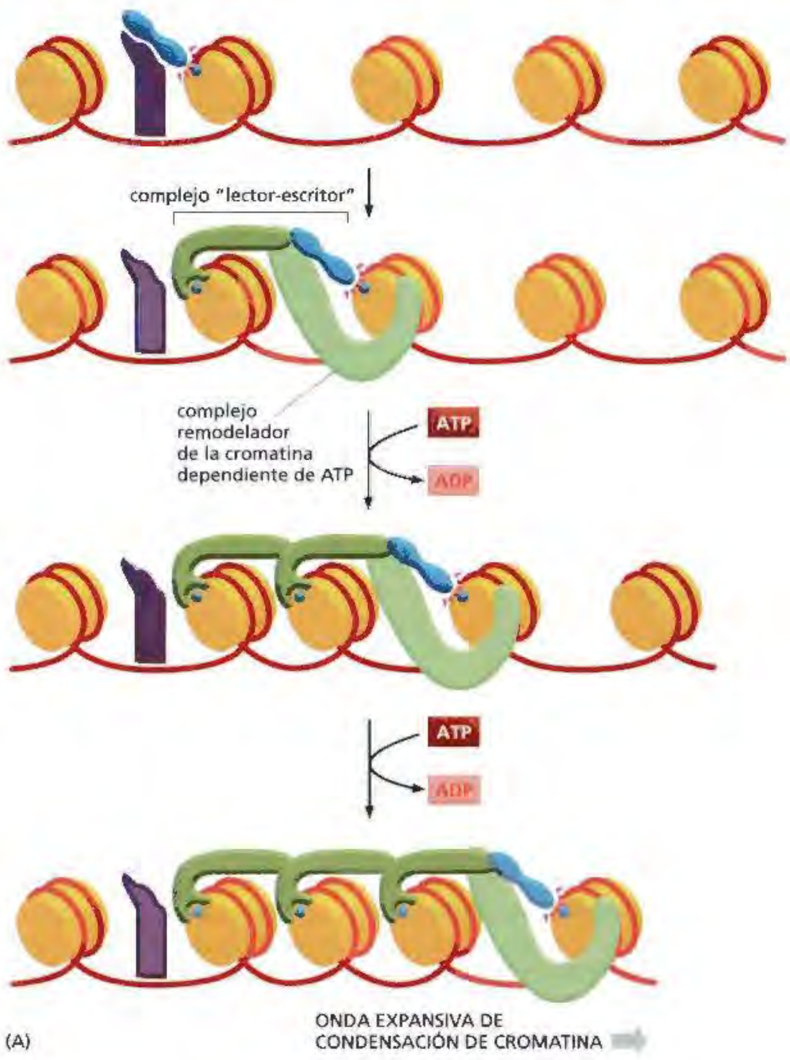
En realidad, el proceso es más complicado que este esquema. Tanto el lector como el escritor son parte de un complejo proteico que probablemente contiene muchos lectores y escritores, y para diseminarse requiere que sobre el nucleosoma haya muchas marcas. Además, muchos de estos complejos lectores-escritores también tienen una proteína remodeladora de cromatina dependiente de ATP, que trabaja conjuntamente con los lectores y escritores tanto para condensar como para descondensar largas cadenas de cromatina a medida que el lector se desplaza progresivamente a lo largo del DNA empaquetado en los nucleosomas (**Figura 4–46**).

La complejidad de este proceso se puede intuir a partir de los resultados de cribaje genético de genes mutantes, que en análisis de efecto de variegación en *Drosophila* pueden tanto potenciar como suprimir la diseminación y la estabilidad de la heterocromatina (véase la Figura 4–37). Como apuntábamos, se conocen más de 50 de estos genes y parece que muchos de ellos funcionan como subunidades en uno o más complejos proteicos de lectura-escritura-remodelación.

Secuencias de DNA barrera bloquean la expansión de los complejos lector-escritor y separan dominios de cromatina vecinos

El mecanismo para extender las estructuras de la cromatina descrito anteriormente presenta un problema potencial. Dado que cada cromosoma consiste en una molécula continua muy larga de DNA, ¿qué es lo que evita una cacofonía confusa de comunicaciones cruzadas entre dominios adyacentes de cromatina con diferente estructura y función? Los primeros estudios de efecto de posición variegada sugirieron una respuesta a esta pregunta: la existencia de secuencias específicas de DNA que separan los dominios de cromatina (véase la Figura 4–37). Actualmente se han identificado varias secuencias *barrera* de este tipo y se han caracterizado mediante técnicas de ingeniería genética que permiten añadir o eliminar de los cromosomas secuencias específicas de regiones de DNA.

Por ejemplo, en los eritrocitos, el dominio activo de cromatina que contiene el locus de la β-globina normalmente está separado por una secuencia llamada HS4 de una región ad-



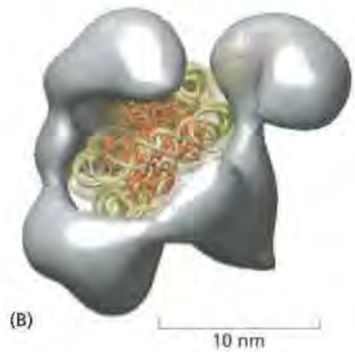


Figura 4–46 **Cómo difunde los cambios en la cromatina a lo largo del cromosoma un complejo formado por las proteínas lectora, escritora y remodeladora de cromatina dependiente de ATP.** (A) Onda expansiva de condensación de cromatina. Este mecanismo es idéntico al de la Figura 4–45, exceptuando que el complejo lector-escritor colabora con una proteína remodeladora dependiente de ATP (véase la Figura 4–29) recolocando los nucleosomas y empaquetándolos en una estructura altamente condensada. Este es un esquema muy simplificado del mecanismo conocido capaz de difundir a grandes distancias en los cromosomas la forma mayoritaria de heterocromatina (véase la Figura 4–36). La proteína específica de heterocromatina HP1 tiene un papel central en este proceso. HP1 se une a la lisina 9 trimetilada de la histona H3 y permanece asociada a la cromatina condensada como una de las proteínas lectoras de un complejo lector-escritor-remodelador más complejo que el mostrado y que aún no se comprende del todo. (B) Estructura actual de un complejo lector-remodelador, mostrando cómo se cree que interacciona con un nucleosoma. En *gris* el complejo RSC de la levadura, que contiene 15 subunidades –incluida una proteína remodeladora dependiente de ATP y como mínimo 4 subunidades con dominios lectores de códigos. (B, de A.E. Leschziner et al., *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 104:4913-4918, 2007. Con la autorización de National Academy of Sciences.)

yacente de cromatina condensada silenciada (véase la Figura 7–61). Si esta secuencia HS4 se elimina, la estructura del locus de la β-globina resulta modificada formándose cromatina condensada. Esta cromatina silencia el gen que cubre y se disemina hasta una cierta distancia a diferentes células, causando un patrón de efecto de posición variegada similar al observado en *Drosophila*. Como se describe en el Capítulo 7, esta invasión tiene consecuencias desastrosas: la expresión de los genes de la globina es pobre y los individuos portadores de este tipo de deleción padecen una anemia severa.

Experimentalmente, la secuencia HS4 se añade a menudo a ambos extremos de un gen que se ha insertado en el genoma de un mamífero para protegerlo de ser silenciado por la expansión de la heterocromatina. El análisis de esta secuencia barrera muestra que tiene un conjunto de lugares de unión para enzimas acetiladoras de histonas. Dado que la acetilación de la cadena lateral de una lisina es incompatible con la metilación de la misma cadena lateral, las acetilasas y las metilasas de las histonas son candidatas a formar barreras de DNA que bloqueen la expansión de diferentes formas de cromatina (**Figura 4–47**). Sin embargo, se sabe que otros tipos de modificaciones de la cromatina pueden proteger los genes de ser silenciados.

La cromatina de los centrómeros revela de qué forma las variantes de las histonas pueden generar estructuras especiales

Parece que la presencia de nucleosomas que contienen variantes de histonas produce marcajes en la cromatina que raramente son duraderos. Considérese, por ejemplo, la formación y herencia de la cromatina que forma los centrómeros, la región requerida de DNA de cada cromosoma para la segregación ordenada de los cromosomas en las células hijas cada vez

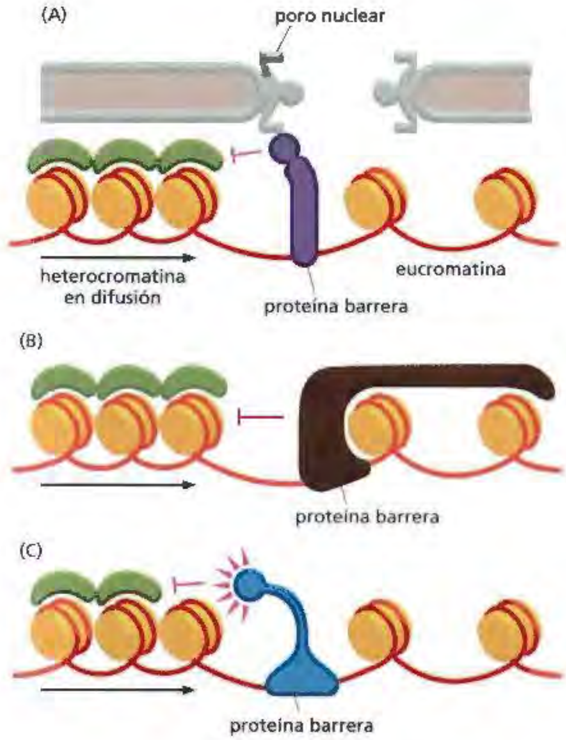


Figura 4–47 Algunos mecanismos de acción de barrera. Estos mecanismos proceden de diferentes análisis de la acción de barrera; una combinación de varios de ellos puede funcionar en cualquier lugar. (A) El anclaje de una región de heterocromatina a una estructura grande fija, como el complejo del poro nuclear mostrado, puede formar una barrera que detiene la expansión de la heterocromatina. (B) La unión fuerte de proteínas barrera a un grupo de nucleosomas puede competir con la expansión de la heterocromatina. (C) Las barreras pueden borrar en las histonas los marcajes necesarios para la difusión de la heterocromatina, mediante el reclutamiento de enzimas modificadoras de histonas altamente activas. Por ejemplo, una potente acetilación de la lisina 9 de la histona H3 competirá con su metilación, previniendo de este modo la unión de la proteína HP1 necesaria para formar algunos tipos de heterocromatina (véase la Figura 4–46). (Basado en A.G. West y P. Fraser, *Hum. Mol. Genet.* 14:R101-R111, 2005. Con la autorización de Oxford University Press.)

que una célula se divide (véase la Figura 4–21). En muchos organismos complejos, incluidos los humanos, cada centrómero está embebido en un *tramo central especial de heterocromatina* que persiste durante toda la interfase, a pesar de que el desplazamiento del DNA mediado por el centrómero sólo se produce durante la mitosis. Esta cromatina contiene una variante de la histona H3 específica del centrómero, conocida como CENP-A (véase la Figura 4-41), acompañada de proteínas adicionales que empaquetan los nucleosomas en una organización especialmente densa que forma el cinetocoro, la estructura especial necesaria para el anclaje del huso mitótico.

En la levadura *S. cerevisiae*, una secuencia específica de DNA de aproximadamente 125 pares de nucleótidos es suficiente para actuar como centrómero. A pesar de su pequeño tamaño, sobre esta secuencia de DNA se ensamblan más de una docena de proteínas diferentes, como la variante de la histona H3 CENP-A que, junto con las otras tres histonas del núcleo nucleosómico, forman un nucleosoma específico del centrómero. Las demás proteínas adicionales del centrómero de la levadura lo unen a un solo microtúbulo del huso mitótico (**Figura 4–48**).

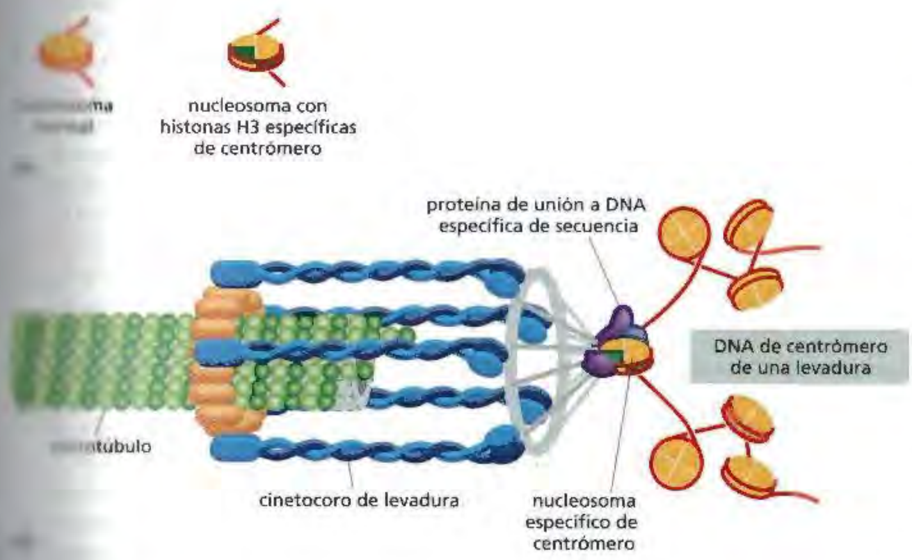


Figura 4–48 Modelo de estructura de un centrómero sencillo. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, una secuencia especial de DNA centromérico ensambla un solo nucleosoma que contiene dos copias de una variante de la histona H3 (denominada CENP-A en la mayoría de organismos) que sustituye a la normal. Las secuencias peptídicas únicas de esta variante de histona (véase la Figura 4–41) facilitan el ensamblaje de otras proteínas, algunas de las cuales forman el centrómero. Este cinetocoro es especial ya que se une a un solo microtúbulo; los humanos tienen centrómeros mucho mayores y forman cinetocoros que capturan 20 o más microtúbulos (véase la Figura 4–50). El cinetocoro se describe en detalle en el Capítulo 17. (Adaptado de A. Joglekar et al., *Nat. Cell Biol.* 8:381-383, 2006. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

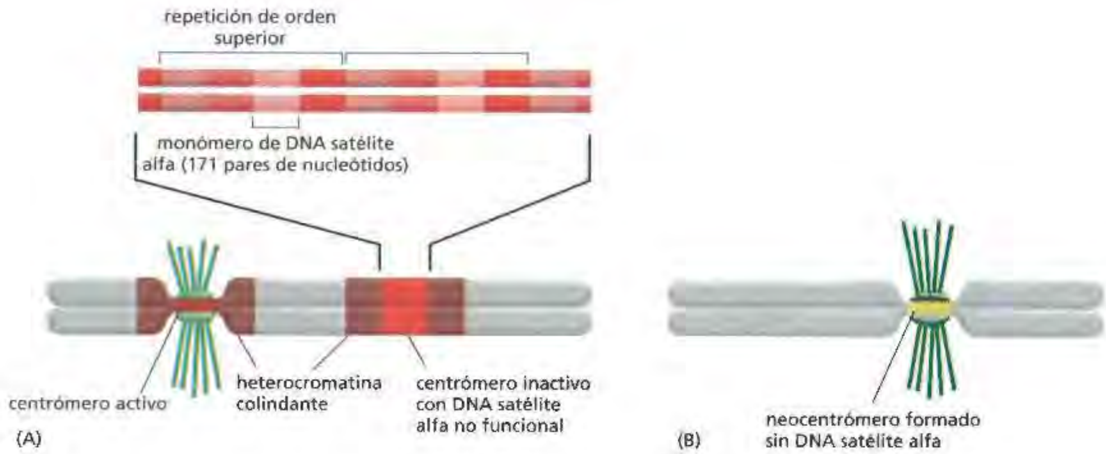


Figura 4–49 Plasticidad en la formación del centrómero humano. (A) En el centrómero humano (*rojo*) se encuentran repetidas miles de veces las secuencias del DNA satélite alfa ricas en A-T, rodeadas de heterocromatina periférica (*marrón*). Sin embargo, a causa de las roturas y de su posterior unión experimentada por un antiguo cromosoma, algunos cromosomas humanos contienen dos bloques de DNA satélite alfa, los cuales probablemente actuaban como centrómeros en los cromosomas originales. Habitualmente estos cromosomas dicéntricos no se propagan de forma estable, ya que no se unen correctamente al huso y se rompen en trozos durante la mitosis. En los cromosomas que perduran, uno de los centrómeros se inactiva de algún modo aunque contenga toda la secuencia necesaria del DNA. Este hecho permite que el cromosoma sea propagado de forma estable. (B) En una pequeña proporción (1/2000) de los nacimientos humanos, se observan cromosomas extra en las células de los descendientes. Algunos de estos cromosomas, originados por la rotura de otros cromosomas, carecen de todo el DNA satélite alfa, a pesar de lo cual forman nuevos centrómeros (neocentrómeros) a partir de DNA que originalmente era eucromatina.

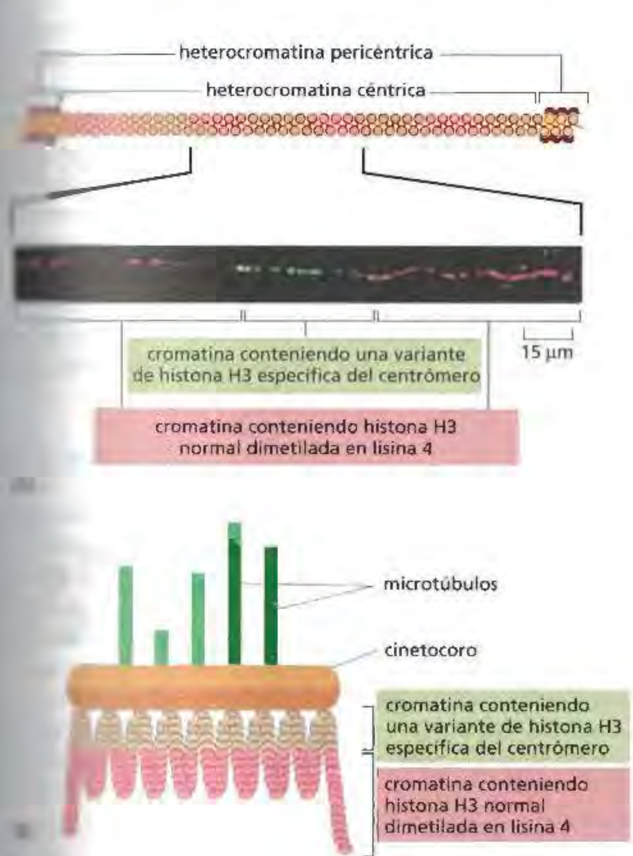
En los organismos más complejos, los centrómeros son considerablemente mayores que los de levadura. Por ejemplo, los centrómeros de las moscas y los de los humanos ocupan cientos de miles de pares de nucleótidos y no parecen contener ninguna secuencia específica de centrómero. Los centrómeros consisten fundamentalmente en secuencias cortas de DNA repetidas, que en los humanos se conocen como *satélites alfa de DNA*. Sin embargo, estas mismas secuencias repetidas también se encuentran en otras posiciones (no centroméricas) de los cromosomas, lo cual indica que por sí mismas no son suficiente para dirigir la formación del centrómero. Lo que aún es más sorprendente: en algunos casos poco comunes se ha observado la formación espontánea de nuevos centrómeros humanos (llamados neocentrómeros) en fragmentos de cromosomas. Algunas de estas posiciones nuevas eran originariamente eucromatina y todas ellas carecían de DNA satélite alfa (**Figura 4–49**).

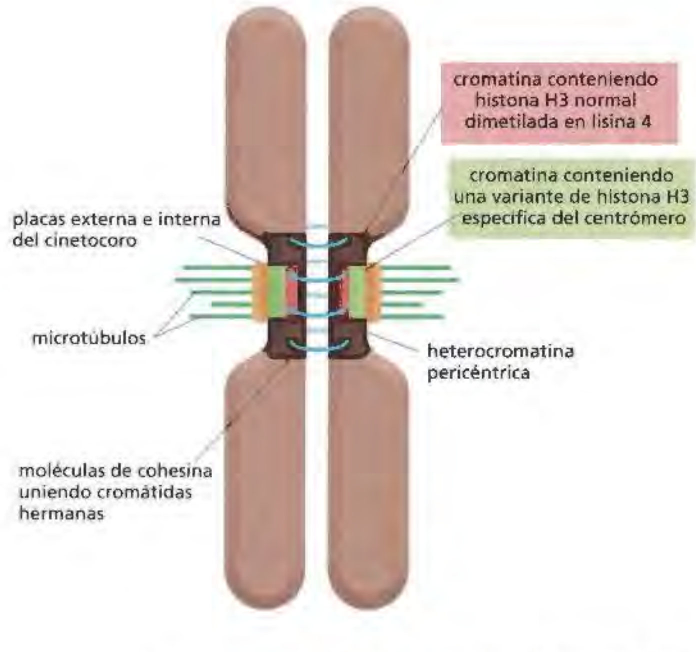
Así pues, parece que los centrómeros de los organismos complejos no están definidos por una secuencia específica de DNA sino por un ensamblaje de proteínas. Cuando se examina el tramo de cromosoma de los centrómeros mediante anticuerpos que marcan nucleosomas modificados específicamente, se observa una sorprendente alternancia de dos formas modificadas de cromatina (**Figura 4–50**). Parece que esta organización permite a la heterocromatina céntrica plegarse de tal modo que los nucleosomas que contienen la CENP-A se coloquen en el lado exterior del cromosoma mitótico, donde unirán el conjunto de proteínas que forman la placa de los cinetocoros. A su vez, estas placas capturan un grupo de microtúbulos del huso mitótico partiendo los cromosomas de forma precisa, como se describió en el Capítulo 17.

Las estructuras de la cromatina se pueden heredar directamente

Para explicar el conjunto de las observaciones mencionadas, se ha propuesto que para que se forme un centrómero *de novo* se requiere un suceso inicial de siembra, que implique de algún modo la formación de una estructura especializada de DNA-proteína que contenga nucleosomas formados con la variante CENP-A de la histona H3. En humanos, este suceso de siembra se produce más fácilmente en el DNA satélite alfa que en otras secuencias de DNA. Los tetrámeros H3-H4 de cada nucleosoma de la hélice de DNA madre se heredan directamente por las hélices de DNA hijas en la horquilla de replicación (véase la Figura 5–38). Por lo tanto, cuando un conjunto de nucleosomas que contiene CENP-A se ha ensamblado en un tramo de DNA, es fácil entender de qué forma puede generarse un nuevo centrómero en la misma posición en ambos cromosomas hijos después de cada ciclo de división celular (**Figura 4–51**).

La plasticidad de los centrómeros puede proporcionar una importante ventaja evolutiva. Hemos visto que los cromosomas evolucionan en parte por sucesos de rotura y reempalme (véase la Figura 4–18). Muchos de estos sucesos producen cromosomas con dos centrómeros o segmentos de cromosomas sin centrómeros. Aunque sea poco frecuente, tanto la inactivación de centrómeros como su capacidad de ser activados *de novo* pueden ocasionalmente permitir que los nuevos centrómeros formados se mantengan estables, facilitando así el proceso de evolución de los cromosomas.





(C)

Figura 4–50 Organización y función de la cromatina que forma el centrómero humano. (A) El DNA satélite alfa que forma la heterocromatina céntrica en humanos, se observa mediante la tinción de segmentos de cromatina con anticuerpos marcados con fluorescencia. Uno de los bloques se forma a partir de una larga cadena de nucleosomas que contienen la variante de histona H3 CENP-A (*verde*); el otro bloque contiene nucleosomas marcados con dimetil lisina 4 (*rojo*). Cada bloque tiene más de un millar de nucleosomas de largo. (B) Modelo de organización de los dos tipos de heterocromatina céntrica. Como en la levadura, los nucleosomas que contienen la variante de histona H3 forman el cinetocoro. (C) Organización de la heterocromatina céntrica y pericéntrica en un cromosoma metafásico humano, determinada por microscopía fluorescente utilizando los mismos anticuerpos que en (A). (Adaptado de B.A. Sullivan y G.H. Karpen, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:1076-1083, 2004. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

Existen similitudes sorprendentes entre la formación y el mantenimiento de los centrómeros y la de otras regiones de heterocromatina. En particular, el centrómero completo forma una entidad de tipo todo o nada, lo que sugiere que la adición de las proteínas después del evento de siembra es altamente cooperativa. Además, parece que una vez formada, la estructura se hereda en el DNA como una parte de cada ciclo de replicación del cromosoma

Las estructuras de la cromatina añaden características únicas a la función de los cromosomas de los eucariotas

A pesar de que aún queda mucho por conocer sobre las funciones de las diferentes estructuras de la cromatina, el empaquetamiento del DNA en el cromosoma probablemente fue crucial en la evolución de los eucariotas como nosotros. Parecía que los organismos pluricelulares serían posibles únicamente si las células de diferentes linajes se podían especializar mediante cambios en la accesibilidad y en la respuesta a la lectura de muchos cientos de genes. Como se describe en el Capítulo 22, cada célula ha almacenado una memoria de su historia reciente del desarrollo en circuitos reguladores que controlan su gran cantidad de genes.

Aunque las bacterias también requieren mecanismos de memoria celular, la complejidad de los circuitos de memoria necesarios en los eucariotas superiores no tiene precedentes. El empaquetamiento de regiones seleccionadas del genoma de los eucariotas en diferentes formas de cromatina hace posible un tipo de mecanismo de memoria celular que no está al alcance de las bacterias. La característica crucial de este modo de regulación génica, exclusivo de los eucariotas, es la capacidad de recordar el estado de un gen y de forma individual gen a gen –en forma de estructuras locales de cromatina que pueden persistir durante varios periodos de tiempo. Por un lado tenemos las estructuras como la heterocromatina central que, una vez se ha establecido, es estable heredándose de una generación celular a la siguiente (véase la Figura 4–51). Parece que existen unos mecanismos estrechamente relacionados, también basados en la herencia directa de formas de cromatina parental por parte de las hélices de DNA hijas situadas detrás de la horquilla de replicación, que son responsables de otros tipos de condensación de cromatina (**Figura 4–52**). Por ejemplo, el mismo tipo de heterocromatina silenciado permanentemente contiene la proteína HP1,

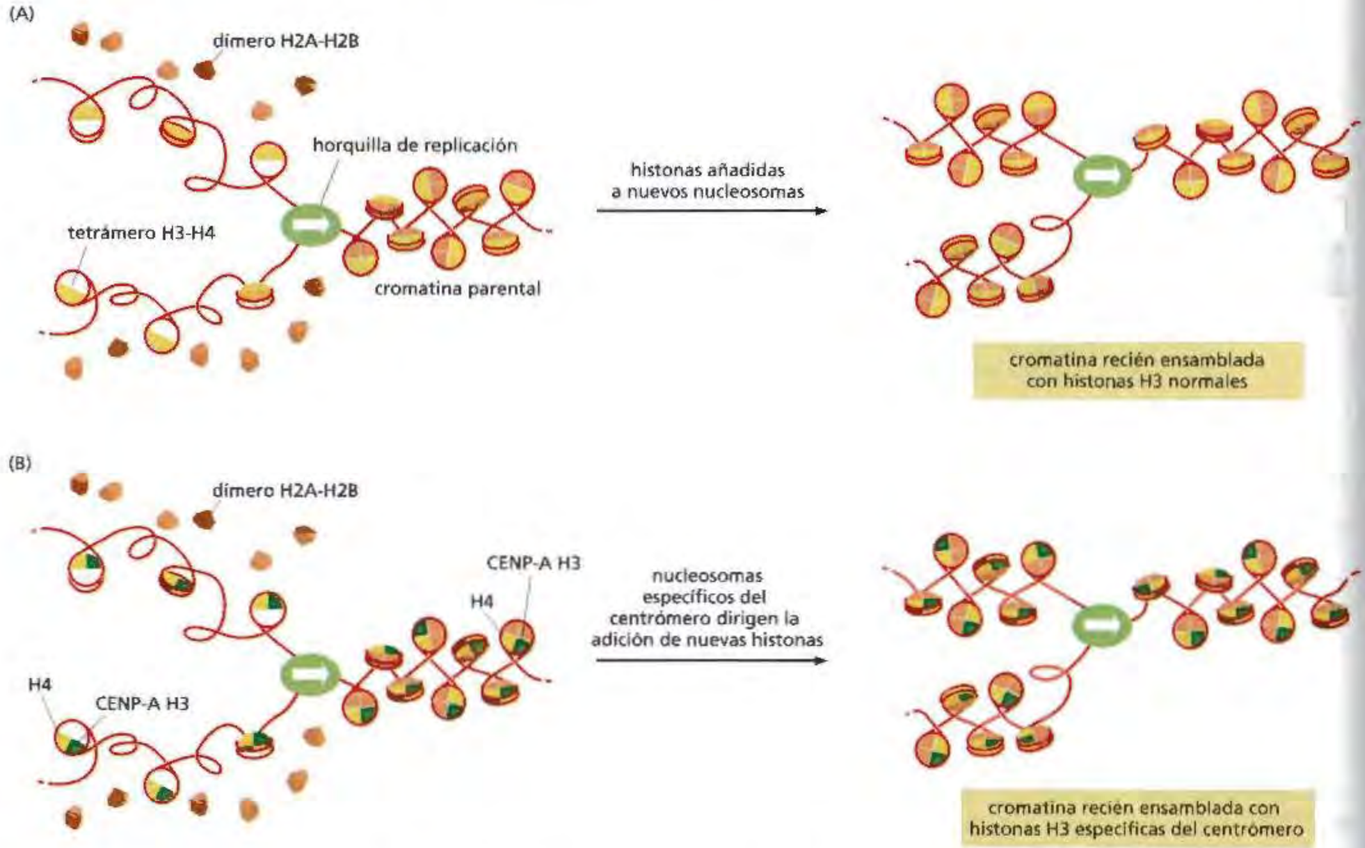


Figura 4–51 Un modelo para la herencia directa de la heterocromatina centromérica. (A) El ensamblaje normal de la cromatina en las dos hélices de DNA hijas generadas en la horquilla de replicación requiere la deposición de dímeros H2A-H2B sobre los tetrámeros H3-H4 directamente heredados, así como el ensamblaje de nuevos octámeros de histonas (véase la Figura 5-38 para más detalles). (B) En un centrómero, la herencia de tetrámeros formados por H4 y por la variante de H3 genera la formación de nuevos octámeros de histonas que también contienen la variante de H3. Un proceso similar puede causar la herencia de bloques adyacentes de heterocromatina céntrica (conteniendo H3 modificadas en lisina 4 por dimetilación; véase la Figura 4–50). Aunque se desconocen los detalles, parece que este proceso implica a otras proteínas centroméricas que se heredan junto con los nucleosomas (véase la Figura 4–52).

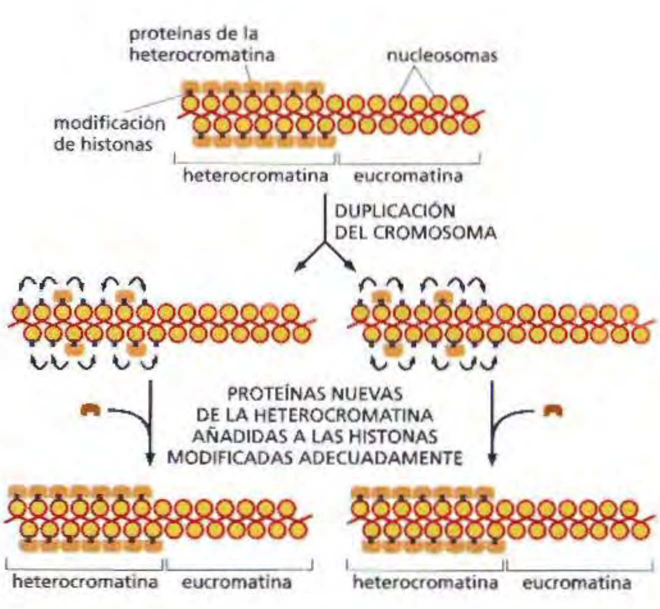


Figura 4–52 Cómo puede heredarse el empaquetamiento del DNA en heterocromatina durante la replicación del cromosoma. En este modelo, algunos de los componentes especializados que tiene la heterocromatina son distribuidos entre cada uno de los cromosomas hijos después de la duplicación del DNA, junto con los nucleosomas marcados especiales que unen. Después de la replicación del DNA, los nucleosomas heredados modificados actúan de forma coordinada con los componentes de la cromatina heredada y cambian el patrón de modificación de las histonas próximas de la nueva cadena hermana de nucleosomas. Esto origina nuevos lugares de unión para los mismos componentes, los cuales se ensamblan y completan la estructura. Este último proceso parece implicar complejos lector-escritor-remodelador que actúan de un modo similar al ilustrado previamente en la Figura 4–46.

mientras que la cromatina que cubre importantes genes de regulación del desarrollo se mantiene condensada mediante el grupo de proteínas polycomb. Este último tipo de heterocromatina silencia un gran número de genes que codifican proteínas reguladoras de genes en el desarrollo embrionario temprano, cubriendo un total de cerca del 2 por ciento del genoma humano, y sólo se eliminan cuando cada uno de los genes es requerido por el organismo en desarrollo (se explica en el Capítulo 22). Aunque existen otros tipos de estructuras de cromatina heredable, todavía no está claro cuántos tipos diferentes hay: el número puede ser mayor de 10 (véase la p. 238). La importancia fundamental de este mecanismo para distinguir genes diferentes está esquematizada en la **Figura 4–53**.

Otras formas de cromatina pueden tener una vida más corta, mucho menor que el tiempo de división de la célula; sin embargo, muchas de ellas tienen una persistencia inherente que ayuda a mediar las funciones biológicas.

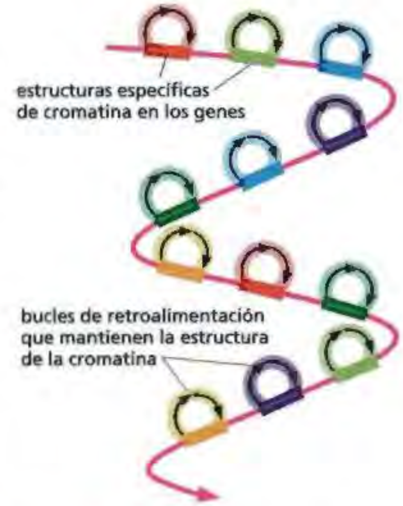


Figura 4–53 **Esquema de la memoria celular almacenada como información epigenética basada en cromatina, en los genes eucariotas.** Los genes eucariotas pueden empaquetarse en una amplia variedad de diferentes estructuras de cromatina, indicadas aquí por diferentes colores. Como mínimo algunas de estas estructuras tienen algún efecto especial en la expresión génica que puede ser directamente heredada como información epigenética cuando una célula se divide. Esto permite que algunas proteínas reguladoras de genes generen diferentes estados génicos que actúan una sola vez, ya que este estado puede ser recordado después de que la proteína reguladora ya no esté presente. La información epigenética también puede almacenarse en redes de moléculas señalizadoras que controlan la expresión génica (véase la Figura 7-86).

Resumen

A pesar de que el DNA cromosómico se ensambla de forma uniforme formando nucleosomas, en los organismos eucariotas es posible una gran variedad de estructuras de cromatina diferentes. Esta variedad se basa en una amplia gama de modificaciones covalentes reversibles sobre las cuatro histonas del núcleo nucleosómico. Estas modificaciones incluyen la mono-, di- y trimetilación de muchas cadenas laterales de diferentes lisinas, una reacción importante que es incompatible con la acetilación en las mismas lisinas. Las combinaciones específicas de modificaciones marcan cada nucleosoma con un código de histonas. El código de histonas es leído cuando los módulos proteicos que forman parte de un complejo proteico mayor se une a los nucleosomas modificados en una región de cromatina. Estas proteínas lectoras de códigos anclan proteínas adicionales que catalizan funciones biológicas relevantes.

Algunos complejos de proteínas lectoras de código contienen una enzima modificadora de histonas, como una metilasa de histonas, que "escribe" la misma marca que reconoce la proteína lectora de códigos. Un complejo lector-escritor-remodelador de este tipo puede difundir un tipo específico de heterocromatina a largas distancias del cromosoma. Concretamente, parece que de este modo se forman grandes regiones de heterocromatina condensada. La heterocromatina se suele encontrar alrededor de los centrómeros y cerca de los telómeros, pero también está presente en muchos otros lugares de los cromosomas. El fuerte empaquetamiento del DNA en la heterocromatina por lo general silencia los genes situados en su interior.

El fenómeno de efecto de posición variegada ofrece una buena evidencia de la herencia directa de las formas de cromatina condensada por parte de las hélices de DNA hijas formadas en la horquilla de replicación, y parece que un mecanismo similar es el responsable de mantener la cromatina especializada de los centrómeros. De modo más general, la capacidad de transmitir estructuras específicas de cromatina de una generación celular a la siguiente ofrece la base para un proceso epigenético de memoria celular que parece ser crítico para mantener la compleja gama de estados celulares requerido por los complejos organismos pluricelulares.

ESTRUCTURA GLOBAL DE LOS CROMOSOMAS

Tras describir el DNA y las moléculas de proteína a partir de las que se organiza la fibra de 30 nm de la cromatina, a continuación trataremos aspectos relacionados con la organización del cromosoma a una escala más global. Si un cromosoma humano se estirara de forma que llegara a presentar en toda su longitud la estructura de fibra de 30 nm, alcanzaría aproximadamente 0,1 cm de longitud y podría rodear el núcleo celular más de 100 veces. Es evidente que debe existir un nivel de condensación superior que está presente incluso en los cromosomas interfásicos. Aunque las bases moleculares de su organización aún constituyen un misterio, se sabe con certeza que este empaquetamiento de mayor orden conlleva la formación de bucles y enrollamientos. Este empaquetamiento de la cromatina es fluido y cambia frecuentemente en respuesta a las necesidades de la célula.

Empezaremos con la descripción de algunos casos especiales de cromosomas interfásicos que pueden ser visualizados con facilidad, ya que ciertas características de estos casos excepcionales podrían ser representativos de la estructura de todos los cromosomas interfásicos. Además, constituyen el único modo de que disponemos para investigar algunos aspectos fundamentales de la estructura de la cromatina planteados en la sección anterior.



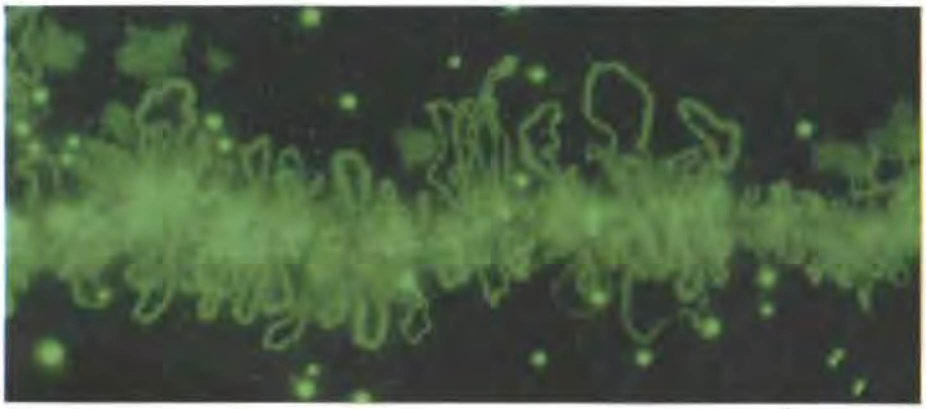


Figura 4–54 Cromosomas plumulados. (A) Micrografía de cromosomas plumulados de un oocito de anfibio. En una fase inicial de la diferenciación, cada cromosoma se replica al empezar la meiosis y los cromosomas homólogos replicados se aparean formando esta estructura muy extendida que contiene un total de cuatro moléculas de DNA replicadas o cromátidas. El estado de cromosomas plumulados puede persistir durante meses o años mientras el oocito elabora el aprovisionamiento de materiales que serán utilizados para su desarrollo dando lugar a un nuevo individuo. (B) Una región ampliada de un cromosoma similar, teñido con un reactivo fluorescente que hace que los bucles activos durante la síntesis de RNA sean claramente visibles. (Por cortesía de Joseph G. Gall.)

Luego veremos cómo se encuentra organizado en el núcleo celular un cromosoma interfásico normal, centrándonos en las células humanas. Finalmente describiremos la condensación adicional que experimentan los cromosomas interfásicos durante el proceso de mitosis.

Los cromosomas están plegados formando largos bucles de cromatina

A partir de estudios sobre la condensación y expansión de los cromosomas meióticos apareados en oocitos de anfibios en crecimiento (huevos inmaduros), se ha obtenido una imagen de la estructura de los cromosomas interfásicos en las células. Estos **cromosomas plumulados**, muy poco usuales (los cromosomas más grandes conocidos) son claramente visibles, incluso al microscopio óptico, con el que se puede ver que están organizados en una serie de grandes bucles de cromatina que se expande a partir de un eje cromosómico lineal (**Figura 4–54**).

En la **Figura 4–55** se representa la organización de un cromosoma plumulado. Cada bucle contiene siempre la misma secuencia de DNA y permanece extendido de la misma forma durante el crecimiento del oocito. Estos cromosomas producen grandes cantidades de RNA para el oocito y la mayoría de los genes presentes en el DNA del bucle se está expresando activamente. Sin embargo, la mayor parte del DNA no se encuentra en los bucles sino que permanece muy condensado en los *cromómeros* situados en el eje, donde generalmente los genes no se están expresando.

Parece que los cromosomas interfásicos de todos los eucariotas están organizados de un modo similar, es decir, en forma de bucles. Aunque normalmente estos bucles son demasiado pequeños y frágiles para ser observados con facilidad mediante un microscopio óptico, se pueden usar otros métodos para inferir su presencia. Por ejemplo, ha sido posible calcular la frecuencia con la que cualquier loci está apareado con su pareja en un cromosoma interfásico, revelándose así candidatos probables para constituir los lugares de la

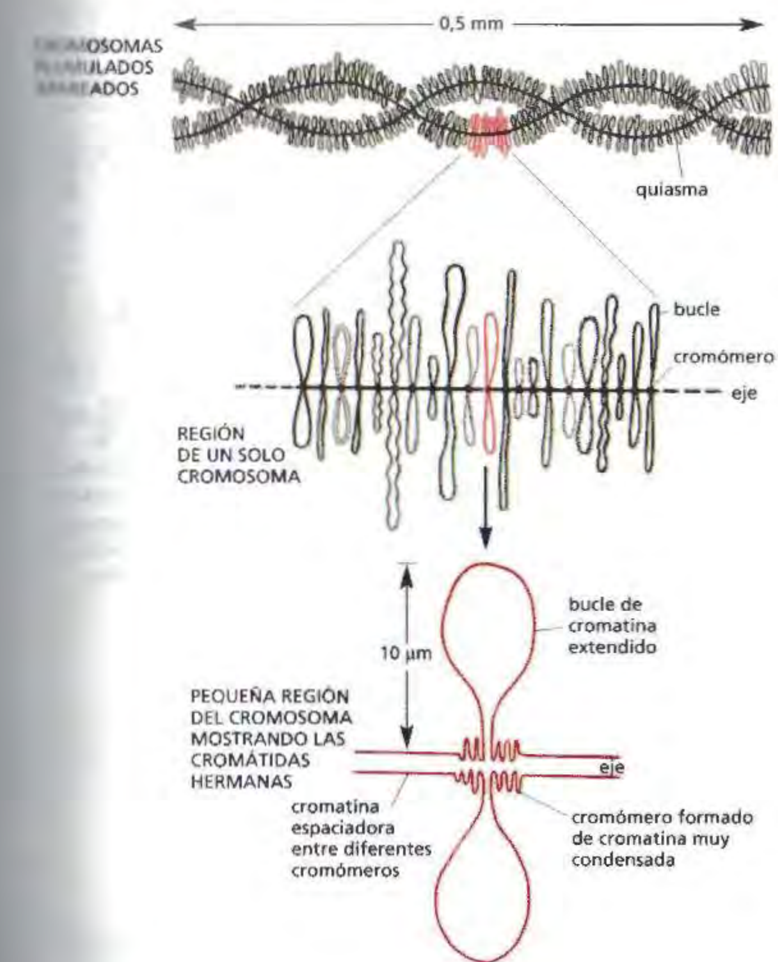


Figura 4–55 Modelo de la estructura de un cromosoma plumulado. El conjunto de cromosomas plumulados en muchos anfibios contiene un total de aproximadamente 10.000 bucles de cromatina diferentes, a pesar de que la mayor parte del DNA de cada cromosoma está muy condensado en los cromómeros. Cada bucle corresponde a una determinada secuencia de DNA. Cada célula contiene cuatro copias de cada bucle, dado que cada una de las dos unidades principales consiste en dos cromátidas hermanas muy juntas, como se muestra en la parte superior del esquema. Esta estructura en cuatro hebras es característica de esta fase del desarrollo del oocito, la fase de diploteno de la meiosis; véase Figura 21-19.

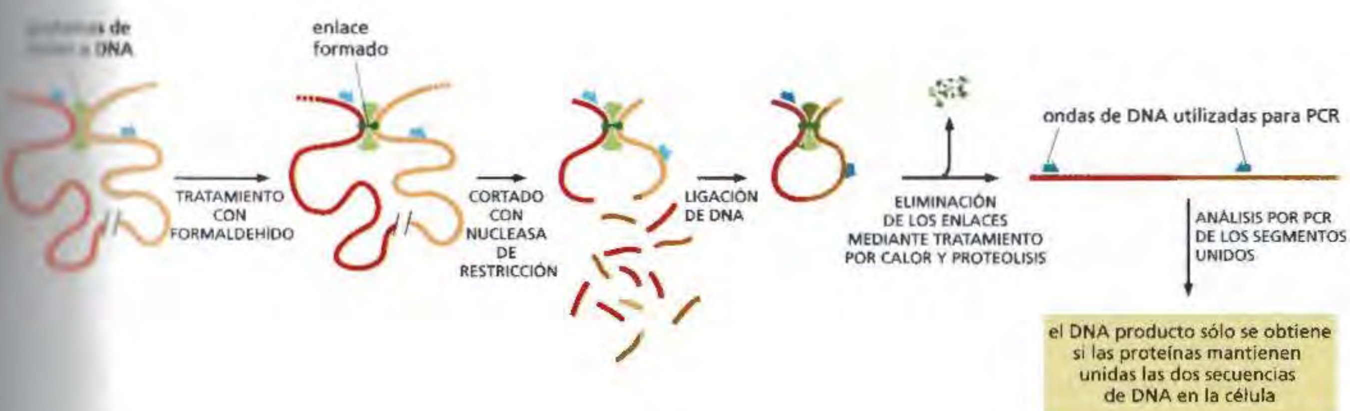


Figura 4–56 Método para determinar la posición de los bucles en el cromosoma interfásico. En esta técnica, conocida como captura de la conformación del cromosoma (3C), las células están tratadas con formaldehído para generar los enlaces de unión covalentes DNA-DNA y DNA-proteína indicados. Después, el DNA se trata con una nucleasa que corta el DNA en muchos trozos, exactamente en secuencias definidas de nucleótidos y que generan un conjunto de extremos cohesivos idénticos (véase la Figura 8-34). Los extremos cohesivos se unen mediante la complementariedad de sus bases. Antes del paso de unión mostrado, es importante diluir el DNA de modo que los fragmentos que estaban unidos (a través de los enlaces de entrecruzamiento) sean los que se unan con más probabilidad. Finalmente, los enlaces son revertidos y el nuevo fragmento de DNA ligado es identificado y amplificado por PCR (la reacción en cadena de la polimerasa descrita en el Capítulo 8). Combinando la información de la frecuencia de asociación generada mediante la técnica de 3C con la información de la secuencia de DNA, se pueden generar modelos estructurales para la conformación de los cromosomas interfásicos.

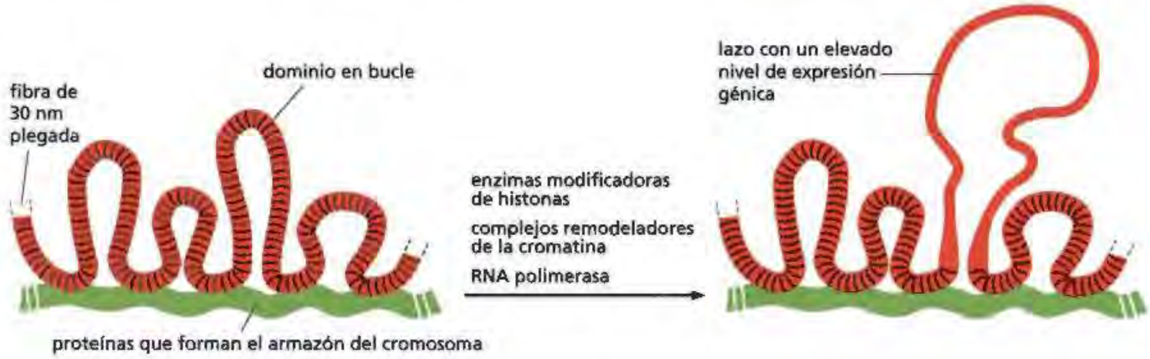


Figura 4-57 Modelo de la estructura de un cromosoma interfásico. Se muestra una sección de un cromosoma interfásico plegado formando una serie de dominios en bucle, cada uno de los cuales probablemente contiene entre 50.000 y 200.000 pares de nucleótidos de DNA de doble cadena empaquetados en la fibra de cromatina de 30 nm. La cromatina de cada bucle se condensa mediante un proceso de plegamiento poco conocido que revierte cuando la célula necesita disponer de un acceso directo al DNA que se halla empaquetado en estos bucles. No se conoce de qué forma la fibra de 30 nm plegada se ancla sobre el esqueleto del cromosoma. Sin embargo, en cromosomas mitóticos la base de los bucles cromosómicos están enriquecidos en condensinas y en DNA topoisomerasa II, dos proteínas enzimáticas que deben formar gran parte del eje en la metafase (véase la Figura 4-74).

cromatina que forman la estructura de bases íntimamente superpuestas en los bucles (**Figura 4-56**). Estos y otros experimentos sugieren que el DNA de los cromosomas humanos está organizado en bucles de diferente longitud. Un bucle normal debe contener entre 50.000 y 200.000 pares de nucleótidos de DNA, aunque se han llegado a sugerir bucles de hasta un millón de pares de nucleótidos (**Figura 4-57**).

Los cromosomas politénicos sólo son útiles para visualizar las estructuras de la cromatina

Las células gigantes de algunos insectos han alcanzado su enorme tamaño después de repetidos ciclos de síntesis de DNA que no van acompañados de ninguna división celular. Estas células, que tienen una dotación de DNA mayor de la normal, se denominan *poliploides* cuando tienen un número de cromosomas superior al normal. Sin embargo, en algunos tipos de células secretoras de la larva de la mosca, todas las copias de los cromosomas homólogos se disponen asociándose lateralmente, como botellas de vino en una caja, formando un único **cromosoma politénico**. Dado que los cromosomas politénicos se pueden dispersar formando células poliploides convencionales en algunos casos, estos dos estados cromosómicos están estrechamente relacionados. La estructura básica de los cromosomas politénicos tiene que ser similar a la de los cromosomas normales.

La politenia se ha estudiado especialmente en las células de las glándulas salivares de la larva *Drosophila*. Cuando se observan estos cromosomas politénicos con el microscopio óptico, se pueden ver *bandas* oscuras e *interbandas* claras (**Figura 4-58**), cada una de ellas formada por miles de secuencias idénticas de DNA en paralelo. Alrededor del 95% del DNA de los cromosomas politénicos está en las bandas mientras que el 5% restante está en las interbandas. Una banda muy fina puede contener 3000 pares de nucleótidos y una banda ancha, unos 200.000 pares de nucleótidos por fibra de cromatina. La cromatina de las bandas es oscura debido a que el DNA presenta un mayor grado de empaquetamiento que en las interbandas; además puede contener mayor proporción de proteínas (**Figura 4-59**).

En todo el conjunto de cromosomas politénicos de *Drosophila* hay aproximadamente 3700 bandas y 3700 interbandas. Cada una de las bandas puede reconocerse por su tamaño y su posición, y se les ha asignado un número generando un "mapa" del cromosoma que se ha indexado en la secuencia del genoma de esta mosca.

Los cromosomas politénicos de *Drosophila* constituyen un buen punto de partida para examinar de qué modo se organiza la cromatina a gran escala. En la sección anterior, se constató que existen muchas formas de cromatina, cada una de las cuales contiene nucleosomas con diferente combinación de histonas modificadas. Leyendo este código de histonas, unos conjuntos específicos de proteínas no-histona se ensamblan en los nucleosomas afectando a las funciones biológicas de diferentes modos. Algunas de estas proteínas

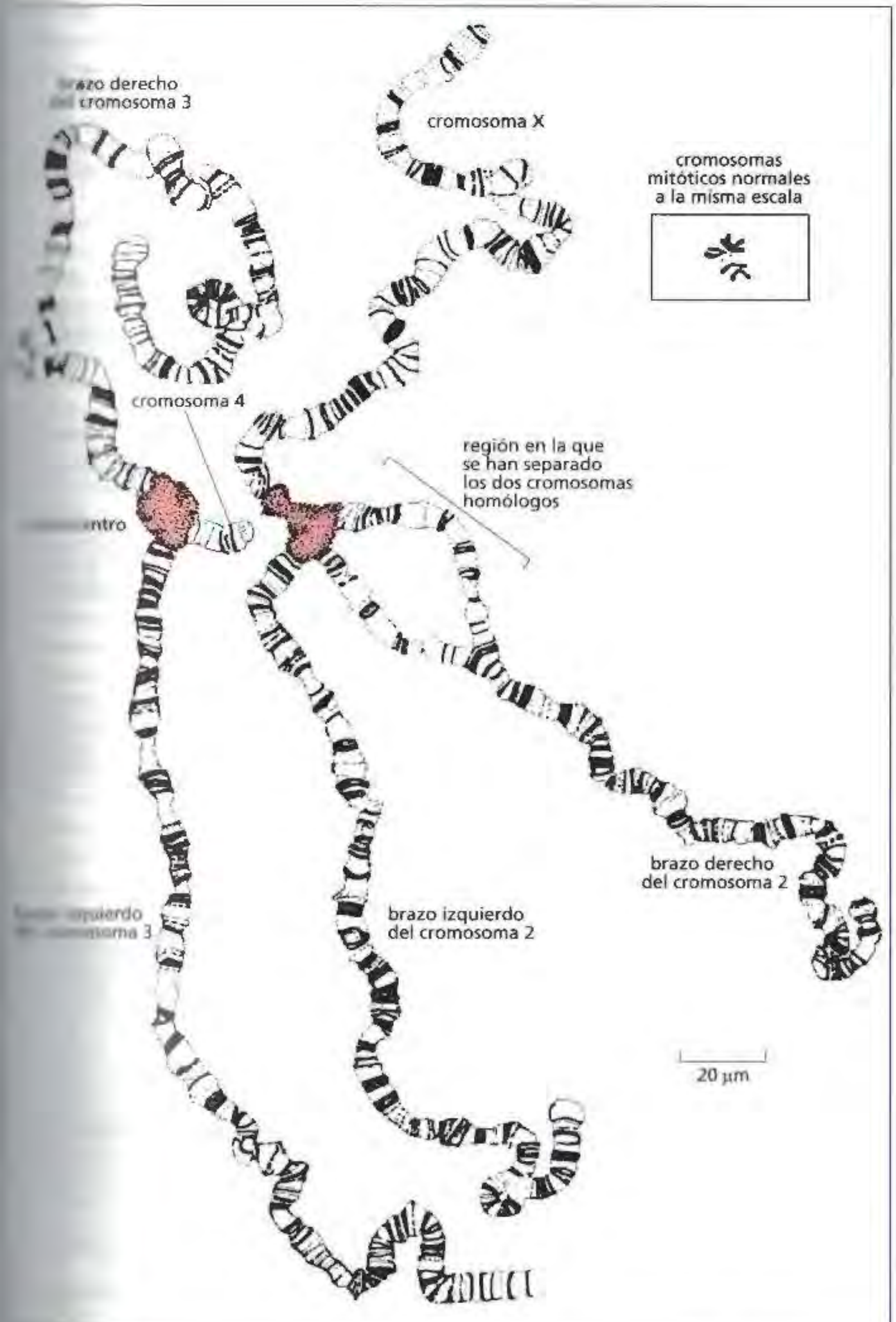


Figura 4–58 Conjunto completo de cromosomas politénicos de una glándula salival de *Drosophila*. En este esquema realizado a partir de una micrografía obtenida en campo claro, estos cromosomas gigantes han sido extendidos para su visualización, aplastándolos contra un portaobjetos. *Drosophila* tiene cuatro pares de cromosomas y en el esquema se encuentran cuatro parejas de cromosomas. Pero cada cromosoma está íntimamente apareado con su homólogo (de modo que aparece como una sola estructura), lo cual no ocurre en la mayor parte de los núcleos (excepto en la meiosis). Cada cromosoma ha sufrido varias rondas de replicación y los homólogos y sus duplicados han permanecido perfectamente alineados los unos con los otros, resultando un grueso cable de cromatina de muchas cadenas de DNA de grosor.

Normalmente los cuatro cromosomas politénicos se encuentran unidos por regiones de heterocromatina cercanas a los centrómeros que se agregan formando un "cromocentro" único de gran tamaño (*región rosa*). Sin embargo, en esta preparación el cromocentro se ha roto en dos partes por efecto del proceso de extensión utilizado. (Adaptado de T.S. Painter, *J. Hered.* 25: 465-476, 1934. Con la autorización de Oxford University Press.)

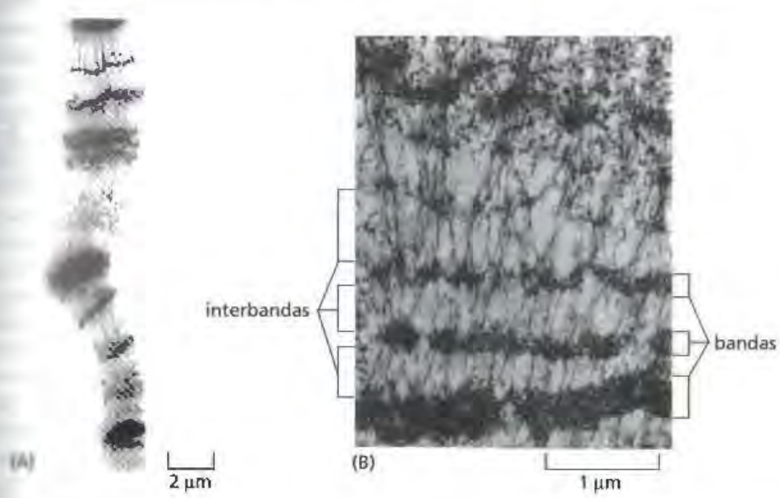


Figura 4–59 Micrografías de los cromosomas politénicos de la glándula salival de *Drosophila*. (A) Micrografía de una porción de un cromosoma obtenida con el microscopio óptico. El DNA se ha teñido con una tinción fluorescente, pero aquí se presenta la imagen en negativo de modo que el DNA se ve *oscuro* en vez de *claro*; se pueden apreciar con claridad que las bandas son regiones de elevada concentración de DNA. Este cromosoma ha sido procesado mediante un tratamiento de alta presión para mostrar más claramente el patrón distinto de bandas e interbandas. (B) Electromicrografía de una pequeña porción de un cromosoma politénico de *Drosophila* mostrado en esta sección. Se pueden distinguir claramente bandas de distinto grosor separadas por interbandas que están formadas por cromatina menos condensada. (A, adaptada de D.V. Novikov, I. Kireev y A.S. Belmont, *Nat. Methods* 4:483-485, 2007. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd. B, por cortesía de Veikko Sorsa.)

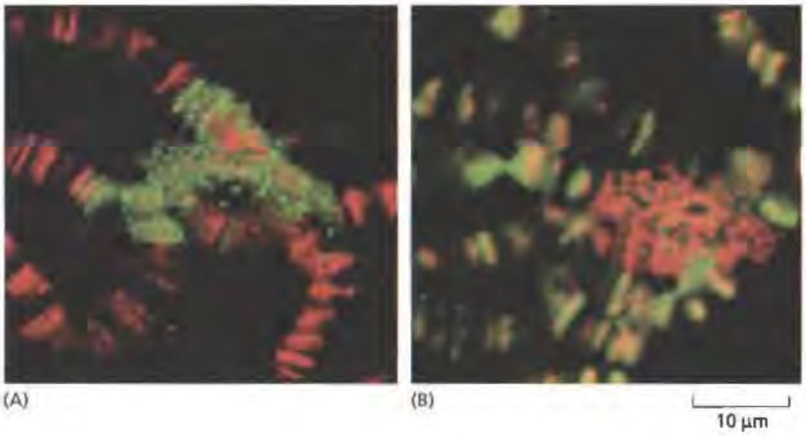


Figura 4–60 Patrón de modificación de histonas en cromosomas politénicos de *Drosophila*. Los anticuerpos que reconocen específicamente diferentes modificaciones de histonas pueden revelar dónde se encuentra cada modificación respecto a las muchas bandas e interbandas de estos cromosomas. En las dos preparaciones mostradas, se compara la posición de dos marcajes diferentes en la cola de la histona H3. En ambos casos, el anticuerpo que marca la histona modificada es *verde* y el DNA se ha teñido de *rojo*. Sólo se muestra una pequeña región que rodea cada cromocentro. (A) La dimetilación en la lisina 9 (*verde*) es una modificación de histona asociada a la heterocromatina pericéntrica. Se observa asociada al cromocentro. (B) La acetilación de la lisina 9 (*verde*) es una modificación concentrada en histonas asociadas a genes activos. Se observa en numerosas bandas en los brazos de los cromosomas, pero no en el cromocentro heterocromático. Experimentos similares se pueden llevar a cabo para situar muchas otras modificaciones de histonas y proteínas no histonas (véase p. ej. la Figura 22-45 para cromosomas teñidos para Polycomb). (Adaptado de A. Ebert, S. Lein, G. Schotta y G. Reuter, *Chromosome Res.* 14:377-392, 2006. Con la autorización de Springer.)

no-histona pueden dispersarse a largas distancias por el DNA, transmitiendo una estructura similar de cromatina a regiones contiguas del genoma (véase la Figura 4–46). Así, en algunas regiones toda la cromatina tiene una estructura similar y está separada de los dominios vecinos mediante proteínas barrera (véase la Figura 4–47). A baja resolución, el cromosoma interfásico puede considerarse como un mosaico de estructuras de cromatina, cada una de ellas conteniendo modificaciones nucleosómicas particulares asociadas a conjuntos particulares de proteínas no-histona. (A mayor nivel de resolución también se puede resaltar la gran cantidad de proteínas de unión al DNA específicas de secuencia que se describen en el Capítulo 7.)

Esta visión del cromosoma interfásico sirve para interpretar los resultados obtenidos en los estudios sobre cromosomas politénicos. Mediante la tinción con anticuerpos altamente específicos, se puede observar que las histonas modificadas de diferentes modos (**Figura 4–60**), así como los distintos grupos de proteínas no-histona, se sitúan en diferentes bandas del cromosoma politénico. Este hecho sugiere una potente estrategia general. Utilizando combinaciones de anticuerpos que se unen fuertemente a cada una de las diferentes modificaciones que crea el código de histonas (véase la Figura 4–39), es posible determinar qué combinaciones de modificaciones determinan de forma específica cada tipo particular de dominio de cromatina. Mediante la realización de experimentos similares con anticuerpos que reconocen cada una de los centenares de diferentes proteínas no-histona de la cromatina, se puede intentar descifrar los diferentes significados codificados en las modificaciones de las histonas.

Existen muchas formas de heterocromatina

Los estudios moleculares han conducido a reevaluar nuestra visión sobre la heterocromatina. Durante muchas décadas, la heterocromatina era considerada como una entidad única definida por su estructura altamente condensada y su capacidad de silenciar genes de modo permanente. Pero si definimos la heterocromatina como una forma compacta de cromatina que puede silenciar genes, heredarse epigenéticamente y difundir a lo largo de los cromosomas causando efectos de posición variegada (véase la Figura 4–36), está claro que existen diferentes tipos de heterocromatina. En realidad, ya hemos considerado tres de estos tipos cuando hemos hablado del centrómero humano (véase la Figura 4–50).

Se cree que cada dominio de heterocromatina está formado por el ensamblaje cooperativo de un conjunto de proteínas no-histona. Por ejemplo, la clásica heterocromatina pericentromérica contiene más de seis de estas proteínas, incluyendo la proteína de la heterocromatina 1 (HP1: ***heterochromatin protein 1***), mientras que la llamada forma polycomb de heterocromatina contiene un número similar de proteínas formando un conjunto no solapado (proteínas PcG). Existen centenares de pequeños bloques de heterocromatina dispersos por los brazos de los cromosomas politénicos de *Drosophila* que se identifican por su replicación tardía (descrito en el Capítulo 5). La tinción con anticuerpos de estas regiones de heterocromatina sugieren que las formas conocidas de heterocromatina pueden explicar no más de la mitad de las bandas politénicas (**Figura 4–61**). Así, tienen que existir otros tipos de heterocromatina cuya composición proteica es desconocida. Parece ser que cada



Figura 4–61 Evidencias de muchas formas de heterocromatina. En este estudio se examinó la presencia de dos proteínas no histonas en 240 lugares de replicación tardía en los brazos de los cromosomas politénicos de *Drosophila*. Se sabe que estas proteínas ayudan a compactar dos formas diferentes de heterocromatina (véase el texto). Como se indica, la tinción por anticuerpos sugiere que aproximadamente la mitad de los sitios están empaquetados en formas de heterocromatina que son diferentes a estos dos tipos. Experimentos como este demuestran que todavía queda mucho que aprender sobre el empaquetamiento del DNA en los eucariotas. (Datos de I.F. Zhimulev y E.S. Belyaeva, *BioEssays* 25:1040-1051, 2003. Con la autorización de John Wiley & Sons.)

Cada uno de estos tipos de heterocromatina se regula de modo diferente y desempeñan papeles diferentes en la célula.

La estructura de la cromatina en cada dominio depende en último término de las proteínas que se unen a secuencias específicas de DNA; en un organismo pluricelular varían dependiendo del tipo celular y su estado de desarrollo. De este modo, tanto el patrón de dominios de heterocromatina como su composición individual (modificaciones nucleosómicas más proteínas no-histona) puede variar entre tejidos. Estas diferencias hacen que los genes accesibles a la expresión génica sean diferentes, ayudando a explicar la diversificación celular que acompaña el desarrollo embrionario (descrito en el Capítulo 22). La comparación de los genes politénicos de dos tejidos diferentes de la mosca respaldan esta idea general: aunque el patrón de bandas e interbandas sea mayoritariamente el mismo, existen diferencias reproducibles.

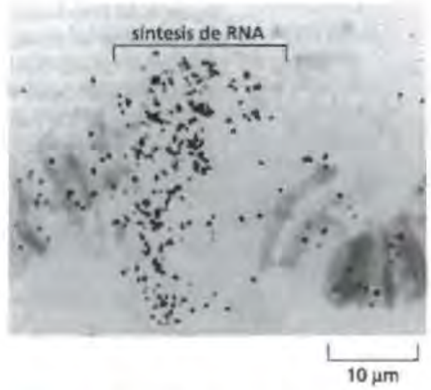


Figura 4–62 Síntesis de RNA en un "puff" de cromosoma politénico. Autorradiografía de un "puff" aislado de un cromosoma politénico de glándulas salivares del insecto *C. tentans*. La primera etapa en la expresión génica, como se indica en el Capítulo 1 y se describe con detalle en el Capítulo 6, es la síntesis de RNA utilizando el DNA como molde. En la porción del cromosoma que se destaca se está produciendo síntesis de RNA, por lo cual presenta marcaje con uridina-^{3}H (véase la p. 603), un precursor de la molécula de RNA que se incorpora a la cadena creciente de RNA. (Por cortesía de José Bonner.)

Los bucles de cromatina se descondensan cuando se expresan los genes que contienen

A medida que un insecto pasa a través de las distintas fases del desarrollo, aparecen nuevos cromosomas *puff* y desaparecen los anteriores en sus cromosomas politénicos al ser activada la expresión de nuevos genes y desactivada la de genes anteriores (**Figura 4–62**). Del estudio de los "puffs", especialmente cuando son relativamente pequeños y aún se pueden distinguir las bandas de los cromosomas, parece deducirse que la mayoría de "puffs" proceden de la descondensación de una sola banda cromosómica.

Las fibras individuales de cromatina que forman un "puff" pueden visualizarse con el microscopio electrónico. En condiciones favorables, los bucles se ven con más facilidad en los cromosomas plumulados de los anfibios, descritos anteriormente. Cuando un bucle de DNA no se expresa, adopta una estructura más gruesa, formada posiblemente por una fibra de 30 nm plegada, pero cuando se activa la expresión génica el bucle adopta una configuración más extendida. En las electromicrografías, la cromatina situada a ambos lados de un bucle descondensado aparece bastante más compacta, lo cual sugiere que un bucle constituye un dominio funcional independiente de la estructura de la cromatina.

Observaciones realizadas en células humanas también sugieren que los bucles de cromatina altamente plegados se expanden, ocupando un volumen mayor, cuando se expresa alguno de los genes que contiene el bucle. Por ejemplo, en un cromosoma quiescente, las regiones de 0,4 a 2 millones de pares de nucleótidos de longitud aparecen como manchas compactas en el núcleo interfásico cuando son observadas mediante un microscopio de fluorescencia utilizando FISH u otras tecnologías. Sin embargo, cuando se expresan sus genes, se observa que el mismo DNA ocupa un mayor territorio, con estructuras alargadas y plegados que sustituyen la mancha original.

La cromatina se puede desplazar a lugares específicos dentro del núcleo y modificar la expresión de los genes

La visualización de cromosomas individuales mediante nuevas metodologías ha mostrado que cada uno de los 46 cromosomas interfásicos de una célula humana tiende a ocupar su propio territorio en el núcleo (**Figura 4–63**). Sin embargo, imágenes de este tipo sólo presentan una visión parcial del DNA en cada cromosoma. Los experimentos en los que se localizan específicamente las regiones de heterocromatina de un cromosoma revelan que con frecuencia se encuentran estrechamente asociadas a la lámina nuclear, con independencia del cromosoma que se examine. Las sondas de DNA que tiñen sobre todo regiones ricas

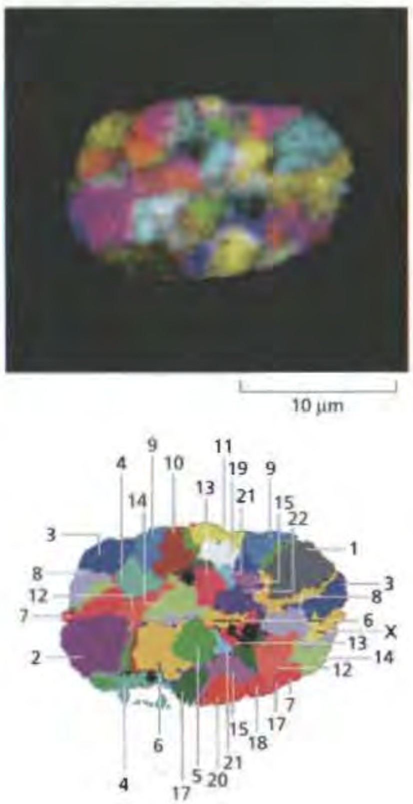


Figura 4–63 Visualización simultánea de territorios cromosómicos de todos los cromosomas humanos en un solo núcleo interfásico. Un análisis tipo FISH mediante la utilización de una mezcla de diferentes fluorocromos para marcar el DNA de cada cromosoma, detectados con siete canales de color en un microscopio de fluorescencia, permite distinguir cada cromosoma en reconstrucciones tridimensionales. Debajo de la micrografía, cada cromosoma se identifica en un esquema de la imagen. Obsérvese que generalmente los dos cromosomas homólogos (p. ej., las dos copias del cromosoma 9) no colocalizan. (De M.R. Speicher y N.P. Carter, *Nat. Rev. Genet.* 6:782-792, 2005. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

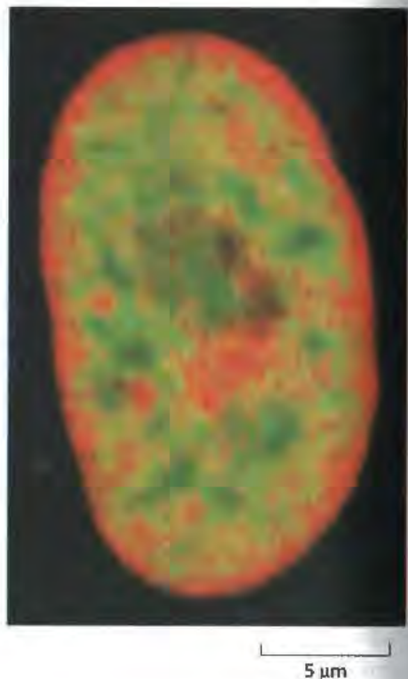


Figura 4–64 Distribución en un núcleo interfásico de las regiones del genoma humano ricas en genes. Se han visualizado regiones ricas en genes con una sonda fluorescente que hibrida con la repetición Alu, la cual está presente con más de un millón de copias en el genoma humano (véase la Figura 5-75). Por razones desconocidas, estas secuencias se agrupan en regiones cromosómicas ricas en genes. En esta representación, las regiones ricas en repeticiones de la secuencia Alu se han marcado en *verde*, las regiones sin estas secuencias se han marcado en *rojo* y las regiones intermedias se han marcado en *amarillo*. Las regiones ricas en genes no presentan DNA cerca de la envoltura nuclear. (De A. Bolzer et al., *PLoS Biol.* 3:826-842, 2005. Con la autorización de Public Library of Science.)

en genes de los cromosomas humanos producen una imagen de los núcleos interfásicos que probablemente refleja las diferentes posiciones de los genes activos e inactivos (**Figura 4–64**).

Diversos tipos de experimentos han llevado a concluir que la posición de un gen en el interior del núcleo cambia cuando se expresa intensamente Así, una región que se transcribe de forma muy activa, con frecuencia se encuentra extendida fuera de su territorio cromosómico y forma un bucle extenso (**Figura 4–65**). Veremos en el Capítulo 6 que el inicio de la transcripción –el primer paso de la expresión de un gen– requiere el ensamblaje de cerca de 100 proteínas y tiene sentido que esto ocurra en regiones del núcleo particularmente ricas en estas proteínas.

De modo más general, está claro que el núcleo es muy heterogéneo, con diferentes regiones funcionales a las que pueden desplazarse las porciones de cromosomas mientras están sujetas a diferentes procesos bioquímicos –como cuando cambia la expresión de sus genes (**Figura 4–66**). Existen evidencias de que algunas de estas regiones nucleares están marcadas con diferentes fosfolípidos de inositol, recordando el modo en que estos mismos fosfolípidos se usan para distinguir las membranas en el citoplasma (véase la Figura 13–11). Pero todavía constituye un misterio qué es lo que hacen estos fosfolípidos unidos en el interior del núcleo, ya que el único entorno rico en lípidos conocido es la bicapa lipídica de la envoltura nuclear.

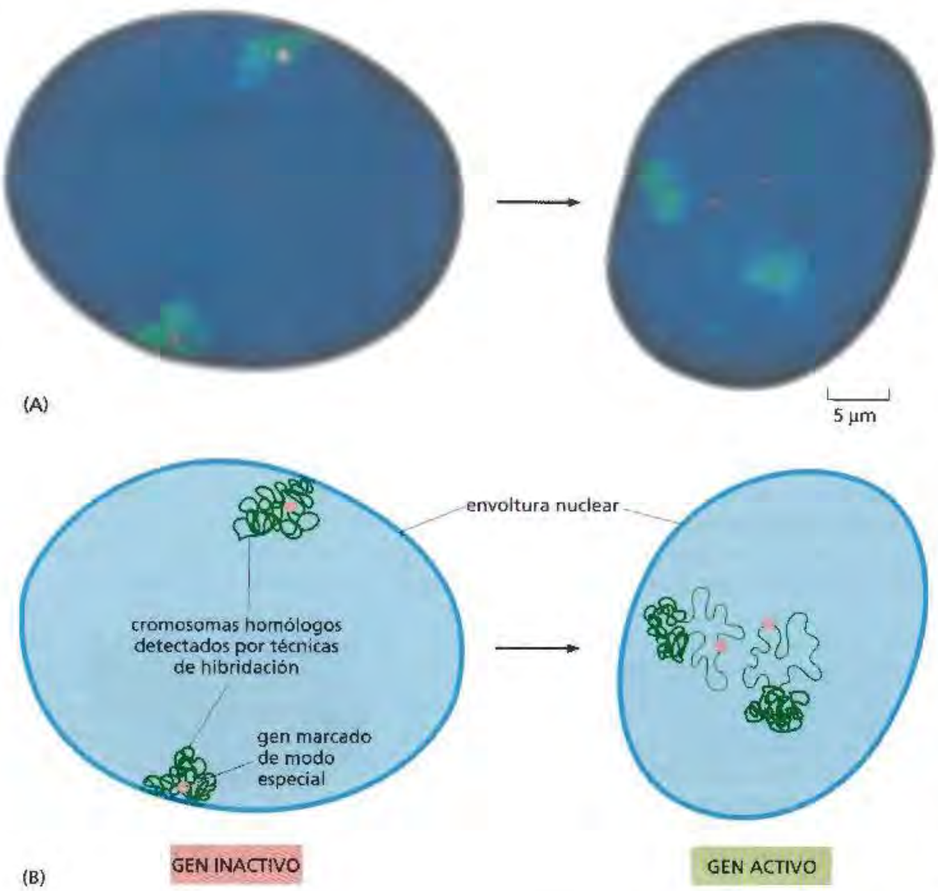


Figura 4–65 Un efecto de los elevados niveles de expresión génica en la localización intranuclear de la cromatina. (A) Micrografías fluorescentes del núcleo humano mostrando cómo cambia la posición de un gen cuando pasa a ser altamente transcrito. Se observa que la región del cromosoma adyacente al gen (*rojo*) sólo abandona su territorio (*verde*) cuando es muy activo. (B) Representación esquemática de un bucle grande de cromatina que se expande cuando el gen está activo y se contrae cuando se inactiva. Por el mismo método, se puede ver que otros genes que se expresan menos activamente permanecen dentro de su territorio cromosómico cuando se transcriben. (De J.R. Chubb y W.A. Bickmore, *Cell* 112:403-406, 2003. Con la autorización de Elsevier.)

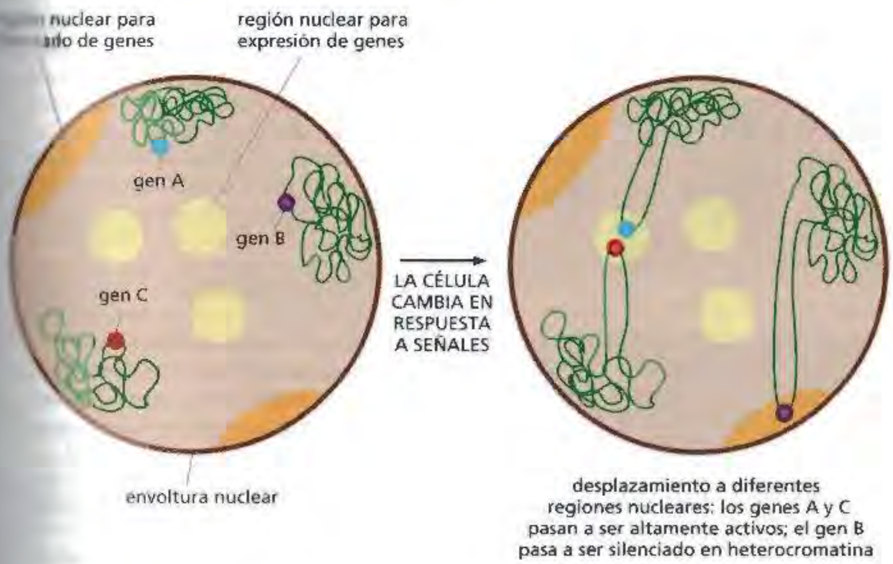


Figura 4–66 Desplazamiento de los genes a diferentes regiones nucleares cuando cambia su expresión. El interior del núcleo es muy heterogéneo; se sabe que diferentes regiones vecinas tienen efectos diferentes sobre la expresión génica. Probablemente desplazamientos como los que se indican reflejan cambios en las afinidades de unión que tienen la cromatina y las moléculas de RNA alrededor del gen por las diferentes regiones nucleares. Parece que este desplazamiento se dirige por difusión y no requiere de un proceso de desplazamiento dirigido, ya que se puede ver que cada región del cromosoma está sometida a un movimiento constante al azar de tal modo que, cuando se marca, su posición se puede seguir en una célula viva.

Unas redes de macromoléculas forman un conjunto de diferentes ambientes bioquímicos en el interior del núcleo

En el Capítulo 6 se describe la función de una variedad de subcompartimientos presentes en el núcleo celular. El mayor y más obvio de ellos es el nucleolo, una estructura bien conocida por los microscopistas desde el siglo XIX (véase la Figura 4–9). Las regiones nucleolares consisten en redes de RNA y proteínas circundantes que transcriben los genes del RNA ribosómico, presentándose a menudo como múltiples nucleolos. El nucleolo es el lugar de la célula donde se ensamblan y maduran los ribosomas, así como el lugar donde suceden muchas otras reacciones especializadas.

En el núcleo también están presentes una gran variedad de orgánulos menos obvios. Por ejemplo, en la mayoría de células animales y vegetales se encuentran unas estructuras esféricas llamadas corpúsculos de Cajal y también conjuntos de gránulos de intercromatina (Figura 4–67). Como el nucleolo, estos orgánulos se componen de determinadas proteínas y moléculas de RNA que se unen dando lugar a redes altamente permeables a otras proteínas y moléculas de RNA del nucleoplasma circundante (**Figura 4–68**).

Estructuras como estas pueden generar diferentes ambientes bioquímicos mediante la inmovilización de grupos de macromoléculas seleccionados, como pueden hacerlo otras redes de proteínas y moléculas de RNA asociadas a los poros nucleares y a la envoltura nuclear. En principio, esto permite que las moléculas que entran en estos espacios sean procesadas con una gran eficiencia a través de complejas vías de reacciones. De este modo, las redes fibrosas altamente permeables de este tipo pueden suponer, para las reacciones que tienen lugar en el núcleo, muchas de las ventajas cinéticas que representa la compartimentación (véase la p. 186) (**Figura 4–69A**). Sin embargo, a diferencia de los compartimientos membranosos del citoplasma (descritos en el Capítulo 12), estos subcompartimientos nucleares –sin una membrana de bicapa lipídica– no pueden ni excluir ni concentrar moléculas específicas pequeñas.

La célula tiene una habilidad destacable construyendo diferentes entornos bioquímicos en el interior del núcleo, los cuales facilitan varios aspectos de la expresión génica que se describirán en el Capítulo 6 (véase la Figura 6–49). Como ocurre con el nucleolo, parece que estos subcompartimientos sólo se forman cuando se necesitan y generan localmente una alta concentración de muchas enzimas diferentes y moléculas de RNA necesarias para un proceso particular. De un modo análogo, cuando el DNA es dañado por irradiación, el conjunto de enzimas necesarias para llevar a cabo la reparación del DNA se concentra en sitios concretos dentro del núcleo y genera "factorías de reparación" (véase la Figura 5–60). Con frecuencia el núcleo presenta cientos de lugares discretos de factorías para la síntesis de DNA y de RNA.

Parece como si todas estas entidades utilizaran el tipo de enganche ilustrado en la Figura 4–69B, en la que se ve que largas cadenas flexibles de polipéptidos (o algún otro polímero)



Figura 4–67 Electromicrografía en la que se muestran dos subcompartimientos nucleares fibrosos muy comunes. La esfera grande es un corpúsculo de Cajal. La pequeña y más oscura es un gránulo de intercromatina, también conocido como mancha (*spreckle*) (véase también la Figura 6-49). Estos "orgánulos subnucleares" son del núcleo del oocito de *Xenopus*. (De K.E. Handwerger y J.G. Gall, *Trends Cell Biol.* 16:19-26, 2006. Con la autorización de Elsevier.)



Figura 4–68 Experimento que muestra que los orgánulos subnucleares son altamente permeables a las macromoléculas. En estas micrografías del núcleo de un oocito vivo, la hilera de la parte superior compara la fluorescencia del interior de los nucleolos, de los corpúsculos de Cajal y de las manchas con la fluorescencia del nucleoplasma que los rodea, 12 horas después de haber inyectado al nucleoplasma los dextranos fluorescentes de los tamaños indicados. El brillo de cada orgánulo refleja su permeabilidad, siendo el más permeable el más brillante. Por comparación, las hileras de la parte inferior presentan micrografías normales de los mismos campos microscópicos con el nucleolo marcado en *marrón* para poder distinguirlo. Se puede ver que los corpúsculos de Cajal son más permeables que los nucleolos. Sin embargo, la cuantificación muestra que una gran cantidad de dextranos entra a cada orgánulo, incluso en el caso del dextrano mayor de los utilizados. (De K.E. Handwerger, J.A. Cordero y J.G. Gall, *Mol. Biol. Cell* 16:202-211, 2005. Con la autorización de American Society of Cell Biology.)

están entremezcladas con lugares de unión que concentran muchas proteínas y/o moléculas de RNA necesarias para catalizar un proceso en concreto. No resulta sorprendente que los enganches se utilicen de un modo similar para ayudar a acelerar procesos biológicos en el citoplasma, incrementando la velocidad de reacciones determinadas (véase p. ej. la Figura 16–38).

¿Existe también un marco intranuclear, análogo al citoesqueleto, en el cual los cromosomas y otros componentes del núcleo se encuentran organizados? La *matriz nuclear*, o *andamiaje*, se ha definido como el material insoluble restante en el núcleo después de una serie de extracciones bioquímicas. Muchas de las proteínas y moléculas de RNA que forman este material insoluble son parecidas a las derivadas de los subcompartimientos fibrosos del núcleo ya descritos, mientras que otros parecen ser proteínas que ayudan a formar la base de los bucles cromosómicos o a unir los cromosomas a otras estructuras del núcleo. Todavía no sabemos si el núcleo también contiene o no largos filamentos que forman rutas organizadas a través de las cuales se pueden desplazar los componentes nucleares, análogas a algunos de los filamentos del citoplasma.

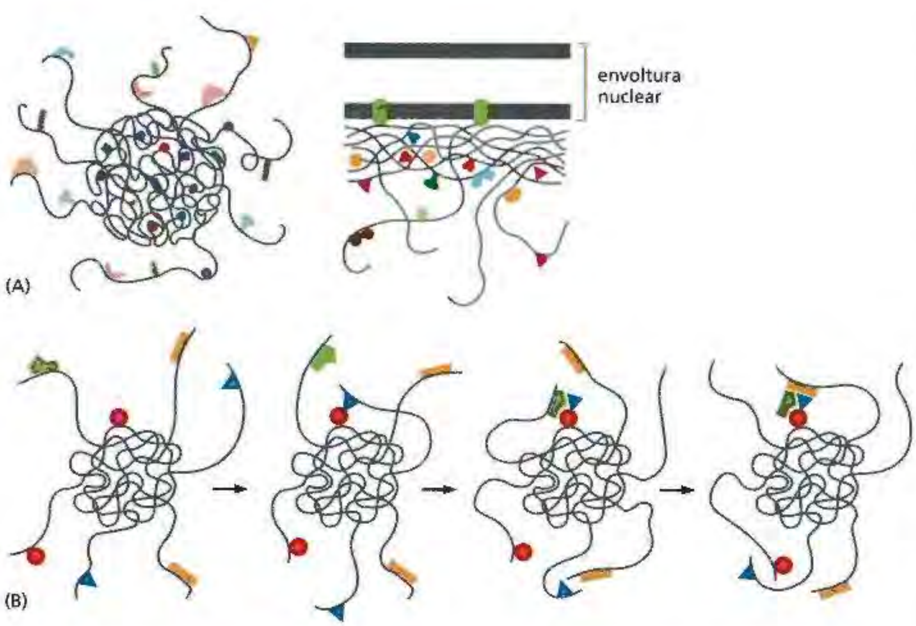


Figura 4–69 Compartimentación eficiente sin bicapas membranosas. (A) Ilustración esquemática de la organización de un orgánulo subnuclear esférico (*izquierda*) y de un subcompartimiento postulado de organización similar justo debajo de la envoltura nuclear (*derecha*). En ambos casos, se asocian RNA y/o proteínas (*gris*) formando estructuras de tipo gel altamente porosas que contienen lugares de unión para otras proteínas y moléculas de RNA (*objetos coloreados*). (B) El anclaje a cadenas poliméricas largas y flexibles, de un conjunto seleccionado de proteínas y moléculas de RNA, puede generar "áreas de organización" que aceleran las velocidades de las reacciones en los subcompartimientos del núcleo. Las reacciones catalizadas dependen de las macromoléculas particulares que se localizan mediante el anclaje. Evidentemente, cabe esperar los mismo tipos de aceleración de las velocidades de reacción en subcompartimientos similares establecidos por cualquier parte de la célula (véase también la Figura 3-80C).



Figura 4–70 Un cromosoma mitótico en la metafase. Cada cromátida hija contiene una de las dos moléculas hijas idénticas de DNA que se han generado previamente en el ciclo celular por la replicación del DNA (véase también la Figura 17-26).

Los cromosomas mitóticos están constituidos por cromatina en su forma más condensada

Tras describir la estructura dinámica de los cromosomas interfásicos, fijaremos nuestra atención en los cromosomas mitóticos. Los cromosomas de casi todas las células pasan a ser perfectamente visibles con el microscopio óptico durante la mitosis, cuando se empaquetan formando unas estructuras mucho más condensadas. Este empaquetamiento sólo reduce unas 10 veces la longitud de un cromosoma interfásico típico, pero produce un cambio extraordinario en la apariencia de los cromosomas.

En la **Figura 4–70** se muestra un **cromosoma mitótico** típico durante la metafase de la mitosis (para las fases de la mitosis véase la Figura 17–3). Las dos moléculas de DNA hijas producidas por replicación del DNA durante la interfase del ciclo celular están plegadas por separado, formando dos cromosomas hermanos o *cromátidas hermanas* que se mantienen unidos por sus centrómeros (véase también la Figura 4–50). Normalmente, estos cromosomas mitóticos están cubiertos por diversas moléculas, entre las que se cuentan grandes cantidades de complejos de proteína-RNA. Una vez eliminada esta envoltura, en las electromicrografías se puede observar que cada cromátida está organizada en bucles de cromatina que proceden de un esqueleto central (**Figura 4–71**). Los experimentos de hibridación de DNA para detectar secuencias específicas, demuestran que el orden en el que aparecen determinadas características visibles de un cromosoma mitótico refleja, aproximadamente, el orden de los genes a lo largo de la molécula de DNA. La condensación de los cromosomas mitóticos puede ser considerada como el último nivel en la jerarquía del empaquetamiento del cromosoma (**Figura 4–72**).

El empaquetamiento de la cromatina durante la mitosis es un proceso altamente organizado y dinámico que como mínimo tiene dos funciones. Primero, cuando la condensación es completa (metafase), las cromátidas hermanas se han desenredado unas de otras y quedan una al lado de la otra. De esta forma las cromátidas hermanas pueden individualizarse fácilmente cuando el aparato mitótico empieza a separarlas. Segundo, el empaquetamiento de los cromosomas protege las frágiles moléculas de DNA de que se rompan a medida que se van separando de las cromátidas hermanas.

La condensación de los cromosomas interfásicos para convertirse en cromosomas mitóticos empieza en los estadios tempranos de la fase M y es un proceso íntimamente asociado a la progresión de la célula a través del ciclo, como se describirá con más detalle en el Capítulo 17. Durante la fase M, la expresión génica se detiene y se realizan modificaciones específicas en las histonas que ayudan a reorganizar la cromatina a medida que se compacta. El empaquetamiento es asistido por un tipo de proteínas denominadas *condensinas*, las cuales utilizan la energía procedente de la hidrólisis del ATP y colaboran en el plegado de las dos moléculas de DNA de cada uno de los cromosomas interfásicos, convirtiéndolas en las dos cromátidas de un cromosoma mitótico. Las condensinas son grandes complejos proteicos que contienen dímeros de proteína SMC: estos dímeros se forman cuando dos monómeros enrollados y largos se unen por sus extremos dando lugar a una bisagra, dejando dos dominios globulares en los otros dos extremos a través de los cuales se unen al DNA e hidrolizan ATP (**Figura 4–73**). Cuando se añaden condensinas al DNA purificado, se pueden generar largos bucles dextrógiros en las moléculas de DNA utilizando la energía procedente de la hidrólisis del ATP. Aunque no está muy claro cómo actúan sobre la cromatina, el modelo de enrollamiento mostrado en la Figura 4–73C se basa en el hecho de que las condensinas son los componentes estructurales mayoritarios que terminan en el eje de los cromosomas metafásicos, con cerca de una molécula de condensina por cada 10.000 nu-



Figura 4–71 Electromicrografía de barrido de una región cercana a un extremo de un cromosoma mitótico típico. Parece que cada protuberancia representa la parte superior de un dominio en forma de bucle. Hay que destacar que es posible diferenciar claramente las dos cromátidas hermanas (dibujadas en la Figura 4–70). (De M.P. Marsden y U.K. Laemmli, *Cell* 17: 849-858, 1979. Con la autorización de Elsevier.)

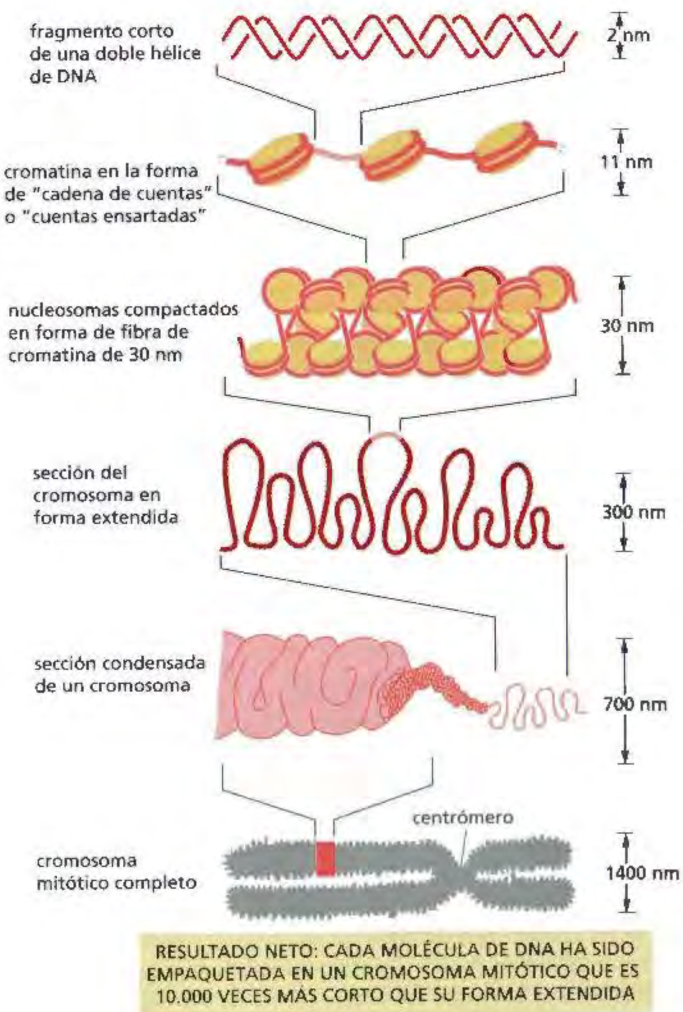


Figura 4–72 Modelo del empaquetamiento de la cromatina. Este modelo muestra algunos de los muchos grados de empaquetamiento de la cromatina que se han postulado para explicar el elevado grado de empaquetamiento del cromosoma mitótico.

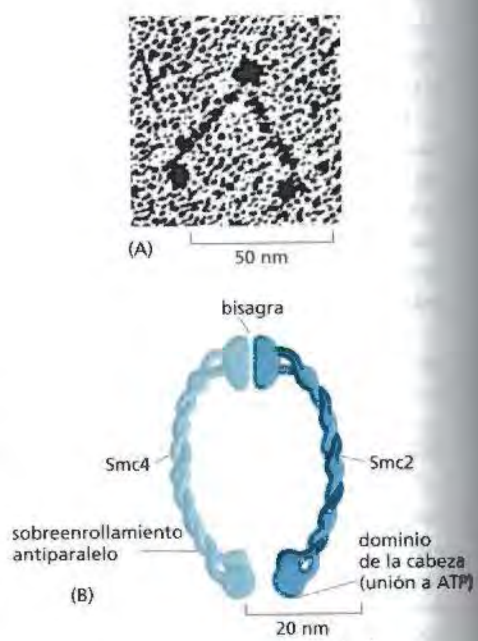
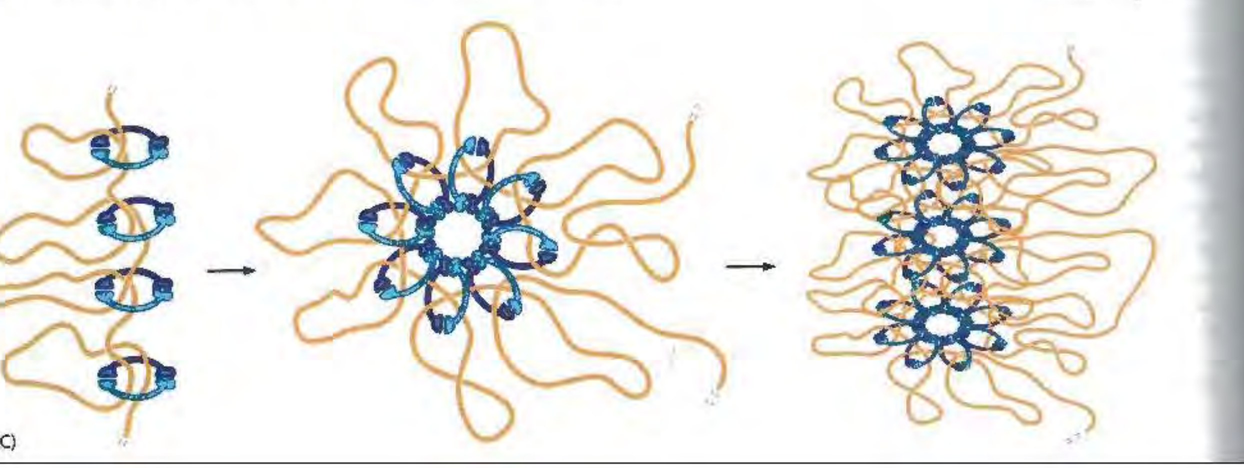


Figura 4–73 Proteínas SMC en las condensinas. (A) Electromicrografía de un dímero SMC purificado. (B) Estructura de un dímero SMC. Su larga región central está formada por dos cadenas antiparalelas y está sobreenrollada (véase la Figura 3-9), con un dominio central que actúa como una bisagra flexible. (C) Modelo sobre cómo podrían compactar la cromatina las proteínas SMC de las condensinas. En realidad, las proteínas SMC son componentes de un complejo mayor de condensina. Se ha propuesto que en la célula las condensinas enrollan una larga ristra de dominios de bucles de cromatina (véase la Figura 4–57). Así, las condensinas formarían una red que mantendría el DNA en un estado altamente organizado durante la metafase del ciclo celular. (A, por cortesía de H.P. Erickson; B y C, adaptadas de T. Hirano. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:311-322, 2006. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)



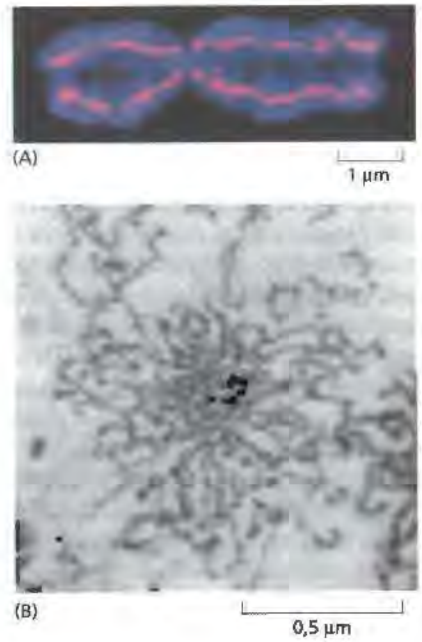


Figura 4–74 **Localización de la condensina en cromosomas mitóticos condensados.** (A) Micrografía fluorescente de un cromosoma humano en mitosis, teñido con un anticuerpo que reconoce la condensina. En los cromosomas altamente condensados, la condensina se observa concentrada en estructuras punteadas a lo largo de su eje. Experimentos similares a éste muestran una localización similar para la topoisomerasa II del DNA, una enzima que hace reversibles las roturas de la doble hélice de DNA que permiten que una doble hélice de DNA pase a través de la otra (véase la Figura 5-23). (B) La microscopía electrónica con anticuerpos marcados con oro coloidal revela la localización de la condensina (*manchas negras*). Se muestra una cromátida en sección transversal, con el eje del cromosoma perpendicular al plano de la hoja (A, de K. Maeshima y U.K. Laemmli, *Dev. Cell* 4:467-480, 2003. Con la autorización de Elsevier. B, por cortesía de U.K. Laemmli, de K. Maeshima, M. Eltsov y U.K. Laemmli, *Chromosoma* 114:365-375, 2005. Con la autorización de Springer.)

[illegible] de DNA (**Figura 4–74**). Cuando las condensinas se eliminan experimentalmente [illegible] célula, la condensación cromosómica sigue produciéndose, pero el proceso no se [illegible] con normalidad.

[illegible]umen

[illegible]omas se descondensan generalmente durante la interfase, de forma que es difícil visuali[illegible] detalles de su estructura. Existen notables excepciones como los especializados cromosomas [illegible] de los oocitos de vertebrados o los cromosomas politénicos de células secretoras gigan[illegible]. Los estudios de ambos tipos de cromosomas interfásicos sugieren que cada una de las [illegible] moléculas de DNA de un cromosoma está dividida en un gran número de dominios discretos [illegible] en bucles de cromatina y cada bucle está constituido por un fragmento de fibra de cro[illegible] plegada de 30 nm. Cuando los genes contenidos en un bucle se expresan, el bucle se desem[illegible] permitiendo que la maquinaria celular tenga un acceso fácil al DNA.

[illegible] cromosomas interfásicos ocupan territorios discretos en el núcleo celular, es decir, por lo ge[illegible]n entrelazadas. La eucromatina constituye la mayor parte de los cromosomas interfá[illegible]do no se está transcribiendo, probablemente se encuentra en forma de fibras de 30 nm [illegible] plegadas. Sin embargo, la eucromatina está interrumpida por extensiones de hetero[illegible], en las cuales las fibras de cromatina de 30 nm están sometidas a plegamientos adicio[illegible] empaquetamiento que generalmente hacen que estas regiones sean resistentes a la [illegible] de sus genes. La heterocromatina se encuentra en formas distintas, algunas de las cuales [illegible] grandes bloques dentro y alrededor de las centrómeros y de los telómeros. Pero la hetero[illegible] también está presente en muchas otras posiciones de los cromosomas y puede regular ge[illegible]tes del desarrollo.

[illegible]or del núcleo es muy dinámico, con la heterocromatina situada con frecuencia cerca de [illegible] nuclear y con los bucles de cromatina desplazándose más allá de su territorio cromosó[illegible] los genes están siendo expresados. Este hecho refleja la existencia de subcompartimien[illegible] que facilitan diferentes conjuntos de reacciones bioquímicas debido al incremento en la [illegible]n de determinadas proteínas y RNA. Los componentes implicados en la formación de [illegible]mientos pueden autoensamblarse y formar orgánulos discretos como los corpúsculos de [illegible]n pueden estar enganchados a estructuras como la envoltura nuclear.

[illegible] la mitosis, la expresión génica se detiene y todos los cromosomas adquieren una con[illegible]amente condensada, a través de un proceso que empieza al principio de la fase M y que [illegible] las dos moléculas de DNA, de cada cromosoma replicado, como dos cromátidas plega[illegible]do. Este proceso se acompaña de la modificación de histonas que facilita el empa[illegible] de la cromatina. Sin embargo, para completar satisfactoriamente este proceso [illegible] reduce en diez veces la distancia entre los extremos de cada molécula de DNA inter[illegible] requiere la participación de las condensinas.

[illegible] EVOLUCIONAN LOS GENOMAS

[illegible]tulo hemos descrito la estructura de los genes y cómo se empaquetan y orde[illegible] cromosomas. En esta última sección describimos algunas de las formas en las [illegible] y los genomas han evolucionado a lo largo del tiempo, dando lugar a la am[illegible] de formas de vida actuales de nuestro planeta. La secuenciación de los ge-

nomas ha revolucionado nuestra visión de la evolución molecular, desvelando una enorme riqueza de información sobre las relaciones de parentesco entre organismos y mecanismos de evolución.

Probablemente no sea sorprendente que puedan encontrarse genes con funciones similares en una amplia variedad de seres vivos. No obstante, la gran revelación de los últimos 25 años ha sido el descubrimiento de que la secuencia de nucleótidos actual de muchos genes se halla lo suficientemente bien conservada como para que a lo largo de grandes distancias filogenéticas se puedan reconocer genes **homólogos**, es decir, genes cuya función y secuencia de nucleótidos es similar debido a que proceden de un ancestro común. Por ejemplo, resulta fácil detectar genes homólogos inequívocos de muchos genes humanos, en organismos como nematodos, moscas de la fruta, levaduras e incluso bacterias. En muchos casos el parecido es tan grande, que la parte de un gen de la levadura que codifica la proteína puede ser sustituida por su homóloga humana –incluso cuando nosotros y las levaduras estamos separados por más de mil millones de años de historia evolutiva.

Como se describe en el Capítulo 3, la identificación de homologías de secuencia se ha convertido en una herramienta importante para inferir la función de un gen o de una proteína. Pese a que hallar dicha homología de secuencia no garantiza que la función sea similar, se ha demostrado que proporciona un excelente indicio. Así, a menudo se puede predecir la función de los genes en humanos de los que no se dispone de información bioquímica o genética, sencillamente comparando sus secuencias con las de otro organismo.

Por lo general las secuencias de los genes están mucho más conservadas que la estructura global del genoma. Como ya indicamos las características de la organización del genoma, como son su tamaño, su número de cromosomas, el orden de los genes dentro de los cromosomas, la abundancia y el tamaño de los intrones y la cantidad de DNA repetitivo, pueden ser muy distintos entre organismos, como de hecho lo es el número de genes que contienen.

El número de genes se correlaciona sólo de forma muy aproximada con la complejidad fenotípica de un organismo (véase la Tabla 1–1). Una gran parte del aumento del número de genes que se produce con el aumento de la complejidad biológica se debe a la expansión de familias de genes estrechamente relacionados entre sí, observación que establece que la duplicación génica y la divergencia han sido procesos evolutivos importantes. Así, es probable que todos los genes actuales sean descendientes –vía procesos de duplicación, divergencia y reagrupación de segmentos de genes– de unos cuantos genes ancestrales que existieron en las formas de vida primitivas.

Errores en los mecanismos normales de copia y mantenimiento del DNA provocan alteraciones del genoma

Las células germinales no tienen mecanismos especializados para dar lugar a cambios en la estructura de sus genomas: la evolución depende de accidentes y de errores seguidos de la supervivencia no aleatoria. Muchos de los cambios genéticos que tienen lugar son simplemente el resultado de errores en los mecanismos normales mediante los cuales los genomas se copian o se reparan cuando se han dañado, aunque el desplazamiento de DNA transponible también desempeña un papel importante. Como se describirá en el Capítulo 5, los mecanismos que mantienen las secuencias de DNA son muy precisos –pero no son perfectos. Por ejemplo, debido a los elaborados mecanismos de replicación y de reparación del DNA que permiten que se hereden las secuencias del DNA con extraordinaria fidelidad, a lo largo de una línea de descendencia sólo cambian al azar aproximadamente un par de nucleótidos de cada mil nucleótidos, cada millón de años. Aún más, en una población de unos 10.000 individuos diploides, cada posible sustitución de nucleótidos habrá sido "probada" unas 20 veces a lo largo de un millón de años –un corto periodo de tiempo en relación con la evolución de las especies.

Los errores en la replicación, recombinación o reparación del DNA pueden llevar simplemente a cambios en la secuencia del DNA –como la sustitución de un par de bases por otro– o a reorganizaciones a gran escala de genomas como eliminaciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones de DNA de un cromosoma a otro. Además de estos errores en la maquinaria genética, los diversos elementos de DNA móvil que se describirán en el Capítulo 5 son una fuente importante de cambio del genoma (véase la Tabla 5–3, p. 318). Los elementos transponibles de DNA (*transposones*) son secuencias de DNA parásito que colonizan un genoma y que se propagan dentro de él. Durante este proceso, a menudo alteran la

...ión o la regulación de genes existentes. Algunas veces incluso dan lugar a nuevos genes mediante fusiones entre secuencias de los transposones y segmentos de genes existentes. Durante largos periodos de tiempo en la evolución, estos transposones han afectado profundamente la estructura de los genomas. En realidad, cerca de la mitad del DNA del genoma humano tiene similitudes de secuencia reconocibles en transposones conocidos, lo cual indica que estas secuencias son remanentes de antiguos episodios de transposición (véase la Figura 4–17). Además, no hay duda de que nuestro genoma deriva de sucesos de transposición que ocurrieron hace tanto tiempo (más de 10^8 años) que las secuencias no se pueden ... hasta los transposones que las originaron.

Las secuencias de los genomas de dos especies difieren de forma proporcional al tiempo durante el cual han evolucionado por separado

Las diferencias entre los genomas de las especies actuales se han acumulado durante más de ... millones de años. A falta de información directa sobre los cambios que se han producido a lo largo del tiempo, podemos reconstruir el proceso de evolución de los genomas comparando detalladamente el genoma de los organismos contemporáneos.

La herramienta básica de la genómica comparativa es el árbol filogenético. Un ejemplo ... es el árbol que describe la divergencia de los humanos a partir de los primates superiores (Figura 4–75). La evidencia primaria para este árbol procede de la comparación de secuencias de genes o de proteínas. Por ejemplo, las comparaciones entre secuencias de genes o proteínas de humanos y de primates superiores revelan que las diferencias más pequeñas ... entre humanos y chimpancés y las más grandes entre humanos y orangutanes.

Para organismos estrechamente relacionados como humanos y chimpancés, es relativamente fácil reconstruir las secuencias génicas del ancestro común, ya extinguido, de ambas especies (**Figura 4–76**). La gran similitud entre los genes de humanos y de chimpancés se debe principalmente al poco tiempo durante el cual se han ido acumulando mutaciones en los dos linajes divergentes, más que a limitaciones funcionales que hayan mantenido las secuencias iguales. Esta tesis se apoya en la observación de que incluso las secuencias de ... cuyo orden en nucleótidos no tiene ninguna limitación funcional –como las secuencias que codifican los fibrinopéptidos (véase la p. 264) o de la tercera posición de codones "sinónimos" (codones que especifican un mismo aminoácido; véase la Figura 4–76)– son aproximadamente idénticas en humanos y chimpancés.

Para organismos relacionados menos estrechamente, como los humanos y los pollos (que han evolucionado de forma separada durante unos 300 millones de años), la conservación de secuencia hallada en los genes se debe principalmente a una **selección purificadora** (es decir, la selección que elimina a los individuos portadores de mutaciones que interfieren con funciones genéticas importantes) más que a la falta de tiempo suficiente para que se den mutaciones. En consecuencia, las secuencias codificantes de proteínas, las ... de RNA y las secuencias reguladoras del DNA se hallan fuertemente conservadas. Por el contrario, la mayoría de secuencias de DNA de los genomas humano y de pollo han divergido tanto debido a muchas mutaciones que a menudo es imposible alinearlas ... la otra.



Figura 4–75 Árbol filogenético que muestra la relación entre los humanos y los grandes simios basada en la secuencia de los nucleótidos. Como se indica, se considera que las secuencias de los genomas de las cuatro especies difieren de la secuencia de su último ancestro común en poco más de un 1,5%. Debido a que los cambios se producen de forma independiente en las dos líneas divergentes, las comparaciones entre dos especies muestran el doble de divergencia de secuencia que la mostrada respecto al ancestro común. Por ejemplo, las comparaciones humano-orangután muestran una divergencia de poco más del 3% mientras que las comparaciones humano-chimpancé muestran una divergencia de aproximadamente el 1,2%. (Modificado de F.C. Chen y W.H. Li, *Am. J. Hum. Genet.* 68: 444-456, 2001. Con la autorización de University of Chicago Press.)

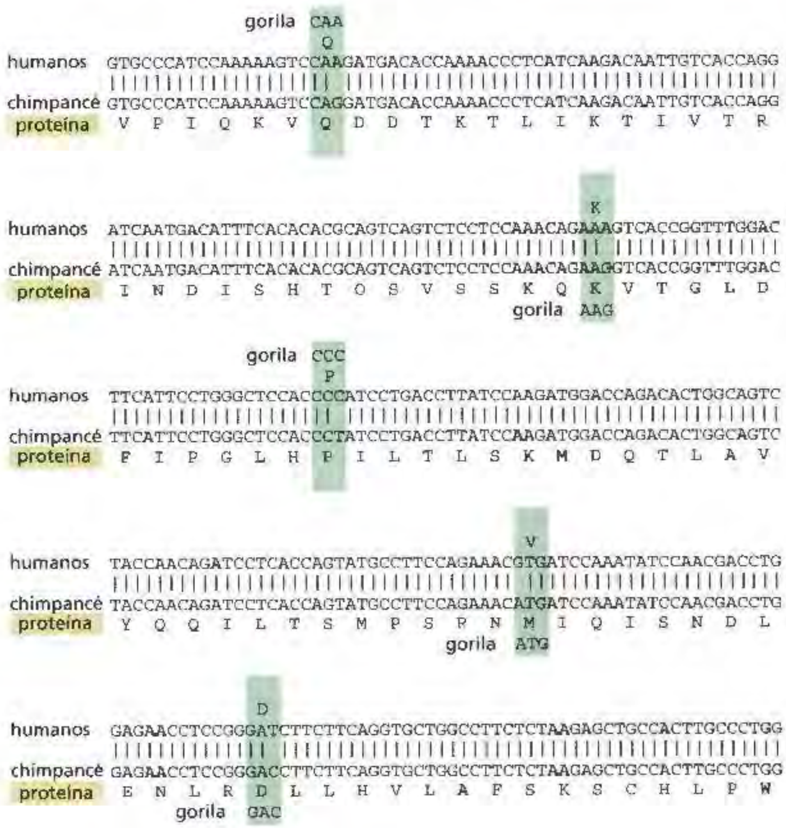


Figura 4–76 Deducción de la secuencia ancestral a partir de la comparación de secuencias de la región codificante de los genes de la leptina en humanos y en chimpancés. La leptina es una hormona que regula la ingestión de alimentos y la utilización de energía en respuesta a los niveles de reserva de grasa. Como se indica mediante los codones sombreados en *verde*, sólo hay 5 nucleótidos (de un total de 441) que difieren entre estas dos secuencias. Además, cuando se examinan las secuencias de aminoácidos codificados por ambas secuencias en humanos y en chimpancés, sólo existen diferencias de aminoácidos en una de las 5 posiciones. También se muestra la secuencia correspondiente del gorila para cada una de las 5 posiciones de nucleótidos que varían. En dos casos, la secuencia del gorila es igual a la de humanos, mientras que en tres casos coincide con la del chimpancé.

¿Cuál era la secuencia de la leptina en el ancestro común? Un modelo evolutivo que intente minimizar el número de mutaciones que deberían haber sucedido durante la evolución de los genes de humanos y chimpancés asumiría que la secuencia de la leptina del último ancestro común es la misma que actualmente tienen humanos y chimpancés cuando esta coincide; cuando no coincide utilizará la secuencia del gorila para el desempate. Para simplificar, sólo se muestran los primeros 300 nucleótidos de las secuencias codificantes de la leptina. Los otros 141 son idénticos entre humanos y chimpancés.

Los árboles filogenéticos construidos a partir de la comparación de secuencias de DNA trazan las relaciones entre los organismos

La integración de los árboles filogenéticos basados en comparaciones de secuencia con el registro fósil ha dado lugar a la mejor imagen de que disponemos sobre la evolución de las formas actuales de vida. El registro fósil sigue siendo importante como fuente de datos absolutos basados en el decaimiento de radioisótopos en las formaciones rocosas en que son hallados los fósiles. No obstante, los tiempos precisos de divergencia entre especies son difíciles de establecer a partir del registro fósil incluso para especies que dejan buenos fósiles con morfología distintiva.

Los árboles filogenéticos integrados sugieren que los cambios en la secuencia de determinados genes o proteínas tienden a ocurrir a una velocidad constante, aunque en linajes concretos se observan velocidades que difieren hasta en más del doble. Como se describe en el Capítulo 5, este "reloj molecular" va más deprisa en secuencias que no están sujetas a selección purificadora –como regiones intergénicas, partes de los intrones que carecen de señales de procesamiento o de regulación y genes que han sido inactivados irreversiblemente debido a mutaciones (los denominados pseudogenes). El reloj va más despacio para secuencias que están sujetas a fuertes limitaciones funcionales –por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de proteínas como la actina que están involucradas en interacciones específicas con gran número de otras proteínas y cuya estructura, por tanto, está condicionada en gran medida (véase, p. ej., la Figura 16–18).

En ocasiones, en una secuencia muy conservada se observa un cambio rápido. Como se explicará más adelante en este capítulo, estos episodios son especialmente interesantes porque parece que reflejan periodos de fuerte selección positiva para mutaciones que confieren una ventaja selectiva en el linaje concreto en el que se produce el cambio rápido.

Los relojes moleculares corren a velocidades que están determinadas tanto por la velocidad de mutación como por el grado de selección purificadora de una secuencia particular. Por tanto, se requiere una calibración distinta para genes que se replican o se reparan mediante sistemas celulares distintos. Cabe destacar que en animales, pero no en plantas, los relojes basados en secuencias de nucleótidos del DNA mitocondrial sin condicionantes funcionales van mucho más deprisa que los relojes basados en secuencias nucleares sin condi-

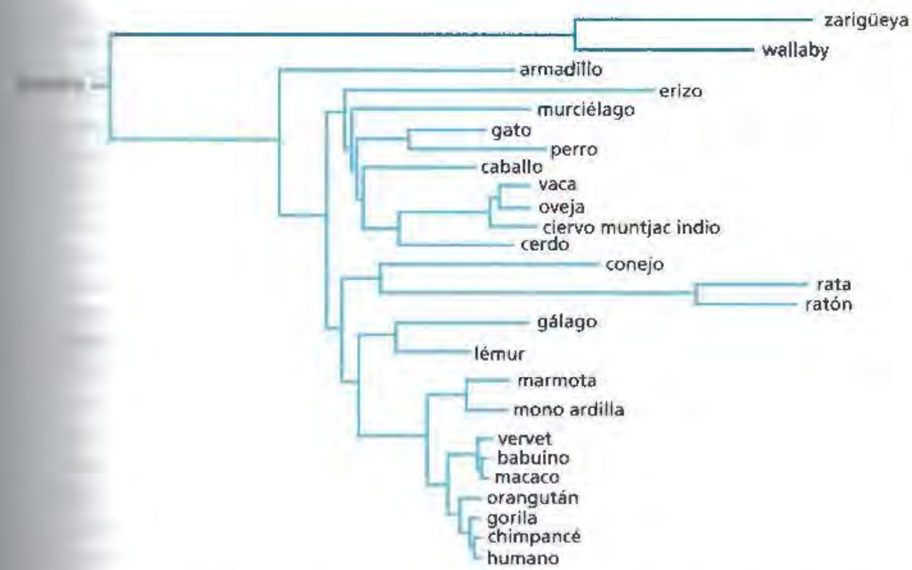


Figura 4–77 **Árbol filogenético resaltando algunos de los genomas de mamíferos que están siendo estudiados extensamente.** La longitud de cada línea es proporcional al número de "sustituciones neutras" –representan los cambios de nucleótidos observados en ausencia de selección purificadora. (Adaptado de G.M. Cooper et al., *Genome Res.* 15:901-913, 2005. Con la autorización de Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

funcionales, debido a la elevada velocidad de mutación en la mitocondria de los

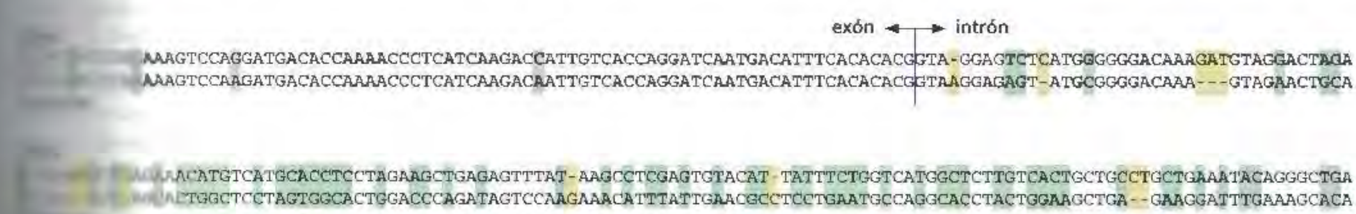
relojes moleculares tienen una resolución temporal mejor que el registro fósil y son más fiable para establecer con detalle la estructura de los árboles filogenéticos, que los clásicos de construccinnes de árboles basados en la comparación de morfología llo en especies distintas. Por ejemplo, la relación precisa entre las líneas de los pri- superiores y los humanos no fue establecida hasta que en la década de 1980 se acu- suficientes datos moleculares de secuencia como para establecer el árbol mostrado 4–75. En la actualidad con las enormes cantidades de secuencias de DNA deter- de una variedad de mamíferos, se han obtenido mejores estimaciones de nuestra con ellos (**Figura 4–77**).

...rando los cromosomas de humanos y de ratones se observa ... manera divergen las estructuras de los genomas

previsible, el genoma humano y el del chimpancé son mucho más parecidos en- el genoma humano y el de ratón. Pese a que el tamaño del genoma del ratón es mente igual y contiene casi los mismos conjuntos de genes, ha transcurrido mu- mpo durante el cual se han podido ir acumulando cambios –cerca de 80 millones pecto a 6 millones de años. Además, como se indica en la Figura 4–77, los linajes (representados por la rata y el ratón) tienen relojes moleculares muy rápidos. estos linajes han divergido del humano más rápidamente de lo que sería de es-

muestra en la comparación de secuencia del DNA de la **Figura 4–78**, la muta- lugar a una extensa divergencia de secuencia entre humanos y ratones en tos que no se hallan afectados por la selección –como las secuencias de nucleó- intrones. Por el contrario, en las comparaciones entre humanos y chimpancés, posiciones de las secuencias son las mismas, simplemente porque no ha pasa- tiempo, desde el último antecesor común, para producirse muchos cambios. de lo que sucede entre humanos y chimpancés, el orden local de los genes de la organización del cromosoma han divergido mucho entre humanos y ra-

Figura 4–78 **Comparación de un fragmento del gen de la leptina en ratón y en humanos.** Las posiciones en las que las secuencias difieren en un solo nucleótido se muestran en *verde*; las posiciones que difieren debido a la adición o deleción de nucleótidos se muestran en *amarillo*. Nótese que la secuencia codificante del exón está mucho mejor conservada que la secuencia del intrón adyacente.



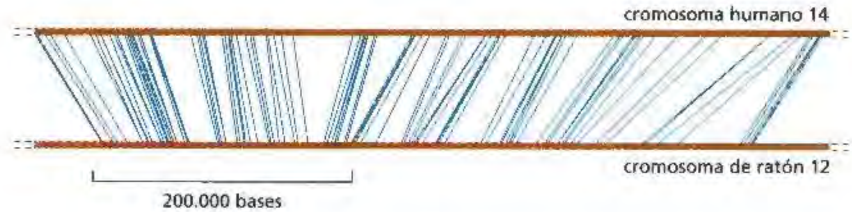


Figura 4–79 Comparación de una porción sinténica del genoma humano y de ratón. Alrededor de un 90 por ciento de los dos genes puede alinearse de este modo. Obsérvese que mientras que existe un orden idéntico de las secuencias marcadas (*rojo*), en el linaje del ratón ha habido una pérdida neta de DNA a lo largo de toda la región. Este tipo de pérdida neta es típica de este tipo de regiones y explica por qué el genoma del ratón contiene un 14 por ciento menos de DNA que el de humanos. (Adaptado de Mouse Sequencing Consortium, *Nature* 420:520-573, 2002. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

tones. Según estimaciones aproximadas, en las líneas de humanos y ratones han tenido lugar un total de unos 180 sucesos de rotura y unión desde que ambas especies compartieron por última vez un ancestro común. Durante este proceso, pese a que el número de cromosomas es similar en las dos especies (23 por genoma haploide en humanos respecto a 20 en el ratón) su estructura global difiere considerablemente. No obstante, pese al extenso reordenamiento de los genomas, existen grandes bloques de DNA en los que el orden de los genes es el mismo en humanos y ratones. Estas regiones de conservación del orden de los genes en los cromosomas son denominados bloques de *sintenia*.

Una conclusión inesperada que aparece de la comparación detallada entre la secuencia completa del genoma humano y el del ratón, y confirmada por las comparaciones posteriores realizadas entre genomas de otros vertebrados, es que se han eliminado y añadido pequeños bloques de secuencias a los genomas a una velocidad sorprendentemente rápida. De este modo, si asumimos que nuestro antecesor común tenía un genoma del tamaño humano (unos tres mil millones de pares de nucleótidos), los ratones tienen que haber perdido en total cerca del 45 por ciento de este genoma por la acumulación de eliminaciones durante los últimos 80 millones de años, mientras que los humanos tienen que haber perdido un 25 por ciento. Sin embargo, estas pérdidas se han compensado mediante las ganancias sustanciales de muchas secuencias de pequeñas duplicaciones cromosómicas y de la multiplicación de transposones. Como resultado de ello, el tamaño de nuestro genoma no ha cambiado en comparación con el del último antecesor común para humanos y ratones, mientras que el genoma del ratón es menor en sólo 300 millones de nucleótidos.

La comparación detallada entre el genoma humano y el de ratón de la mayoría de regiones de sintenia ofrece buenas evidencias de la pérdida de secuencias de DNA en pequeños bloques durante la evolución. En estas comparaciones se observa claramente la reducción del genoma del ratón, con la pérdida neta de regiones a lo largo de largas regiones de DNA que por otro lado son homólogas (**Figura 4–79**).

El DNA se añade a los genomas mediante la duplicación espontánea de segmentos de cromosoma, que contienen decenas de miles de pares de nucleótidos (como se verá en seguida), y mediante la transposición activa (la mayoría de transposiciones son duplicativas, porque la copia original del transposón sigue estando donde estaba cuando la copia se insertó otro lugar; para un ejemplo, véase la Figura 5–74). Así, la comparación de secuencias derivadas de los transposones en humanos y ratones revela fácilmente algunas de las secuencias añadidas (**Figura 4–80**).

Por motivos desconocidos, todos los mamíferos tienen tamaños de genomas de unos tres mil millones de pares de nucleótidos que contienen conjuntos de genes prácticamente idénticos, aunque parece que únicamente unos 150 millones de pares de nucleótidos están bajo restricciones funcionales específicas de secuencia.

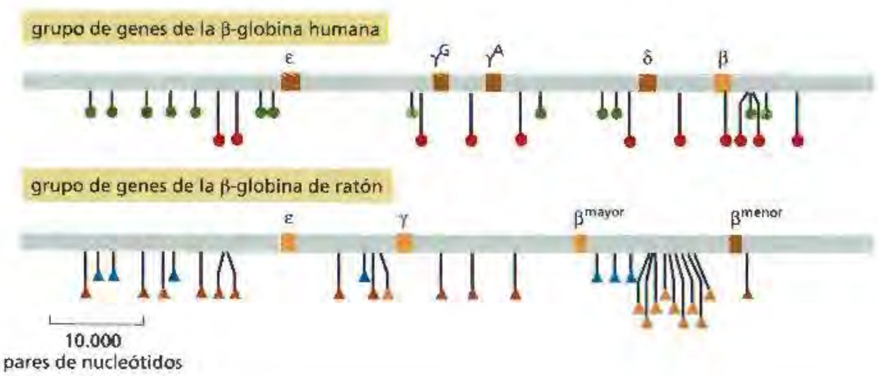


Figura 4–80 Comparación del grupo de genes de la β-globina entre los genomas de humanos y de ratones, mostrando la localización de elementos transponibles. Esta región del genoma humano contiene cinco genes funcionales del tipo de la β-globina (*naranja*); la región comparable en el genoma de ratón sólo tiene cuatro. Las posiciones de la secuencia Alu se indican con círculos verdes, y las secuencias L1 con círculos rojos. El genoma de ratón contiene elementos transponibles distintos pero relacionados: las posiciones de los elementos B1 (relacionados con las secuencias Alu humanas) se indican mediante *triángulos azules* y las secuencias de los elementos L1 de ratón (relacionados con las secuencias L1 humanas) se indican mediante *triángulos naranja*. La ausencia de elementos transponibles en los genes estructurales de la globina puede atribuirse a la selección purificadora, que habría eliminado cualquier inserción que pusiera en peligro la función génica. (Cortesía de Ross Hardison y Webb Miller.)

El tamaño del genoma de un vertebrado refleja las velocidades relativas de adición y pérdida de DNA de un linaje

Ahora que conocemos la secuencia completa del genoma de numerosos vertebrados, vemos que el tamaño del genoma puede variar en gran medida, aparentemente sin un efecto drástico sobre el organismo o sobre su número de genes. De este modo, mientras que los genomas del ratón y del perro están en el rango típico de tamaño de los mamíferos, el pollo tiene un genoma que tiene un tamaño que solamente es de cerca de un tercio del tamaño del genoma humano (un millón de pares de nucleótidos). Un ejemplo notable de un organismo con un genoma de tamaño anómalo es el pez globo (*Fugu rubripes*, **Figura 4–81**), que es extraordinariamente pequeño para ser un vertebrado (400 millones de pares de nucleótidos en comparación con los 1000 millones o más de muchos otros peces). El pequeño tamaño de genoma del *Fugu* se debe casi por completo al pequeño tamaño de sus intrones. En concreto, los intrones del *Fugu* así como otros segmentos no codificantes de su genoma carecen del DNA repetitivo que constituye la mayor parte de los genomas de los vertebrados mejor estudiados. No obstante, las posiciones de los intrones del *Fugu* están conservadas de forma prácticamente idéntica respecto a su posición en los genomas del resto de los mamíferos (**Figura 4-82**).

A pesar de que inicialmente constituyó un enigma, ahora disponemos de una sencilla explicación para estas grandes diferencias en el tamaño del genoma entre organismos similares. Debido a que todos los vertebrados experimentan un proceso continuo de pérdida y adición de DNA, el tamaño de un genoma depende del balance entre estos dos procesos opuestos actuando durante millones de años. Supongamos, por ejemplo, que en el pez *Fugu* la velocidad de adición de DNA sucedió muy lentamente. Durante largos periodos de tiempo, esto resultaría en una mayor "limpieza" de su genoma de secuencias de DNA cuya pérdida pudiera ser tolerada. En retrospectiva, el proceso de purificación selectiva que se ha producido en el linaje del pez *Fugu* ha recogido las secuencias de DNA de los vertebrados que es más probable que sean funcionales, en un DNA de sólo 400 millones de pares de nucleótidos, proporcionando a los científicos un importante recurso de estudio.



Figura 4–81 El pez globo *Fugu rubripes*. (Cortesía de Byrappa Venkatesh.)

Podemos reconstruir la secuencia de algunos genomas antiguos

Los genomas de los organismos ancestrales se pueden inferir pero nunca observar directamente: no existen organismos ancestrales vivos en la actualidad. Pese a que un organismo actual como el cangrejo de herradura se parece muchísimo a sus ancestros fósiles que vivieron hace 200 millones de años, todo indica que el genoma del cangrejo de herradura debe haber evolucionado a lo largo de todo este tiempo a un ritmo similar al de otras líneas evolutivas. Determinados condicionamientos selectivos deben haber mantenido propiedades funcionales clave del genoma del cangrejo de herradura que expliquen la estabilidad morfológica de toda la línea. Sin embargo, las secuencias genómicas indican que la fracción del genoma sujeta a selección purificadora es pequeña; por tanto el genoma de un cangrejo de herradura actual debe ser muy distinto al de sus ancestros ya extinguidos y que conocemos sólo gracias al registro fósil.

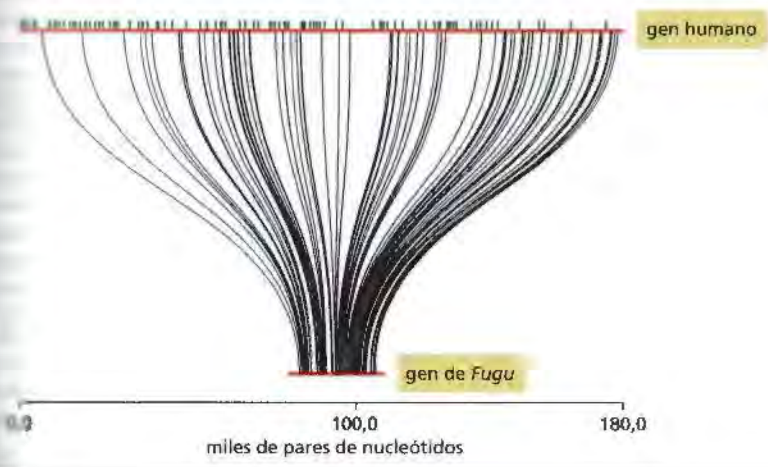


Figura 4–82 Comparación de las secuencias de los genes que codifican la huntingtina en humanos y en *Fugu*. Ambos genes (indicados en *rojo*) contienen 67 exones cortos que se alinean 1:1 uno respecto al otro; estos exones están conectados mediante líneas curvas. El gen humano es 7,5 veces más grande que el gen *Fugu* (180.000 respecto a 27.000 pares de nucleótidos). La diferencia se debe a que los intrones del genoma humano son más grandes. El tamaño más grande de los intrones humanos se debe a la presencia de retrotransposones, cuyas posiciones se representan mediante *líneas verdes verticales*; los intrones de *Fugu*, en cambio, carecen de retrotransposones. En humanos, la mutación del gen de la huntingtina causa la denominada enfermedad de Huntington, una enfermedad neurodegenerativa hereditaria. (Adaptado de S. Baxendale et al. *Nat. Genet.* 10: 67-76, 1995. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

¿Existe algún modo de abordar con éxito este problema? ¿Podemos esperar llegar a descifrar grandes secciones del genoma de los antecesores extinguidos de los organismos vivos actuales? Para organismos estrechamente relacionados como los humanos y los chimpancés, hemos visto que este objetivo no debería resultar difícil de obtener. En este caso, se puede utilizar la referencia a la secuencia de gorila para clasificar cuáles de las pocas diferencias entre la secuencia de DNA de humanos y de chimpancés fueron heredadas de nuestro antecesor común hace unos 6 millones de años (véase la Figura 4–76). En el caso de un antecesor que haya generado un gran número de organismos vivos actuales diferentes, se pueden comparar las secuencias de DNA de muchas especies simultáneamente para descifrar la secuencia ancestral; este método permite a los científicos trazar secuencias de DNA más lejanas en el tiempo. Por ejemplo, de la secuencia completa del genoma de 20 mamíferos modernos que pronto serán obtenidas, será posible descifrar la mayoría de secuencias genómicas de los mamíferos Boreoeuterianos, de 100 millones de años de edad, que han dado pie a especies tan diversas como el perro, el ratón, el conejo, el armadillo y los humanos (véase la Figura 4–77).

La comparación de secuencias de muchas especies identifica secuencias importantes de DNA de función desconocida

La cantidad masiva de secuencias de DNA que existen actualmente en bases de datos (más de cien mil millones de pares de nucleótidos) constituyen una fuente de información muy importante que los científicos pueden aprovechar con muchos propósitos. Ya hemos mostrado de qué forma puede utilizarse esta información para descifrar los caminos evolutivos que han conducido hasta los organismos modernos. Pero la comparación de secuencias también proporciona muchas pistas sobre cómo funcionan las células y los organismos. Quizás, el descubrimiento más destacable ha sido que, a pesar de que sólo un 1,5% del genoma humano codifica proteínas, cerca del triple de esta cantidad (un total del 5% del genoma –véase la Tabla 4–1, p. 206) se ha conservado en alto grado durante la evolución de los

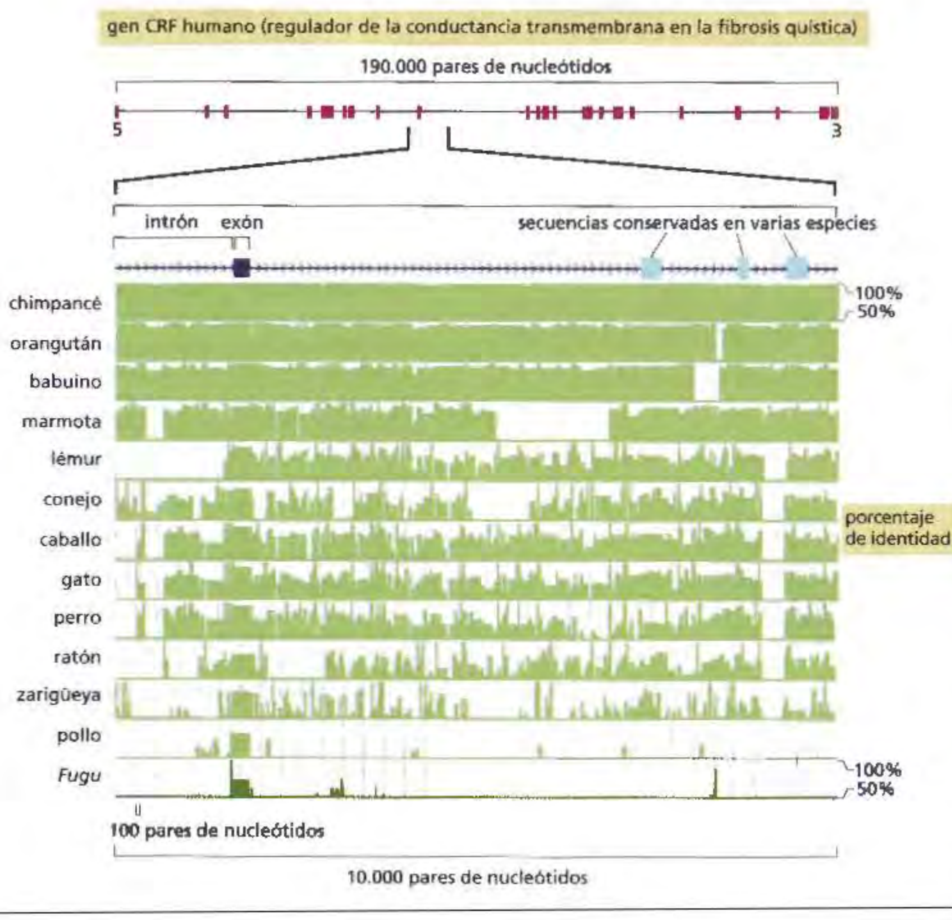


Figura 4–83 Detección de secuencias conservadas en varias especies. En este ejemplo, las secuencias genómicas de cada uno de los organismos mostrados han sido comparadas con la región indicada del gen CFTR humano, escaneado en 25 bloques de nucleótidos. Para cada organismo, el porcentaje de identidad en sus secuencias sinténicas se marca en *verde*. Adicionalmente, se ha utilizado un algoritmo computacional para detectar dentro de esta región las secuencias que están mayoritariamente conservadas cuando se tienen en cuenta las secuencias de todos los organismos. Además del exón, se muestran otros tres bloques de secuencias conservadas en varias especies. En el genoma humano se desconoce la función de la mayoría de estas secuencias. (Por cortesía de Eric D. Green.)

mamíferos. Esta cantidad de secuencias conservadas se hace más evidente cuando alineamos y comparamos los bloques de DNA sinténico de muchas especies diferentes. De este modo se pueden identificar las denominadas *secuencias conservadas en muchas especies* (**Figura 4–83**). La mayoría de las secuencias conservadas no codificantes descubiertas de este modo resultan ser relativamente cortas, ya que contienen entre 50 y 200 pares de nucleótidos. La conservación estricta implica que tienen importantes funciones que se han mantenido mediante selección purificadora. El rompecabezas consiste en desvelar cuáles son estas funciones. Algunas de las secuencias que no codifican proteína, codifican moléculas de RNA que no son traducidas pero que tienen importantes funciones, como veremos en capítulos posteriores. Otra fracción de DNA no codificante conservado está implicado en la regulación de la transcripción de genes adyacentes, como se describe en el Capítulo 7. Pero aún no sabemos qué cantidad de este DNA conservado responde a estas funciones, lo cual sigue constituyendo un gran misterio. La solución a este misterio está ligada a profundas consecuencias para la medicina y revela cuánto necesitamos aprender sobre la biología de los vertebrados.

¿Cómo pueden abordar este problema los biólogos moleculares? El primer paso consiste en distinguir entre las regiones conservadas que codifican proteínas y las que no y luego, de entre estas últimas, centrarse en las que todavía no tienen ninguna función identificada, como podría ser por ejemplo la codificación de moléculas de RNA estructural. La siguiente tarea consiste en descubrir qué proteínas o moléculas de RNA están ligadas a estas secuencias misteriosas de DNA, cómo se empaquetan en la cromatina y si alguna vez se utilizan como molde para la síntesis de RNA. La mayoría de estas tareas todavía están por acabar, pero ya se han empezado y se han obtenido algunos datos relevantes. Uno de los más intrigantes se refiere a los cambios evolutivos que nos han convertido en humanos diferenciados del resto de los animales –esto es, cambios de secuencias que han sido conservadas entre nuestros parientes más cercanos pero que han conllevado cambios súbitamente rápidos en el sublinaje humano.

Los cambios acelerados producidos en secuencias que previamente eran conservadas pueden ayudar a descifrar los pasos críticos de la evolución humana

En cuanto estuvieron disponibles las secuencias del genoma humano y de chimpancé, los científicos empezaron a buscar los cambios de la secuencia de DNA que pudieran dar respuesta a las sorprendentes diferencias entre nosotros y ellos. Con tres mil millones de pares de nucleótidos para comparar en ambas especies, parecería una tarea imposible. Pero el trabajo se realizó limitando la búsqueda a 35.000 secuencias conservadas entre especies, claramente definidas (un total de 5 millones de pares de nucleótidos), que representan zonas del genoma la mayoría de las cuales parecen ser funcionalmente importantes. Aunque estas secuencias están fuertemente conservadas, no están conservadas de forma perfecta, y cuando se compara la versión de una especie con la de otra, por lo general se observa que se han diferenciado en una pequeña cantidad de nucleótidos correspondiente simplemente al tiempo transcurrido desde que ambas especies se han separado del último antecesor común. Sin embargo, en una pequeña proporción de casos, se pueden ver señales de evolución súbita. Por ejemplo, algunas secuencias de DNA altamente conservadas en otros mamíferos han cambiado de una forma muy rápida durante los seis millones de años de evolución humana desde que divergimos: los chimpancés. Parece que estas *regiones humanas aceleradas* (HAR: *human accelerated regions*) reflejan funciones que han sido especialmente importantes, de algún modo útil, en el hecho de hacernos diferentes.

En un estudio centrado en este tema, se identificaron unos 50 sitios de estas características, una cuarta parte de los cuales se localizaron cerca de genes que se asocia al desarrollo neuronal. La secuencia que muestra el cambio más rápido (18 cambios entre los humanos y los chimpancés, en comparación a los sólo 2 cambios que hay entre el chimpancé y el pollo) fue examinada más a fondo y se encontró que codifica un RNA no codificante de 118 nucleótidos que se produce en el córtex cerebral humano durante un momento crítico del desarrollo del cerebro (**Figura 4–84**). Aunque la función de este RNA HAR1F todavía no se conoce con claridad, este extraordinario descubrimiento está provocando la realización de estudios de los que se espera que aporten una información esclarecedora sobre las características cruciales del cerebro humano.

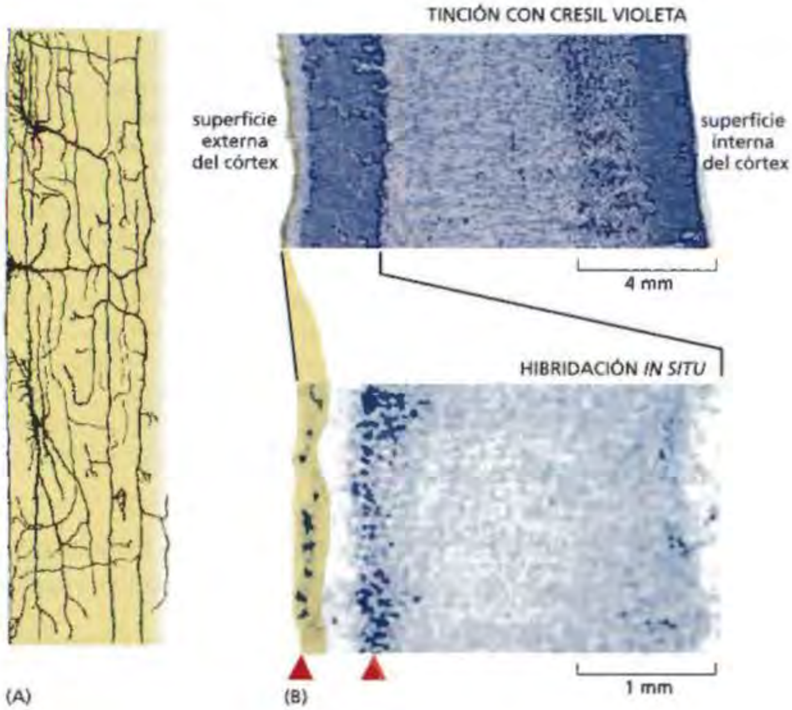


Figura 4-84 Caracterización inicial de un gen nuevo detectado previamente como secuencia de DNA conservada que evolucionó rápidamente en humanos. (A) Dibujo de Ramón y Cajal de la superficie externa del neocórtex humano, resaltando las neuronas de Cajal-Retzius. (B) Cortes de tejido de un cerebro de embrión humano mostrando parte del córtex con la región que contiene las neuronas de Cajal-Retzius resaltada en *amarillo*. Micrografía superior: tinción con cresil violeta. Micrografía inferior: hibridación *in situ*. Las *flechas rojas* indican las células que producen RNA de HAR1F detectado por la hibridación *in situ* (*azul*). HAR1F es un nuevo RNA no codificante que ha evolucionado rápidamente en el linaje humano desde los grandes simios. Las neuronas de Cajal-Retzius fabrican este RNA en el mismo momento en que se desarrolla el neocórtex. Los resultados son enigmáticos, porque es característico de los humanos el poseer un gran neocórtex; véase la Figura 22-99 para el comportamiento celular al formar este córtex. (Adaptado de K.S. Pollard et al., *Nature* 443:167-172, 2006. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

La duplicación génica constituye una importante fuente de novedad genética durante la evolución

La evolución depende de la generación de nuevos genes, así como de la modificación de los ya existentes. ¿Cómo se produce este proceso? Al comparar organismos que parecen muy distintos -por ejemplo, un primate con un roedor, o un ratón con un pez- raramente encontramos genes de una especie que no tengan ningún homólogo en la otra. Los genes sin pareja homóloga son bastante escasos incluso al comparar organismos tan divergentes como un mamífero y un gusano. Por otro lado, frecuentemente encontramos familias de genes que en diferentes especies tienen un número diferente de miembros. Para generar estas familias, los genes han tenido que ser repetidamente duplicados y las copias han tenido que divergir asumiendo nuevas funciones que con frecuencia varían de una especie a otra.

Este punto queda ilustrado con los genes que codifican receptores nucleares de hormonas, en humanos, en un nematodo o en la mosca de la fruta (**Figura 4-85**). Muchos de los subtipos de estos receptores nucleares (también denominados receptores intracelulares) tienen homólogos muy parecidos en los tres organismos, los cuales son mucho más similares entre sí que respecto a otros subtipos presentes dentro de las mismas especies. En consecuencia, la mayor parte de la divergencia en esta familia génica debe haber precedido a la divergencia de estas tres líneas evolutivas. Además, una de las ramas principales de esta familia génica tuvo una enorme expansión sólo en la línea del nematodo. Expansiones específicas de linaje similares, aunque no tan masivas, de subtipos particulares son evidentes a lo largo de todo el árbol de la familia génica.

La duplicación génica parece darse a un ritmo elevado en todas las líneas evolutivas, contribuyendo al vigoroso proceso de adición de DNA. En un estudio detallado de duplicaciones espontáneas en levadura, se observaron duplicaciones de 50.000 a 250.000 pares de nucleótidos, la mayoría de los cuales estaban repetidos en tándem. Esto parecía ser resultado de errores cometidos durante la replicación del DNA que llevaron a la reparación inexacta de roturas en la doble cadena. La comparación de los genomas de humano y de chimpancé revela que desde el momento en que divergieron, la duplicación de segmentos ha añadido unos 5 millones de pares de nucleótidos a cada genoma cada millón de años, con un promedio de tamaño de duplicación de unos 50.000 pares de nucleótidos (sin embargo, hay duplicaciones cinco veces mayores como en la levadura). De hecho, si uno cuenta los nucleótidos, las duplicaciones han generado más diferencias entre nuestras dos especies que las sustituciones puntuales de nucleótidos.

Los genes duplicados divergen

Una importante cuestión en la evolución de los genomas es la que trata del destino de los genes duplicados recientemente. En la mayoría de los casos parece que, al menos inicialmente, es necesaria muy poca (o ninguna) selección para mantener el estado duplicado, ya que cada copia da lugar a una función equivalente. Así, se cree que muchos de los sucesos de duplicación van seguidos de mutaciones de pérdida de función en uno o en el otro gen. Este ciclo restauraría la situación de un solo gen, que precedía a la duplicación. Además existen muchos ejemplos de genomas contemporáneos en los que puede observarse que una copia del gen duplicado ha sido inactivada irreversiblemente mediante varias mutaciones. A lo largo del tiempo, sería esperable que fuera disminuyendo la similitud de secuencias entre este **pseudogén** y el gen funcional cuya duplicación lo generó, debido a la acumulación de varios cambios mutacionales en el pseudogén –pudiendo incluso llegar a ser indetectable.

Un destino alternativo de las duplicaciones génicas es que ambas copias se mantengan funcionales, mientras que sus secuencias y su patrón de expresión vayan divergiendo y adquieran funciones distintas. Este proceso de "duplicación y divergencia" explica, con toda probabilidad, la existencia de amplias familias de genes con funciones relacionadas en organismos complejos y parece que desempeña un papel crucial en la evolución que implica el incremento de la complejidad biológica. El análisis de muchos genomas eucariotas diferentes sugiere que la probabilidad de que cualquier gen concreto pueda sufrir una duplicación, que se extienda a la mayoría o a todos los individuos de la especie, es de aproximadamente un 1% cada millón de años.

Las duplicaciones de todo el genoma ofrecen ejemplos impresionantes del ciclo duplicación-divergencia. Una duplicación del genoma completo puede ocurrir de forma relativamente sencilla: todo lo que se requiere es un ciclo de replicación del genoma en la línea germinal sin la correspondiente división celular. Al inicio, el número de cromosomas aumenta al doble. Estos aumentos súbitos en la ploidía de un organismo son frecuentes, especialmente en hongos y en plantas. Tras una duplicación de todo el genoma, todos los genes existen como copias duplicadas. No obstante, a menos que la duplicación se haya dado tan recientemente que no haya habido tiempo para alteraciones posteriores de la estructura del genoma, el resultado de una serie de duplicaciones de segmentos –sucedidas en distintos momentos– es muy difícil de distinguir del resultado final de una duplicación de todo el genoma. En los mamíferos, por ejemplo, es dudoso el papel que han tenido las duplicaciones del genoma completo respecto a series de duplicaciones parciales de segmentos del DNA. No obstante, es evidente que en el pasado lejano tuvo lugar un elevado nivel de duplicación génica.

El análisis del genoma del pez cebra, que experimentó hace cientos de millones de años una duplicación del genoma completo o un conjunto de duplicaciones parciales más locales, ha proporcionado información adicional sobre los procesos de duplicación y divergencia génicas. Pese a que muchas duplicaciones de genes del pez cebra se han perdido debido a mutaciones, una fracción significativa –probablemente del orden de un 30-50%– ha divergido funcionalmente manteniéndose ambas copias activas. En muchos casos, la diferencia funcional más obvia entre los genes duplicados es que se expresan en distintos tejidos o en distintos estadios del desarrollo (véase la Figura 22–46). Una teoría atractiva para explicar este final supone que se acumulan con rapidez mutaciones ligeramente deletéreas en ambas copias de los genes duplicados. Por ejemplo, una copia puede perder su expresión en un tejido concreto debido a una mutación en un elemento de regulación mientras que la otra copia pierde su expresión en otro tejido. Tras estos sucesos, ambas copias génicas serían necesarias para proporcionar todo el conjunto de funciones que eran cubiertas anterior-

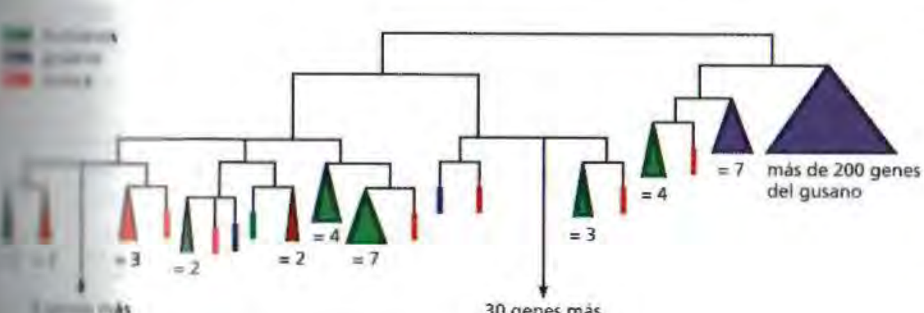


Figura 4–85 Árbol filogenético basado en las secuencias de proteínas inferidas para todos los receptores nucleares codificados por los genomas de humanos (*H. sapiens*), de un gusano nematodo (*C. elegans*) y de la mosca de la fruta (*D. melanogaster*). Los triángulos representan subfamilias proteicas que se han expandido dentro de las líneas evolutivas individuales; la anchura de estos triángulos indica el número de genes que codifican miembros de estas subfamilias. Las barras coloreadas verticales representan un solo gen. No existe ningún patrón sencillo de las duplicaciones históricas y de las divergencias que han dado lugar a las familias génicas que codifican receptores nucleares en los tres organismos contemporáneos. En la Figura 15-14 se describe la familia de receptores nucleares de hormonas. Estas proteínas tienen funciones en la señalización celular y en la regulación génica. (Adaptado del International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* 409, 860-921, 2001. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)



Figura 4–86 Comparación de la estructura de las globinas de una cadena y de cuatro cadenas. La globina de cuatro cadenas que se muestra es la hemoglobina, que es un complejo de dos cadena de α-globina y dos de β-globina. En algunos vertebrados primitivos, la globina de cadena sencilla forma un dímero que se disocia cuando se une al oxígeno, representando una etapa intermedia en la evolución de la globina de cuatro cadenas.

mente por un solo gen, de forma que ambas copias no podrían perderse debido a mutaciones inactivadoras. Durante largos periodos de tiempo, cada copia puede sufrir cambios posteriores mediante los cuales puede adquirir nuevas funciones especializadas.

La evolución de la familia génica de la globina muestra cómo las duplicaciones del DNA contribuyen a la evolución de los organismos

La familia génica de la globina proporciona un buen ejemplo de cómo la duplicación del DNA da lugar a nuevas proteínas, debido a que su historia evolutiva ha sido bien estudiada. Las inequívocas homologías entre las secuencias de aminoácidos y las estructuras de las globinas actuales indican que todas ellas tienen que derivar de un gen ancestral común, aunque en la actualidad algunas de ellas están codificadas por genes diferentes del genoma de los mamíferos.

Podemos reconstruir algunos de los sucesos pasados que dieron lugar a los diferentes tipos de moléculas de hemoglobina transportadoras de oxígeno, mediante el estudio de las distintas formas de esta proteína en organismos situados en distintas posiciones en los árboles filogenéticos. Una molécula como la hemoglobina ha sido necesaria para permitir a los animales pluricelulares adquirir un gran tamaño, ya que los animales grandes no pueden depender de la simple difusión de oxígeno a través de la superficie del cuerpo para oxigenar sus tejidos de forma adecuada. Por lo tanto, en todos los vertebrados y en muchos invertebrados se encuentran moléculas del tipo de la hemoglobina. La molécula transportadora de oxígeno más primitiva en los animales es una cadena polipeptídica de globina de unos 150 aminoácidos que se encuentra en muchos gusanos marinos, insectos y peces primitivos. No obstante, la molécula de hemoglobina de los vertebrados superiores está compuesta por dos tipos de cadenas de globina. Parece ser que hace unos 500 millones de años, durante la evolución de los peces superiores, se dieron una serie de duplicaciones y mutaciones génicas. Estos acontecimientos dieron lugar a dos tipos ligeramente distintos de genes de la globina que, en el genoma de cada individuo, codifican las cadenas α y β de la globina. En los vertebrados superiores actuales cada molécula de hemoglobina está compuesta por dos cadenas α y dos cadenas β (**Figura 4–86**). Los cuatro sitios de unión para el oxígeno en la molécula $\alpha_2\beta_2$ interaccionan entre sí, permitiendo que en la molécula se presente un cambio alostérico cooperativo al unir y liberar oxígeno, lo cual permite a la hemoglobina captar y liberar oxígeno de forma más eficiente que la versión de cadena única.

Más tarde, durante la evolución de los mamíferos el gen de la cadena β aparentemente sufrió duplicación y mutación, dando lugar a una segunda cadena β de la globina que se sintetiza exclusivamente en el feto. La molécula resultante de hemoglobina tiene mayor afinidad por el oxígeno que la hemoglobina de los adultos y favorece así la transferencia de oxígeno de la madre al feto. A continuación, el gen de la nueva cadena de tipo β de la hemoglobina, mutó y se duplicó, dando lugar a dos nuevos genes, ε y γ, de forma que la cadena ε se produce antes durante el desarrollo (formando $\alpha_2\varepsilon_2$) que la cadena γ fetal que forma $\alpha_2\gamma_2$. Más tarde durante la evolución de los primates se produjo una duplicación del gen de la cadena β de adulto dando lugar a la globina δ y así a una forma minoritaria de la hemoglobina ($\alpha_2\delta_2$) presente sólo en los primates adultos (**Figura 4–87**).

Cada uno de los genes duplicados ha sufrido modificaciones debido a mutaciones puntuales que afectan tanto a las propiedades de la molécula final de hemoglobina, como a

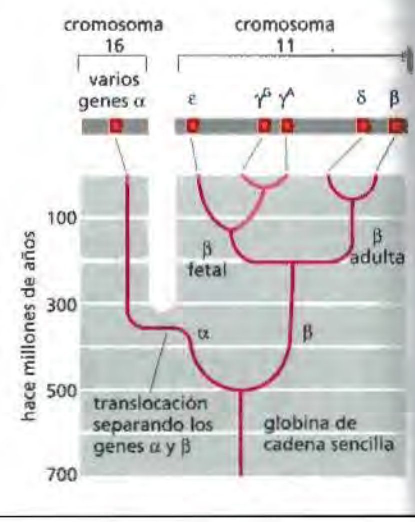


Figura 4–87 Esquema evolutivo de las cadenas de globina transportadoras de oxígeno en la sangre de los animales. El esquema destaca la familia génica de la β-globina. Una duplicación génica relativamente reciente del gen de la cadena γ dio lugar a γ^A y γ^G, que son cadenas del tipo β fetal con una función idéntica. La localización de los genes de la globina en el genoma humano se muestra en la parte superior de la figura (véase también la Figura 7-64).

cambios en las regiones reguladoras que determinan cuándo y a qué nivel se expresará el gen. En consecuencia, cada globina se sintetiza en distinta cantidad en las distintas etapas del desarrollo humano (véase la Figura 7–64B).

El resultado final de los procesos de duplicación génica que han dado lugar a la diversidad de las cadenas de la hemoglobina se ve claramente en los genes humanos que aparecieron a partir del gen β original, los cuales se encuentran como una serie de secuencias de DNA homólogas situadas unas de otras a unos 50.000 pares de nucleótidos de distancia. Un agrupamiento similar de genes de la α-globina está situado en un cromosoma humano distinto. Debido a que los agrupamientos de los genes de la α-globina y de la β-globina se hallan en cromosomas distintos en aves y en mamíferos, pero están juntos en el sapo *Xenopus*, se considera que un suceso de translocación cromosómica separó a los dos agrupamientos de genes hace unos 300 millones de años (véase la Figura 4–87).

Existen varias secuencias de DNA de la globina duplicadas dentro de los agrupamientos génicos de las globinas α y β pero que no constituyen genes funcionales sino pseudogenes. Tienen una gran homología con los genes funcionales pero han sido inactivados por mutaciones que evitan su expresión. La existencia de estos pseudogenes muestra que, como era de esperar, no todas las duplicaciones del DNA dan lugar a un nuevo gen. También sabemos que las secuencias de DNA no funcionales no son eliminadas rápidamente tal y como lo demuestra la gran cantidad de DNA no codificante presente en el genoma de los mamíferos.

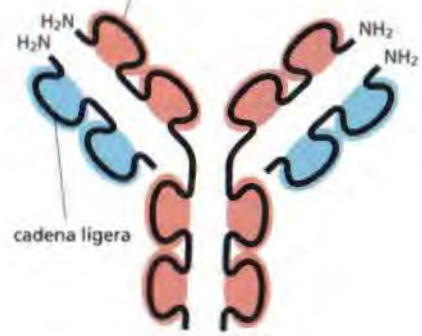


Figura 4–88 Esquema de una molécula de anticuerpo (inmunoglobulina). Esta molécula es un complejo formado por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Cada cadena pesada tiene cuatro dominios similares, unidos de forma covalente, mientras que cada cadena ligera tiene dos de estos dominios. Cada dominio está codificado por un exón distinto, y parece que todos los exones han evolucionado a partir de duplicaciones en serie de un solo exón ancestral.

La recombinación de exones puede dar lugar a genes que codifiquen nuevas proteínas

El papel de la duplicación del DNA en la evolución no está restringido a la expansión de familias génicas. También puede actuar a menor escala generando nuevos genes y colocar juntos cortos segmentos duplicados de DNA. Las proteínas codificadas por genes generados de esta forma pueden ser reconocidos por la presencia de dominios proteicos similares, repetidos, que se encuentran unidos en serie de forma covalente unos a otros. Por ejemplo, las inmunoglobulinas (**Figura 4–88**) y las albúminas, así como la mayoría de proteínas fibrosas (como las colágenas) están codificadas por genes que han evolucionado mediante duplicaciones repetidas de una secuencia de DNA primordial.

En los genes que evolucionaron de esta forma, así como en muchos otros genes, a menudo cada exón codifica una unidad individual de plegamiento de la proteína, llamada dominio. Se considera que la organización de las secuencias codificantes del DNA en series de exones separados por largos intrones ha facilitado mucho la evolución de nuevas proteínas. Por ejemplo, las duplicaciones necesarias para formar un solo gen que codifique una proteína con dominios repetidos pueden darse por rotura y unión posterior en cualquier lugar de los largos intrones a cada lado de un exón; si no hubiese intrones, en el gen original sólo habría unos cuantos sitios en los que el intercambio recombinante entre moléculas de DNA podría duplicar el dominio. Al permitir que se produzca la duplicación mediante recombinación en muchos sitios potenciales y no en unos cuantos, los intrones aumentan la probabilidad de que se dé un suceso de duplicación favorable.

De forma más general, a partir de las secuencias de los genomas sabemos que las partes que componen los genes –tanto cada uno de los exones individuales como sus elementos de regulación– han actuado como elementos modulares que se han duplicado y se han desplazado a lo largo del genoma generando una gran diversidad de seres vivos. Así, muchas proteínas actuales están formadas por un mosaico de dominios a partir de distintas familias de dominios, lo que refleja su larga historia evolutiva (véase la Figura 3–19).

Para que las mutaciones neutras lleguen a ser fijadas, es frecuente que se diseminen por la población; la probabilidad depende del tamaño de la población

Cuando se realizan comparaciones entre dos especies que han divergido una de la otra durante millones de años, resulta poco importante qué individuos de cada especie se comparan. Por ejemplo, las secuencias típicas del DNA de humanos y de chimpancés difieren unas de otras alrededor de un 1%. Por el contrario, cuando la misma región del genoma se analiza en dos humanos distintos, las diferencias acostumbran a ser menores de un 0,1%. Para organismos menos relacionados entre sí, las diferencias entre especies ocultan aún más las

diferencias dentro de una especie. No obstante, cada "diferencia fijada" entre los humanos y el chimpancé (es decir, cada diferencia que actualmente es una característica de todos o de casi todos los individuos de una especie) empezó como una mutación nueva en un individuo concreto. Si el tamaño de la población que se puede entrecruzar en la cual se produce una mutación es N, la frecuencia alélica inicial para una mutación nueva sería $1/2N$ para un organismo diploide. ¿De qué forma una mutación tan poco habitual acaba fijada en la población y pasa a convertirse en una característica de la especie en lugar de una característica particular de un genoma individual?

La respuesta a esta pregunta depende de las consecuencias funcionales de esa mutación. Si la mutación tiene un efecto deletéreo significativo, simplemente será eliminada debido a la acción de la selección purificadora y no será fijada (en el caso más extremo, el individuo portador de la mutación morirá sin dar lugar a progenie). Por el contrario las mutaciones extraordinarias que confieren una importante ventaja reproductiva a los individuos que las heredan, se extenderán rápidamente dentro de la población. Debido a que los humanos se reproducen sexualmente y a que cada vez que se forma un gameto se produce recombinación (descrito en el Capítulo 5), el genoma de cada individuo que ha heredado la mutación será un mosaico recombinatorio único de fragmentos heredados de un gran número de ancestros. La mutación seleccionada junto con una pequeña cantidad de secuencias flanqueantes –heredadas en última instancia del individuo en el que se produjo la mutación– simplemente serán una pieza más de este enorme mosaico.

La gran mayoría de las mutaciones que no son perjudiciales, tampoco son ventajosas. Estas mutaciones selectivamente neutras también pueden diseminarse y fijarse en una población y constituyen una gran contribución al cambio evolutivo de los genomas. Su diseminación no es tan rápida como la de las poco habituales mutaciones fuertemente ventajosas. El proceso mediante el cual se transmite esta variación genética neutra, a lo largo de una población ideal que se entrecruza, puede describirse de forma matemática mediante ecuaciones sorprendentemente sencillas. El modelo ideal que se ha mostrado más útil para el análisis de la variación genética humana asume un tamaño constante de la población, un cruzamiento al azar y la neutralidad selectiva para la mutación. Ninguna de las dos primeras asunciones es una buena descripción de la historia de la población humana, pero proporcionan un punto de partida útil para el análisis de la variación intraespecífica.

Cuando aparece una nueva mutación neutra en una población constante de tamaño N en que se da entrecruzamiento al azar, la probabilidad de que sea finalmente estabilizada es aproximadamente $1/2N$. Para aquellas mutaciones que finalmente sean fijadas, el tiempo promedio de estabilización es aproximadamente $4N$ generaciones. El análisis detallado de los datos de variación genética en humanos sugiere la existencia de una población ancestral con un tamaño de unos 10.000 individuos en la época en que se estableció el patrón de variación genética actual. Con una población de este tamaño, existe una pequeña probabilidad (5×10^{-5}) de que una mutación nueva, selectivamente neutra, sea fijada, mientras que el tiempo medio de esta estabilización sería del orden de 800.000 años (asumiendo un periodo de 20 años por generación). Así, mientras que sabemos que la población humana ha aumentado enormemente desde el desarrollo de la agricultura hace unos 15.000 años, la mayor parte de la variación genética apareció y se estabilizó en la población humana mucho antes, cuando la población humana era aún demasiado pequeña para permitir su diseminación general.

Se pueden aprender muchas cosas a partir del análisis de la variación entre los humanos

Pese a que la mayor parte de la variación existente en los humanos actuales procede de la variación presente en un grupo ancestral relativamente pequeño, el grado de variación encontrado es muy elevado. Una fuente importante de variación que fue olvidada durante muchos años es la presencia de muchas duplicaciones y deleciones de grandes bloques de DNA. Según las estimaciones, cuando se compara cualquier genoma de un individuo humano con el genoma estándar de referencia en una base de datos, se puede esperar encontrar aproximadamente 100 diferencias que involucran grandes bloques de secuencias. Algunas de estas "variaciones del número de copias" serán muy comunes (**Figura 4–89**), mientras que otras sólo estarán presentes en una minoría de humanos (**Figura 4–90**). De una muestra inicial, cerca de la mitad contendrán genes conocidos. Retrospectivamente, este tipo de variación no es sorprendente, dada la larga historia de adición y pérdida de DNA en los genomas de los vertebrados (véase p. ej. la Figura 4–79).

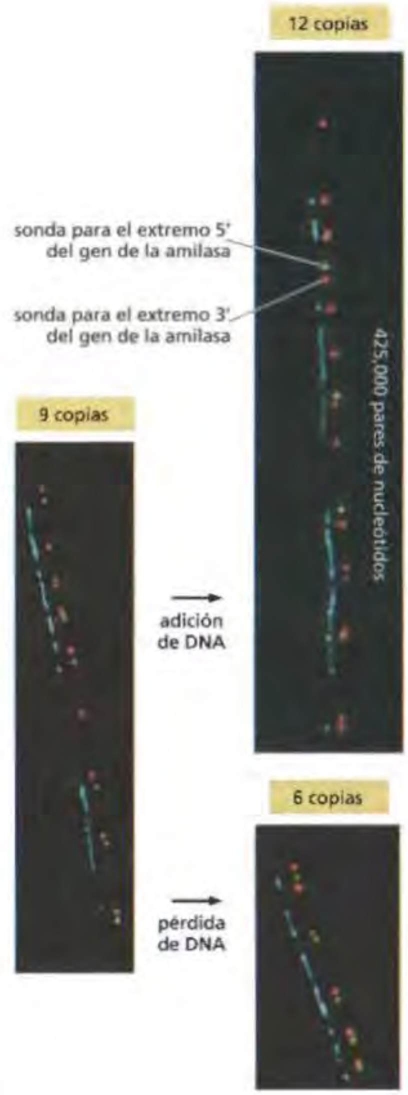


Figura 4–89 Visualización de un tipo de variación frecuente entre los humanos. Cerca de la mitad de los humanos analizados tienen nueve copias del gen de la amilasa (*izquierda*), que produce una importante enzima que digiere los azúcares. En otros humanos, ha ocurrido o bien la pérdida o bien la adición de DNA dando lugar a un cromosoma alterado como resultado de la deleción (pérdida) o de la duplicación (adición) de parte de esta región. Para obtener estas imágenes, las fibras extendidas de cromatina se han hibridado con sondas de los dos extremos del gen de la amilasa coloreadas de modo diferente. Las líneas *azules* indican la disposición general de la cromatina. Han sido determinadas mediante una segunda tinción y desplazadas a un lado para mayor claridad. (Adaptado de A.J. Iafrate et al., *Nat. Genet.* 36:949-951, 2004. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

La mayor parte de la variación intraespecífica que ha sido caracterizada más extensamente son los **polimorfismos de un solo nucleótido** (**SNP**: *single nucleotide polymorphism*). Consisten en puntos simples de secuencia genómica en los que una gran parte de la población posee un nucleótido mientras que otra gran parte tiene otro. Dos genomas humanos tomados como muestras al azar en la población mundial actual diferirán en aproximadamente $2,5 \times 10^6$ sitios (1 de cada 1300 pares de nucleótidos). Como se describirá en la sección genética del Capítulo 8, establecer los sitios del genoma humano que son **polimórficos** –lo que significa que existe una probabilidad razonable (generalmente de más del 1%) de que los genomas de dos individuos difieran en ese sitio– es muy útil para el análisis genético en el cual se pretenda asociar caracteres específicos (fenotipos) a secuencias específicas del DNA con finalidades médicas o científicas (véase p. 560).

En contraste con la base general de SNP habituales heredados de nuestros ancestros prehistóricos, existen secuencias con velocidades de mutación extraordinariamente elevadas. Un ejemplo destacable es el caso de las repeticiones CA, ubicuas en el genoma humano y de otras especies eucariotas. Las secuencias que tienen el motivo $(CA)_n$ se replican con una fidelidad relativamente baja debido al deslizamiento que existe entre el molde y las cadenas nuevas sintetizadas durante la replicación del DNA; así el valor de n puede variar en un grado considerable de un genoma a otro. Estas repeticiones constituyen óptimos marcadores genéticos basados en DNA, ya que la mayoría de humanos son heterocigotos –tienen dos valores de n para cada repetición CA concreta, habiendo heredado una longitud de la repetición (n) de la madre y una longitud distinta de la repetición del padre. Mientras que el valor de n cambia suficientemente, la mayor parte de transmisiones padres-hijo raramente transmiten con facilidad las repeticiones CA y los cambios son lo bastante frecuentes como para mantener la heterozigocidad en la población humana. Estas y otras repeticiones sencillas que muestran una variabilidad excepcionalmente elevada proporcionan las bases de la identificación de individuos por análisis de DNA en investigaciones criminales, investigaciones de paternidad y otras investigaciones forenses (véase la Figura 8–47).

Se considera que la mayor parte de los SNP y de otras variaciones habituales de la secuencia del genoma humano no tienen consecuencias sobre el fenotipo, pero un subgrupo

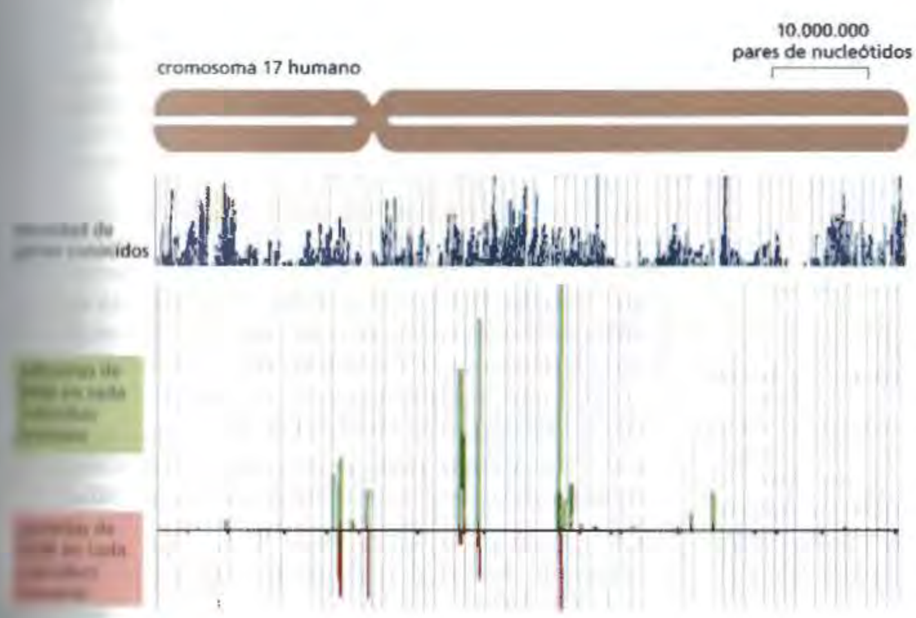


Figura 4–90 Detección del número de copias variantes del cromosoma 17. Se analizaron 100 individuos mediante un análisis tipo microchip, que detecta el número de copias de secuencias de DNA en todo el cromosoma 17 y se observó la distribución de las adiciones (*barras verdes*) y las pérdidas (*barras rojas*) de DNA que se indican, comparadas con una secuencia humana arbitraria de referencia. Las *barras verdes* y *rojas* más cortas representan un solo suceso entre los 200 cromosomas examinados, mientras que las barras mayores indican que la adición o pérdida fue más frecuente. Los resultados muestran regiones en las que las variaciones ocurren preferentemente, lo cual tiene tendencia a suceder en regiones o cerca de regiones que ya contienen bloques de segmentos de duplicaciones. Muchos de los cambios incluyen genes conocidos. (Adaptado de J.L. Freeman et al., *Genome Res.* 16:949-961, 2006. Con la autorización de Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

de ellas puede ser responsable de casi todos los aspectos de la individualidad humana heredable. Sabemos que incluso el cambio de un solo nucleótido que altere el tipo de aminoácido de una proteína puede generar una enfermedad grave, como por ejemplo en la anemia falciforme, que causa una mutación en la hemoglobina <TTTT>. También sabemos que la dosis génica –el doble o la mitad del número de copias de algunos genes– puede tener un efecto profundo en el desarrollo humano alterando el nivel del producto génico. Por lo tanto, existen razones para suponer que algunas de las muchas diferencias que existen entre dos humanos cualesquiera tendrán efectos sustanciales en la salud, la fisiología y el comportamiento, si son SNP o variación en el número de copias. El mayor desafío de la genética humana consiste en llegar a reconocer las relativamente pocas variaciones que son funcionalmente importantes en contraste con la amplia base de variación neutra que distingue los genomas de diferentes seres humanos.

Resumen

Las comparaciones entre las secuencias de nucleótidos de los genomas actuales han revolucionado nuestra comprensión de los genes y de la evolución de los genomas. Debido a la fidelidad extremadamente elevada de la replicación y reparación del DNA, los errores al azar en el mantenimiento de las secuencias de nucleótidos en los genomas se dan tan raramente que cada millón de años sólo se modifican unos 5 nucleótidos de cada 1000 en un linaje particular. Por lo tanto no es surprendente que la comparación entre los cromosomas de humanos y de chimpancés –que se hallan separados por unos 6 millones de años de evolución– revele muy pocos cambios. No sólo ocurre que los genes son esencialmente los mismos, sino que el orden de los genes dentro de cada cromosoma también es casi idéntico. A pesar de que en los pasados 6 millones de años se han producido un número sustancial de duplicaciones y deleciones de segmentos, incluso las posiciones de los elementos transponibles que forman la mayor parte de nuestro DNA no codificante se hallan inalteradas.

Cuando se comparan los genomas de dos organismos menos relacionados– como el de humanos y el del ratón, separados por unos 80 millones de años– se encuentran muchos más cambios. En este caso se pueden observar claramente los efectos de la selección natural: mediante la selección purificadora, las secuencias de nucleótidos esenciales –tanto en regiones reguladoras como en regiones codificantes (secuencias exónicas)– se han conservado. Por el contrario, secuencias no esenciales (p. ej., la mayoría del DNA intrónico) se han alterado hasta tal extremo que a menudo es imposible un alineamiento preciso de ellas.

Debido a la selección purificadora, la comparación de las secuencias genómicas de muchas especies relacionadas constituye una herramienta potente para encontrar secuencias de DNA con funciones importantes. Aunque cerca del 5% del genoma humano se ha conservado como resultado de la selección purificadora, la función de la mayoría de este DNA (decenas de miles de secuencias conservadas en muchas especies) sigue siendo un misterio. Los futuros experimentos que se realizarán para caracterizar estas funciones descubrirán muchas cosas sobre la biología de los vertebrados.

Otras comparaciones de secuencias muestran que una gran parte de la complejidad genética de los organismos actuales se debe a la expansión de antiguas familias génicas. La duplicación del DNA seguida de la divergencia de las secuencias ha sido una fuente importante de novedad genética durante la evolución. Los genomas de dos individuos humanos cualesquiera se diferenciaran mutuamente por las sustituciones de nucleótidos (polimorfismo de un solo nucleótido o SNP) y por las pérdidas y ganancias de DNA heredadas que causan variaciones en el número de copias. Entender estas diferencias mejorará la medicina y nuestra comprensión de la biología humana.

PROBLEMAS

¿Qué afirmaciones son ciertas? Explicar por qué sí o por qué no

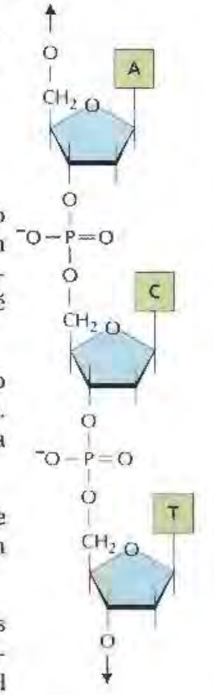
4–1 Las mujeres tienen 23 cromosomas diferentes mientras que los hombres tienen 24.

4–2 Al comparar el DNA de organismos relacionados entre sí, como los humanos y los ratones, la identificación de secuencias de DNA conservadas facilita la búsqueda de regiones funcionalmente importantes.

4–3 Las cuatro histonas del núcleo del nucleosoma son proteínas relativamente pequeñas que presentan una proporción muy alta de aminoácidos cargados positivamente; la carga positiva ayuda a que las histonas se unan con fuerza al DNA con independencia de su secuencia de nucleótidos.

4–4 Los nucleosomas se unen tan fuertemente al DNA que no se pueden mover de la posición donde han sido ensamblados.

4–5 Parece que la duplicación y la divergencia génicas han desempeñado un papel clave en la evolución creciente de la complejidad biológica.



[illegible] P4–1 Tres nucleótidos del interior de una [illegible]cilla de DNA (Problema 4–7). Las *flechas* [illegible]mos de la cadena de DNA indican que [illegible] continúa en ambos sentidos.

[illegible] los siguientes problemas

[illegible] El DNA aislado del virus bacteriano [illegible]iene un 25% de A, un 33% de T, un [illegible] C y un 20% de G. ¿Resultan sorpren[illegible] estos resultados? ¿Por qué sí o por qué [illegible] ¿Cómo explicar estos valores?

[illegible] La **Figura P4–1** muestra un segmento [illegible] de una cadena sencilla de DNA. [illegible] la polaridad de este DNA de arriba a [illegible]

[illegible] El DNA humano contiene un 20% de [illegible] proporciones molares corresponden [illegible]

[illegible] El cromosoma 3 de los orangutanes [illegible] del de los humanos a causa de dos su[illegible] de inversión (**Figura P4–2**). Dibujar el [illegible]ma intermedio que resultó de la pri[illegible] inversión e indicar explícitamente los [illegible] incluidos en cada inversión.

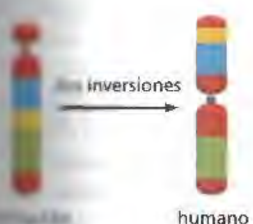


Figura P4–2 El cromosoma 3 de orangutanes y de humanos (Problema 4–9). Los diferentes *bloques coloreados* indican los segmentos del cromosoma que derivaron de fusiones previas.

[illegible] Asumiendo que la fibra de cromatina de 30 nm contiene [illegible] nucleosomas (200 pb/nucleosoma) por cada 50 nm de [illegible] calcula el grado de compactación del DNA asociado a [illegible] de la estructura de cromatina. ¿Qué fracción del plega[illegible] condensado 10.000 veces que ocurre durante la mitosis [illegible] este nivel de empaquetamiento del DNA?

[illegible] A diferencia de lo que ocurre con la acetilación de las his[illegible] que siempre se correlaciona con la activación génica, la [illegible] puede conducir tanto a la activación como a la repre[illegible] una misma modificación –la metilación– puede me[illegible]ntes respuestas biológicas?

[illegible] ¿Por qué es inestable un cromosoma con dos centró[illegible] cromosoma dicéntrico)? ¿No sería algo positivo para un [illegible] tener dos centrómeros, que proporcionan dos opor[illegible] para formar un cinetocoro y unirse a los microtúbulos [illegible] la mitosis? ¿No ayudaría esto a asegurarse que el cromo[illegible] quedara atrás durante la mitosis?

[illegible] Las proteínas HP1, una familia de proteínas presentes en [illegible]romatina, están implicadas en la silenciación de genes y [illegible] estructura de la cromatina. Las tres proteínas humanas [illegible] HP1β y HP1γ– comparten un cromodominio altamente [illegible], que parece que vehiculiza su localización en la cro[illegible]. Para determinar si estas proteínas se pueden unir al extre[illegible] N-terminal de la histona H3, se han unido covalentemente [illegible] del péptido de la cola N-terminal de H3, a esferas

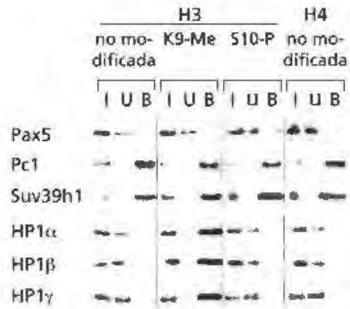


Figura P4–3 Ensayo para determinar la especificidad de unión de las proteínas HP1 (Problema 4–13). Cada proteína fue detectada mediante análisis inmunológico utilizando anticuerpos específicos tras la separación por electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS. Para cada péptido N-terminal de histona se indica la proteína total cargada (I: *input*), la proteína no unida (U: ***u**nbound*) y la proteína unida (B: ***b**ound*). (Adaptado de M. Lachner et al., *Nature* 410: 116-120, 2001. Con autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

diferentes –el péptido sin modificar, péptido dimetilado en Lys-9 (K9-Me) y péptido fosforilado en Ser-10 (S10P)– junto con la cola no modificada de la histona H4. Este montaje permite incubar las esferas con varias proteínas, lavar para descartar las proteínas no unidas y luego eluir las proteínas que se han unido para analizarlas mediante análisis de tipo Western. Los resultados del experimento para las proteínas HP1 se muestran en la **Figura P4–3** junto con los resultados de varias proteínas control, incluyendo Pax5, una proteína reguladora de genes, la proteína polycomb Pc1, que se une a histonas, y Suv39h1, una metiltransferasa de histonas.

Basándose en estos resultados, ¿cuál de las proteínas se une a las colas no modificadas de las histonas? ¿Se unen selectivamente a los péptidos N-terminales modificados de la histona alguna de las proteínas HP1 o alguna de las controles? ¿Cuál de las modificaciones de la histona se encontrará en la heterocromatina?

4–14 Más del 40% del genoma humano lo constituyen fragmentos móviles de DNA –elementos transponibles– que se insertan en los cromosomas y se acumulan durante la evolución. Cuatro tipos de elementos transponibles –elementos intercalados grandes (LINE: ***l**ong **i**nterspersed **e**lements*), elementos intercalados cortos (SINE: ***s**hort **i**nterspersed **e**lements*), retrotransposones LTR y transposones de DNA– están insertados al azar en el genoma humano. Estos elementos se encuentran muy poco representados en los cuatro grupos de genes homebox, *HoxA*, *HoxB*, *HoxC* y *HoxD*, como se ilustra para *HoxD* en la **Figura P4–4**, junto con una región equivalente del cromosoma 22, el cual no tiene un grupo Hox. Cada grupo Hox es de unas 100 kb de longitud y contiene de 9 a 11 genes, cuya expresión diferencial a lo largo del eje anteroposterior del embrión en desarrollo establece el esquema básico del cuerpo humano (y de otros animales). ¿Por qué los elementos transponibles son tan raros en los grupos *Hox*?



Figura P4–4 Genes y elementos transponibles en regiones de 1 Mb de los cromosomas 2 y 22 (Problema 4–14). Las líneas que se proyectan *hacia arriba* indican los exones conocidos y *hacia abajo*, los elementos transponibles; son tan numerosos (más del 40% del genoma humano) que se solapan en una mancha, excepto en los grupos *Hox*. (Adaptado de E. Lander et al., *Nature* 409:860-921, 2001. Con autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

BIBLIOGRAFÍA

General

Hartwell L, Hood L, Goldberg ML et al (2006) Genetics: from Genes to Genomes, 3.ª ed. Boston: McGraw Hill.

Olson MV (2002) The Human Genome Project: a player's perspective. *J Mol Biol* 319:931–942.

Strachan T & Read AP (2004) Human Molecular Genetics. New York: Garland Science.

Wolffe A (1999) Chromatin: Structure and Function, 3rd ed. New York: Academic Press.

Estructura y función del DNA

Avery OT, MacLeod CM & McCarty M (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of *pneumococcal* types. *J Exp Med* 79:137–158.

Meselson M & Stahl FW (1958) The replication of DNA in *E. coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 44:671–682.

Watson JD & Crick FHC (1953) Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acids. *Nature* 171:737–738.

El DNA cromosómico y su empaquetamiento en la fibra de cromatina

Jin J, Cai Y, Li B et al (2005) In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends Biochem Sci* 30:680–687.

Kornberg RD & Lorch Y (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98:285–294.

Li G, Levitus M, Bustamante C & Widom J (2005) Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA. *Nature Struct Mol Biol* 12:46–53.

Lorch Y, Maier-Davis B & Kornberg RD (2006) Chromatin remodeling by nucleosome disassembly *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:3090–3093.

Luger K, Mader AW, Richmond RK et al (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251–260.

Luger K & Richmond TJ (1998) The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev* 8:140–146.

Malik H S & Henikoff S (2003) Phylogenomics of the nucleosome. *Nature Struct Biol* 10:882-891.

Ried T, Schrock E, Ning Y & Wienberg J (1998) Chromosome painting: a useful art. *Hum Mol Genet* 7:1619–1626.

Robinson PJ & Rhodes R (2006) Structure of the 30 nm chromatin fibre: A key role for the linker histone. *Curr Opin Struct Biol* 16:1–8.

Saha A, Wittmeyer J & Cairns BR (2006) Chromatin remodeling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:437–446.

Woodcock CL (2006) Chromatin architecture. *Curr Opin Struct Biol* 16:213–220.

Regulación de la estructura de la cromatina

Egger G, Liang, G, Aparicio A & Jones PA (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429:457–463.

Henikoff S (1990) Position-effect variegation after 60 years. *Trends Genet* 6:422–426.

Henikoff S & Ahmad K (2005) Assembly of variant histones into chromatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:133–153.

Gaszner M & Felsenfeld G (2006) Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nature Rev Genet* 7:703–713.

Hake SB & Allis CD (2006) Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the "H3 barcode hypothesis." *Proc Natl Acad Sci USA* 103:6428–6435.

Jenuwein T (2006) The epigenetic magic of histone lysine methylation. *FEBS J* 273:3121–3135.

Martin C & Zhang Y (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Rev Mol Cell Biol* 6:838–849.

Mellone B, Erhardt S & Karpen GH (2006) The ABCs of centromeres. *Nature Cell Biol* 8:427–429.

Peterson CL & Laniel MA (2004) Histones and histone modifications. *Curr Biol* 14:R546–R551.

Ruthenburg AJ, Allis CD & Wysocka J (2007) Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell* 25:15–30.

Shahbazian MD & Grunstein M (2007) Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* 76:75–100.

Estructura global de los cromosomas

Akhtar A & Gasser SM (2007) The nuclear envelope and transcriptional control. *Nature Rev Genet* 8:507–517.

Callan HG (1982) Lampbrush chromosomes. *Proc Roy Soc Lond Ser B* 21:417–448.

Chakalova L, Debrand E, Mitchel JA et al (2005) Replication and transcription: shaping the landscape of the genome. *Nature Rev Genet* 6:669–678.

Cremer T, Cremer M, Dietzel S et al (2006) Chromosome territories—a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol* 18:307–316.

Ebert A, Lein S, Schotta G & Reuter G (2006) Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Chromosome Res* 14:377–392.

Fraser P & Bickmore W (2007) Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature* 447:413–417.

Handwerger KE & Gall JG (2006) Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Trends Cell Biol* 16:19–26.

Hirano T (2006) At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:311–322.

Lamond AI & Spector DL (2003) Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4:605–612.

Maeshima K & Laemmli UK (2003) A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly. *Dev Cell* 4:467–480.

Sims JK, Houston SI, Magazinnik T & Rice JC (2006) A trans-tail histone code defined by monomethylated H4 Lys-20 and H3 Lys-9 demarcates distinct regions of silent chromatin. *J Biol Chem* 281:12760–12766.

Speicher MR & Carter NP (2005) The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature Rev Genet* 6:782–792.

Zhimulev IF (1998) Morphology and structure of polytene chromosomes. *Adv Genet* 37:1–566.

Cómo evolucionan los genomas

Batzer MA & Deininger PL (2002) ALU repeats and human genomic diversity. *Nature Rev Genet* 3:370–379.

Blanchette M, Green ED, Miller W, & Haussler D (2004) Reconstructing large regions of an ancestral mammalian genome in silico. *Genome Res* 14:2412–2423.

Cheng Z, Ventura M, She X et al (2005) A genome-wide comparison of recent chimpanzee and human segmental duplications. *Nature* 437:88–93.

Feuk L, Carson AR & Scherer S (2006) Structural variation in the human genome. *Nature Rev Genet* 7:85–97.

International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860–921.

International Human Genome Consortium (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431:931–945.

Koszul R, Caburet S, Dujon B & Fischer G (2004) Eucaryotic genome evolution through the spontaneous duplication of large chromosomal segments. *EMBO J* 23:234–243.

Margulies EH, NISC Comparative Sequencing Program & Green ED (2003) Detecting highly conserved regions of the human genome by multispecies sequence comparisons. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 68:255–263.

Mouse Genome Sequencing Consortium (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520–562.

Pollard KS, Salama SR, Lambert N et al (2006) An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly in humans. *Nature* 443:167–172.

Sharp AJ, Cheng Z & Eichler EE (2007) Structural variation of the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7:407–442.

Siepel A, Bejerano G, Pedersen JS et al (2005) Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res* 15:1034–1050.

The International HapMap Consortium (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature* 437:1299–1320.

The ENCODE Project Consortium (2007) Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447:799–816.

Replicación, reparación y recombinación del DNA

5

La capacidad de las células para mantener un alto grado de organización en un universo caótico depende de la duplicación fiel de grandes cantidades de información genética almacenada en forma química como DNA. Este proceso, que se denomina *replicación del DNA*, debe tener lugar antes de que la célula produzca dos células hijas genéticamente idénticas. Mantener el orden también requiere la constante supervisión y reparación de esta información genética porque el DNA de las células es alterado constantemente por productos químicos y radiaciones del entorno, así como por accidentes térmicos y moléculas reactivas generadas en el interior de la célula.

En este capítulo, describimos la maquinaria proteica que replica y repara el DNA de las células. Esta maquinaria cataliza algunos de los procesos más precisos y más rápidos que tienen lugar en las células, y sus mecanismos demuestran claramente la elegancia y la eficiencia de la química celular.

Mientras que la supervivencia de una célula a corto plazo puede depender de que se eviten los cambios de su DNA, la supervivencia a largo plazo de una especie requiere que las secuencias de DNA cambien a lo largo de muchas generaciones. A pesar del gran esfuerzo que las células hacen para proteger su DNA, se pueden producir cambios ocasionales en sus secuencias. Con el tiempo, estos cambios aportan la variabilidad genética sobre la que actúa la presión de la selección durante la evolución de los organismos.

Empezamos este capítulo con una breve exposición de los cambios que tienen lugar en el DNA a medida que se transmite de generación en generación. A continuación, se describen los mecanismos de la célula (replicación y reparación del DNA) responsables de minimizar estos cambios. Finalmente, consideramos algunas de las vías más interesantes que alteran las secuencias de DNA: las vías de recombinación del DNA, incluyendo el desplazamiento de secuencias especiales de DNA llamadas elementos genéticos transponibles.

En este capítulo

EL MANTENIMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE DNA	263
MECANISMOS DE REPLICACIÓN DEL DNA	266
INICIACIÓN Y TERMINACIÓN DE LA REPLICACIÓN DE DNA EN LOS CROMOSOMAS	281
REPARACIÓN DEL DNA	295
RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA	304
TRANSPOSICIÓN Y RECOMBINACIÓN CONSERVATIVA ESPECÍFICA DE LUGAR	316

EL MANTENIMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE DNA

Aunque, como acabamos de mencionar, los cambios genéticos ocasionales favorecen la supervivencia de una especie a largo plazo, la supervivencia de un individuo requiere una estabilidad genética elevada. Los procesos de mantenimiento del DNA de una célula sólo fallan raramente dando lugar a un cambio permanente en el DNA. Este cambio se denomina **mutación** y puede llegar a provocar la muerte del organismo si tiene lugar en una posición vital en la secuencia de DNA.

Las frecuencias de mutación son extremadamente bajas

La **frecuencia de mutación**, la tasa a la que se producen cambios estables en las secuencias de DNA, se puede determinar directamente de forma experimental utilizando bacterias como *Escherichia coli*, un residente de nuestro tracto intestinal y un organismo muy utilizado en el laboratorio (véase Capítulo 1). Bajo condiciones de laboratorio, *E. coli* se divide aproximadamente una vez cada 40 minutos, de forma que una sola célula puede generar una gran población (varios miles de millones de células) en menos de un día. En esta población es posible detectar la pequeña fracción de bacterias que han sufrido una mutación perjudicial en un gen particular, si este gen no es indispensable para la supervivencia de la bacteria. Por

ejemplo, se puede determinar la frecuencia de mutación de un gen que las células necesitan para utilizar el azúcar lactosa como fuente de energía, cuando las células crecen en presencia de un azúcar distinto, como la glucosa. La fracción de genes alterados subestima la frecuencia de mutación real porque muchas mutaciones son *silenciosas* (p. ej., aquellas que cambian un codón pero no el aminoácido que especifica, o aquellas que cambian un aminoácido sin afectar la actividad de la proteína codificada por el gen). Después de corregir estas mutaciones silenciosas, se observa que un gen que codifica una proteína de tamaño medio (~10^3 pares de nucleótidos codificantes) acumula una mutación (no necesariamente una que inactive la proteína) aproximadamente una vez cada 10^6 generaciones celulares bacterianas. Explicado de otro modo, las bacterias tienen una frecuencia de mutación alrededor de 1 cambio de nucleótido por cada 10^9 nucleótidos en cada una de las generaciones celulares.

Recientemente ha sido posible medir la frecuencia de mutación de la línea germinal en organismos más complejos desde un punto de vista reproductivo, como por ejemplo *C. elegans*. Estos gusanos, cuyo tiempo de generación es de 4 días, fueron criados durante muchas generaciones utilizando su propio sistema de reproducción (véase Capítulo 22). En muchos de los gusanos descendientes se determinó la secuencia de DNA de una gran región del genoma y se comparó con la del gusano progenitor. Este análisis mostró, por término medio, la aparición en el genoma haploide de dos nuevas mutaciones (la mayoría de ellas pequeñas inserciones y deleciones) en cada generación. Cuando se tiene en cuenta el número de divisiones celulares necesario para producir espermatozoides y óvulos, la frecuencia de mutación es aproximadamente de 1 mutación por cada 10^9 nucleótidos por división celular, una frecuencia remarcablemente similar a la descrita anteriormente para *E. coli*, cuya reproducción es asexual.

La medición directa de la frecuencia de mutación en la línea germinal de mamíferos es más difícil, pero se pueden obtener estimaciones indirectas. Uno de los sistemas consiste en comparar las secuencias de aminoácidos de una proteína determinada procedente de varias especies distintas. El porcentaje de aminoácidos que difiere entre dos especies cualesquiera se puede comparar con el número estimado de años transcurridos desde que las dos especies se separaron de su antepasado común, tal como se determina a partir de registros fósiles. De esta manera se puede calcular el promedio de años que se necesitan para que un cambio genético se fije como una alteración en un aminoácido de una proteína. Debido a que cada uno de los cambios de este tipo reflejará probablemente la alteración de un solo nucleótido en la secuencia del DNA que codifica esta proteína, podemos utilizar este valor para estimar el promedio del número de años que deben transcurrir para que se produzca una mutación estable en el gen.

Cálculos como éstos siempre subestiman la frecuencia real de mutación, ya que muchas mutaciones afectan a la función de la proteína y desaparecen de la población por selección natural, es decir, se produce la muerte preferencial de los organismos que las sufren. Sin embargo, la secuencia de una familia de fragmentos proteicos no parece ser tan importante, por lo que los genes que la codifican pueden acumular mutaciones sin sufrir ningún tipo de selección en contra.

Estas proteínas son los *fibrinopéptidos*, fragmentos de veinte aminoácidos que son eliminados cuando la proteína *fibrinógeno* es activada dando lugar a *fibrina* durante el proceso de la coagulación de la sangre. Dado que aparentemente la función de los fibrinopéptidos no depende de su secuencia de aminoácidos, pueden tolerar cualquier cambio que se produzca en su secuencia. Así pues, se puede utilizar el análisis de la secuencia de los fibrinopéptidos para estimar la frecuencia de mutación en la línea germinal. Como se ha determinado en este tipo de estudios, una proteína de tamaño medio de 400 aminoácidos puede sufrir una variación en un aminoácido cada 200.000 años.

Otro modo de estimar las frecuencias de mutación en humanos es utilizar la secuenciación del DNA para comparar las correspondientes secuencias de nucleótidos directamente entre especies cercanas en regiones del genoma que en principio no codifiquen información crítica. Como era de esperar, tales comparaciones dan estimaciones de la frecuencia de mutación que concuerdan con las obtenidas a partir de los estudios con fibrinopéptidos.

E. coli, los gusanos y los humanos difieren enormemente en sus modos específicos de reproducción y en sus tiempos de generación. Aun así, cuando la frecuencia de mutación de cada uno se normaliza a un solo ciclo de replicación del DNA, encontramos valores similares: aproximadamente 1 cambio de nucleótido por cada 10^9 nucleótidos cada vez que se replica el DNA.

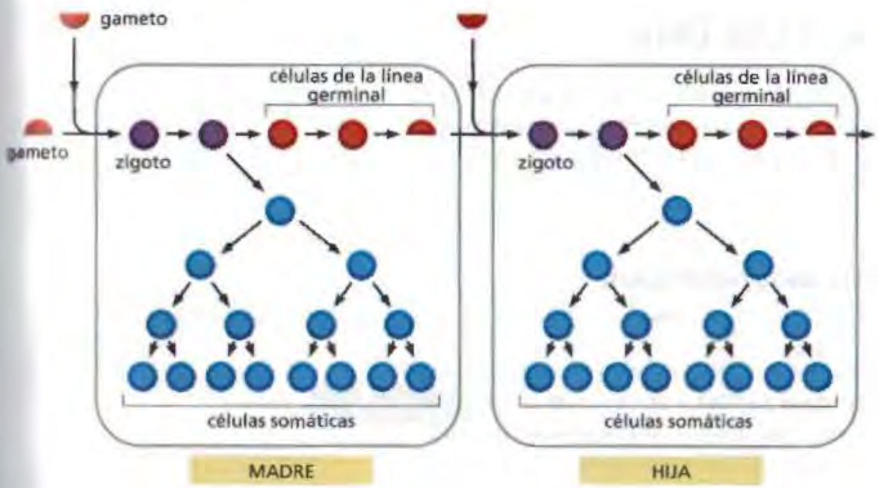


Figura 5–1 Las células de la línea germinal y las células somáticas llevan a cabo funciones fundamentalmente diferentes. En los organismos con reproducción sexual, la línea de células germinales (*rojas*) transmite la información genética a la siguiente generación. Las células somáticas (*azules*), las cuales forman el cuerpo del organismo, son necesarias para la supervivencia de la línea de células germinales, pero por sí mismas no dejan progenie.

Para que exista la vida tal como la conocemos son necesarias bajas frecuencias de mutación

Dado que la mayoría de las mutaciones son perjudiciales, ninguna especie puede permitir que se acumulen en gran número en sus células germinales. A pesar de que la frecuencia de mutación observada es tan baja, parece que limita a unas 50.000 el número de proteínas esenciales que cualquier organismo puede codificar en su línea germinal. Como extensión de este mismo argumento, una frecuencia de mutación diez veces superior limitaría a un organismo a unas 5.000 proteínas esenciales. En este caso, la evolución se habría limitado a organismos considerablemente menos complejos que la mosca de la fruta.

Las células de un organismo que tiene reproducción sexual, son de dos tipos: **germinales y somáticas**. Las células germinales transmiten la información genética de padres a hijos; las somáticas forman el cuerpo del organismo (**Figura 5–1**). Hemos visto que las células germinales tienen que estar protegidas contra elevadas frecuencias de mutación para mantener la especie. Sin embargo, las otras células de un organismo pluricelular (sus células somáticas) también tienen que estar protegidas contra cambios genéticos para poder salvaguardar cada individuo. Los cambios de nucleótidos en las células somáticas pueden dar lugar a células variantes algunas de las cuales, a través del proceso de selección natural, proliferan rápidamente a expensas del resto del organismo. En el caso extremo, el resultado es una proliferación celular descontrolada conocida como cáncer, una enfermedad que es la causa de más del 20% de las muertes en humanos en Europa y Norteamérica. Estas muertes son debidas mayoritariamente a la acumulación de cambios en la secuencia del DNA de las células somáticas (véase Capítulo 23). Probablemente, un incremento significativo de la frecuencia de mutación causaría un aumento desastroso de la incidencia de cáncer al acelerar la velocidad a la que aparecerían variantes de las células somáticas. Así pues, los organismos pluricelulares como nosotros dependen de la extraordinaria fidelidad con la que se repliquen y mantengan sus secuencias de DNA, tanto para la perpetuación de especies con un gran número de genes (estabilidad de las células germinales) como para la prevención del proceso canceroso resultante de las mutaciones de las células somáticas (estabilidad de las células somáticas).

Resumen

En cualquier célula, las secuencias de DNA se mantienen y se replican con una alta fidelidad. La frecuencia de mutación, alrededor de 1 cambio de nucleótido por cada 10^9 nucleótidos cada vez que se replica el DNA, es aproximadamente la misma para organismos tan distintos como las bacterias y los humanos. Dada esta alta fidelidad, la secuencia del genoma humano (aproximadamente 3×10^9 pares de nucleótidos) sólo cambia en 3 nucleótidos cada vez que la célula se divide. Este hecho permite a la mayoría de humanos transmitir de forma cuidadosa las instrucciones genéticas de una generación a la siguiente y también evitar los cambios en las células somáticas que llevarían a un cáncer.

MECANISMOS DE REPLICACIÓN DEL DNA

Todos los organismos vivos tienen que duplicar su DNA de una forma muy fiel antes de cada división celular. En esta sección, exploramos el modo en que se consigue esta fidelidad mediante una elaborada "maquinaria de replicación", mientras el DNA se duplica a una velocidad de 1000 nucleótidos por segundo.

El apareamiento de bases es la esencia de la replicación y de la reparación del DNA

Como hemos introducido en el Capítulo 1, la célula utiliza el *DNA patrón* como mecanismo para copiar la secuencia de nucleótidos de una cadena de DNA a una secuencia complementaria. (**Figura 5–2**). Este proceso comporta el reconocimiento de cada nucleótido del *patrón de DNA* por un nucleótido libre (no polimerizado) complementario y requiere la separación de las dos cadenas de la hélice de DNA. Esta separación expone los grupos dadores y aceptores de los enlaces de hidrógeno de cada base del DNA para el apareamiento de las bases. De esta forma, los nucleótidos libres adecuados se alinean de forma ordenada, polimerizan mediante una reacción catalizada enzimáticamente y forman una nueva cadena de DNA.

En 1957, se describió la primera enzima que cataliza la polimerización de nucleótidos, la **DNA polimerasa**. Se demostró que los nucleótidos libres, que son sustrato de esta enzima, son los desoxirribonucleósidos trifosfato y que su pulimerización para formar el DNA requería la presencia de una cadena sencilla de DNA patrón. La **Figura 5–3** y la **Figura 5–4** ilustran el mecanismo de esta reacción.

La horquilla de replicación del DNA es asimétrica

Durante la replicación del DNA en la célula, cada una de las dos cadenas de DNA originales actúa como patrón para la formación de una nueva cadena completa. Dado que cada una de las dos células hijas de una célula que se divide heredan una doble hélice de DNA formada por una cadena original y otra acabada de sintetizar (**Figura 5–5**), se dice que la doble hélice de DNA se replica de manera "semiconservativa" mediante la DNA polimerasa. ¿Cómo se consigue esto?

Análisis efectuados a principios de la década de 1960, sobre cromosomas enteros en replicación, revelaron la existencia de una región concreta de replicación que se desplaza a lo largo de la doble hélice paterna de DNA. Debido a su estructura en forma de Y, esta región activa del DNA recibe el nombre de **horquilla de replicación del DNA** (**Figura 5–6**). En la horquilla de replicación, un complejo multienzimático que contiene la DNA polimerasa sintetiza el DNA de las dos hélices hijas.

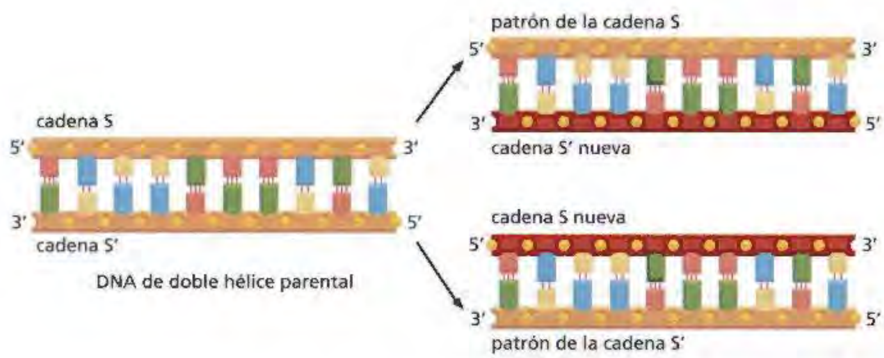


Figura 5–2 La doble hélice de DNA actúa como patrón para su propia duplicación. Dado que el nucleótido A solamente se apareará con éxito con T, y G solamente con C, cada cadena de DNA puede actuar de patrón para especificar la secuencia de nucleótidos en su cadena complementaria mediante el apareamiento de bases de DNA. De este modo, se copia de forma exacta una molécula de DNA de doble hélice.

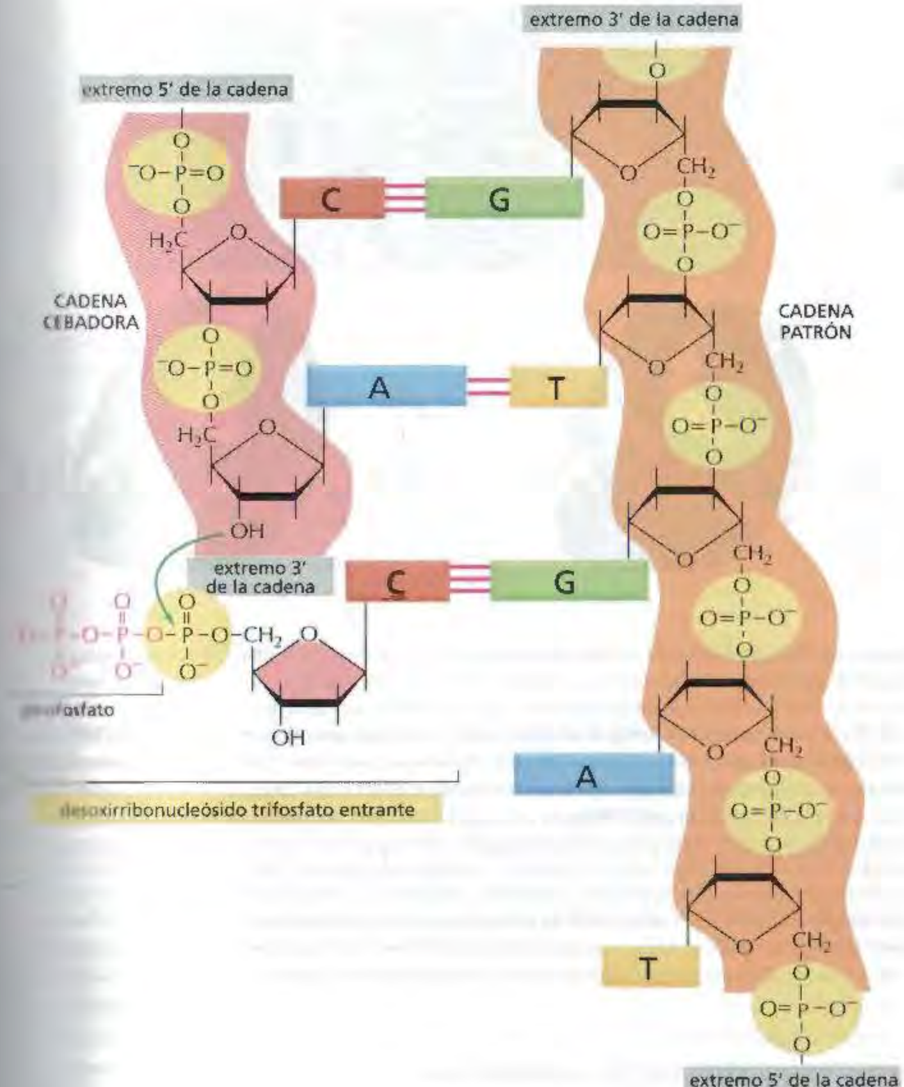


Figura 5–3 Procesos químicos de la síntesis de DNA. La reacción fundamental mediante la cual se sintetiza el DNA es la adición de un desoxirribonucleótido al extremo 3' de una cadena de polinucleótidos (la *cadena cebadora*). Como se muestra, el apareamiento de bases entre el desoxirribonucleósido trifosfato entrante y una cadena de DNA ya existente (la *cadena patrón*) dirige la formación de la nueva cadena de DNA y hace que su secuencia de nucleótidos sea complementaria.

Inicialmente el mecanismo más sencillo de replicación del DNA parecía ser el crecimiento continuo de las dos nuevas cadenas, nucleótido a nucleótido, a medida que la horquilla de replicación se desplazaba de un extremo a otro de la molécula de DNA. Pero debido a que en la hélice de DNA las dos cadenas se caracterizan por tener una orientación antiparalela (véase Figura 5–2), este mecanismo requeriría que una de las cadenas hijas creciera en sentido 5' a 3' y la otra en sentido 3' a 5'. Una horquilla de replicación de este tipo requeriría dos tipos diferentes de enzima DNA polimerasa. Sin embargo, la mayoría de las polimerasas que han sido descubiertas sólo pueden sintetizar en sentido 5' a 3'.

¿Cómo se consigue, pues, la síntesis del DNA en sentido 3' a 5'? La respuesta fue sugerida por primera vez a finales de la década de 1960 gracias a experimentos en los que se añadía ^3H-timidina altamente radiactiva durante breves segundos a una preparación de bacterias en crecimiento, de forma que sólo resultaba marcada radiactivamente la zona de DNA que se acababa de replicar, es decir, justo detrás de la horquilla de replicación. Este sistema de marcaje selectivo reveló la existencia de zonas de DNA en la horquilla de replicación en crecimiento de entre 1000 y 2000 nucleótidos de longitud, que hoy se conocen con el nombre de *fragmentos de Okazaki*. (Más tarde se describieron intermediarios de replicación

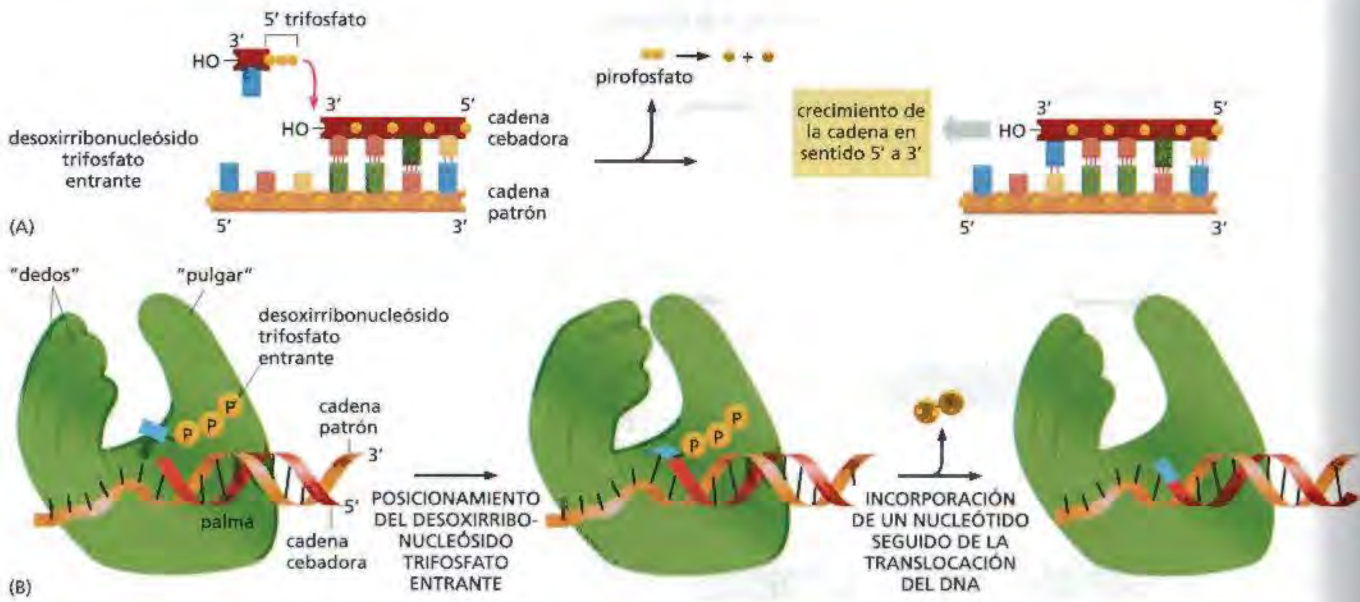


Figura 5–4 Síntesis de DNA catalizada por la DNA polimerasa. (A) Como se indica, la DNA polimerasa cataliza la adición por etapas de un desoxirribonucleótido al extremo 3'-OH de una cadena de polinucleótidos, la *cadena cebadora*, que está apareada a una segunda *cadena patrón*. De este modo, la cadena de DNA sintetizada de nuevo, crece en sentido 5' a 3', como se indica en la figura anterior. Cada desoxirribonucleósido trifosfato entrante tiene que aparearse con la cadena patrón para que la DNA polimerasa lo reconozca, por lo que esta cadena determina cuál de los cuatro desoxirribonucleótidos (A, C, G o T) será añadido. La reacción está impulsada por una variación muy favorable de energía, provocada por la liberación de pirofosfato y su posterior hidrólisis en dos moléculas de fosfato inorgánico. (B) Forma de una molécula de DNA polimerasa, determinada por cristalografía de rayos X. De un modo gráfico, las DNA polimerasas se parecen a una mano derecha con los dedos y el pulgar sujetando el DNA y formando el centro activo. En la secuencia de figuras que se muestra, el posicionamiento correcto de un desoxinucleósido trifosfato entrante provoca que los dedos de la polimerasa se cierren e inicien así la reacción de adición de un nucleótido. La disociación de un pirofosfato provoca la relajación de los dedos y la translocación del DNA de un nucleótido de manera que el centro activo de la polimerasa quede preparado para recibir al siguiente desoxinucleósido trifosfato.

como éstos en eucariotas, pero de una longitud de tan sólo entre 100 y 200 nucleótidos.) Se demostró que estos fragmentos de Okazaki se sintetizan únicamente en sentido 5' a 3' y que después de su síntesis se unen entre sí generando largas cadenas de DNA.

Una horquilla de replicación tiene una estructura asimétrica (**Figura 5–7**). La cadena hija de DNA que se sintetiza de manera continua recibe el nombre de **cadena conductora**. Es sintetizada antes que la otra cadena hija, que crece de forma discontinua y que recibe el nombre de **cadena retrasada**. El sentido de la polimerización de nucleótidos en la cadena retrasada es opuesto al sentido de crecimiento del resto de DNA. La síntesis de esta cadena mediante un mecanismo discontinuo de "punto hacia atrás" implica que la replicación del DNA únicamente necesita la DNA polimerasa 5' a 3'.

El elevado grado de fidelidad del mecanismo de replicación del DNA requiere la existencia de un mecanismo de "corrección de pruebas"

Como se espuso anteriormente, la fidelidad del proceso de copia durante la replicación del DNA es tan alta que sólo se produce, aproximadamente, un error en la replicación de cada 10^9 pares de bases. Esta fidelidad es mucho mayor de la que se esperaría teniendo en cuenta la exactitud del apareamiento de bases complementarias y que las parejas estándar de bases

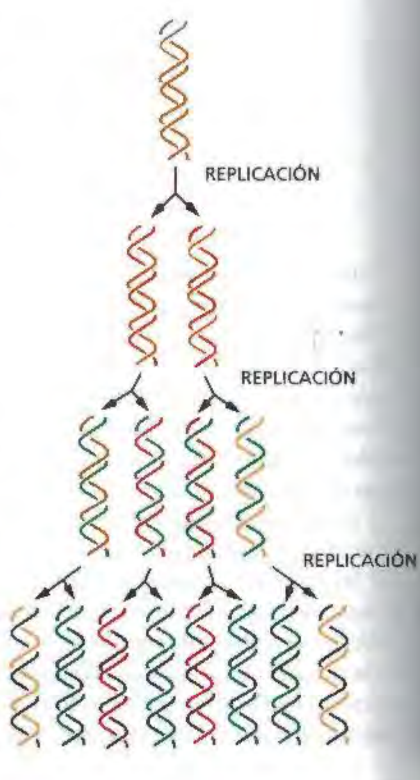


Figura 5–5 La naturaleza semiconservativa de la replicación del DNA. En cada ciclo de replicación, cada una de las dos cadenas del DNA se utiliza como patrón para la formación de una cadena complementaria de DNA. De este modo, las cadenas originales se mantienen intactas a lo largo de muchas generaciones celulares.

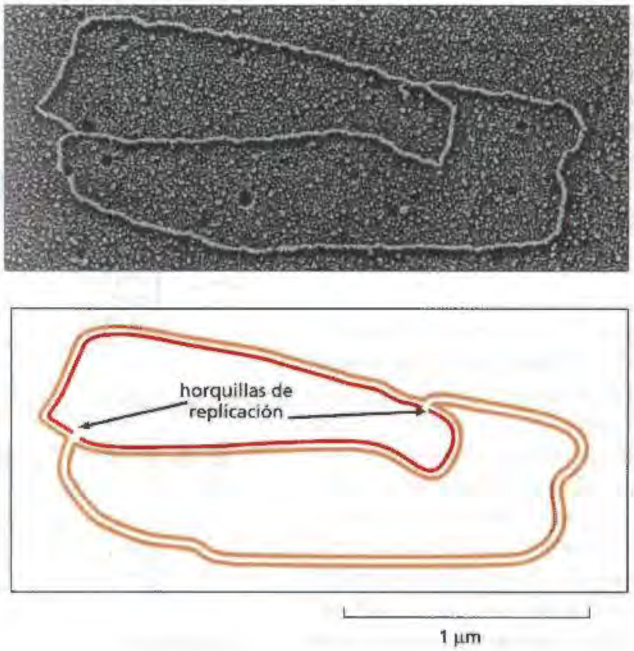


Figura 5–6 Dos horquillas de replicación desplazándose en direcciones opuestas en un cromosoma circular. Una zona activa de replicación de DNA se desplaza de forma progresiva a lo largo de una molécula de DNA que se replica, generando una estructura en forma de Y que se conoce con el nombre de horquilla de replicación: los dos brazos de cada Y son las dos moléculas de DNA hijas y el pie de la Y es la hélice de DNA paterna. En este diagrama, las cadenas paternas son de color *naranja*; las cadenas sintetizadas de nuevo son de color *rojo*. (Electromicrografía por cortesía de Jerome Vinograd.)

complementarias no son las únicas posibles (véase Figura 4–4). Por ejemplo, solamente unos pequeños cambios en la geometría de la hélice permitirían que se formaran dos enlaces de hidrógeno entre G y T. Además, en el DNA normal aparecen transitoriamente formas tautoméricas raras de las cuatro bases del DNA, en proporciones de 1 sobre 10^4 o 10^5. Estas formas no se aparean correctamente a no ser que haya cambios en la geometría de la hélice: por ejemplo, una forma tautomérica rara de C puede aparearse con A en lugar de con G.

Si la DNA polimerasa no actuara cuando se forman apareamientos incorrectos de bases entre un desoxirribonucleósido trifosfato entrante y el patrón de DNA, el nucleótido incorrecto sería incorporado a menudo en la nueva cadena de DNA, lo que daría lugar a mutaciones frecuentes. Sin embargo, la elevada fidelidad del proceso de replicación del DNA no depende solamente del proceso de apareamiento de bases inicial, sino también de varios mecanismos de "corrección de pruebas" que actúan secuencialmente corrigiendo cualquier apareamiento incorrecto inicial que haya podido ocurrir.

La DNA polimerasa lleva a cabo el primer paso en el proceso de "corrección de pruebas", pero antes de la adición de un nuevo nucleótido a la cadena en crecimiento. Este mecanismo se descubrió a partir de estudios cun distintas DNA polimerasas, incluyendo una producida por el virus bacteriano T7, que se replica dentro de *E. coli*. El nucleótido correcto tiene mayor afinidad por la polimerasa en movimiento que el nucleótido incorrecto porque la pareja de nucleótidos correcta es energéticamente más favorable. Además, después de la unión del nucleótido, pero antes de que sea incorporado covalentemente a la cadena en crecimiento, la enzima tiene que sufrir un cambio conformacional en el que sus "dedos" se cierran alrededor del centro activo (véase Figura 5–4). Como este cambio ocurre más fácilmente con las parejas de nucleótidos correctas que con las incorrectas, permite que la polimerasa compruebe dos veces la geometría exacta de las bases apareadas antes de que catalice la adición de nucleótidos.

La siguiente reacción de corrección de errnres se conoce con el nombre de "corrección exonucleolítica de pruebas" y actúa inmediatamente en aquellos casos raros en los que un

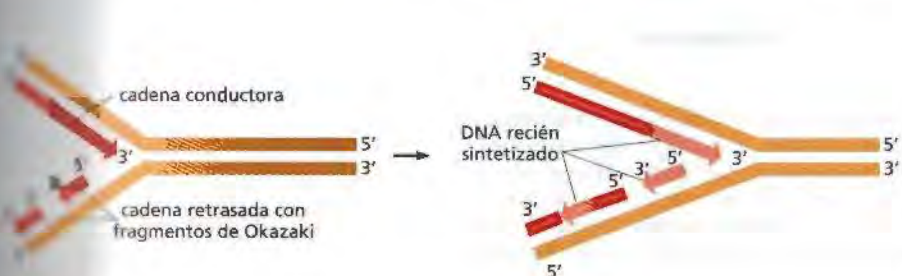
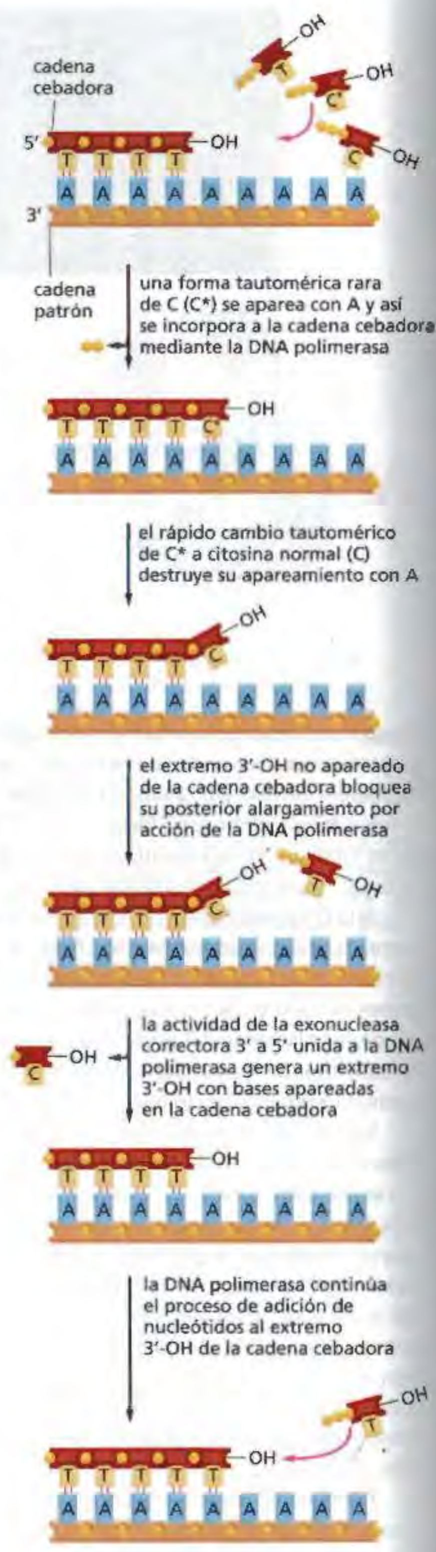


Figura 5–7 Estructura de una horquilla de replicación del DNA. Debido a que las dos cadenas de DNA hijas crecen en sentido 5' a 3', el DNA sintetizado en la cadena retrasada se tiene que producir inicialmente en forma de moléculas cortas de DNA llamadas *fragmentos de Okazaki*. En la cadena retrasada, los fragmentos de Okazaki se sintetizan de forma secuencial y los más cercanos a la horquilla son los que se han sintetizado más recientemente.

Figura 5-8 "Corrección de pruebas exonucleolítica" mediante la DNA polimerasa durante la replicación del DNA. En este ejemplo, el error es debido a la incorporación de una rara forma tautomérica transitoria de C, indicada con un asterisco. Este mismo mecanismo de corrección se aplica a cualquier incorporación errónea en el extremo 3'-OH creciente. La parte de la DNA polimerasa que elimina el nucleótido incorporado erróneamente es un miembro especializado de una gran familia de enzimas, conocidas como exonucleasas, que eliminan de uno en uno los nucleótidos del extremo de los polinucleótidos.



nucleótido incorrecto se ha unido covalentemente a la cadena en crecimiento. Las enzimas DNA polimerasa son muy discriminantes respecto al tipo de cadenas de DNA que van a elongar, ya que necesitan la presencia de un extremo 3'-OH de una *cadena cebadora* (véase Figura 5-4). Las moléculas de DNA que presentan errores de apareamiento (o falta de algún apareamiento) de nucleótidos en el extremo 3'-OH de la cadena cebadora no son efectivas como cadena patrón porque la polimerasa no puede alargar tal cadena. Las moléculas de DNA polimerasa corrigen estos apareamientos incorrectos mediante la utilización de un sitio catalítico diferente (ya sea en otra subunidad o en un dominio distinto de la molécula polimerasa, dependiendo de la polimerasa). Esta *exonucleasa correctora 3' a 5'* corta cualquier residuo desapareado del final de la cadena cebadora y continúa hasta que se ha eliminado un número suficiente de nucleótidos del extremo 3' como para regenerar un extremo con bases apareadas correctamente y que pueda cebar la síntesis de DNA. De esta forma, la DNA polimerasa actúa como una enzima "autocorrectora" que elimina sus propios errores de polimerización a medida que avanza por el DNA (**Figura 5-8** y **Figura 5-9**).

Las propiedades de autocorrección de la DNA polimerasa requieren la presencia de un extremo de DNA formado por un apareamiento perfecto de bases y, aparentemente, para una enzima de este tipo, no es posible iniciar la síntesis *de novo*. Por el contrario, las enzimas RNA polimerasa involucradas en la transcripción génica no necesitan un mecanismo eficiente de autocorrección: los errores en la transcripción del RNA no pasan a la generación siguiente y la existencia ocasional de una molécula defectuosa no es relevante a largo plazo. Así pues, las RNA polimerasas son capaces de iniciar una nueva cadena de polinucleótidos en ausencia de cebador.

En la síntesis de RNA y también en el proceso de traducción de mRNA a proteína, se encuentra una frecuencia de error de aproximadamente 1 de cada 10^4 eventos de polimerización. Este nivel de error es 100.000 veces mayor que en la replicación del DNA, donde una serie de procesos de autocorrección hacen que el proceso sea fiel en alto grado (**Tabla 5-1**).

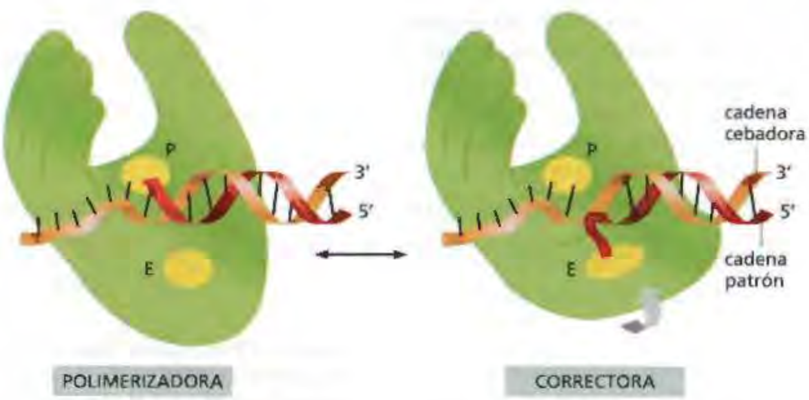


Figura 5-9 Corrección mediante la DNA polimerasa. Esquema de las estructuras de la DNA polimerasa formando un complejo con la cadena de DNA patrón en su función polimerizadora (*izquierda*) y en su función correctora (*derecha*). Se indican el centro catalítico para las reacciones exonucleolíticas (E) y de polimerización (P). Para llevar a cabo la función correctora, la nueva cadena de DNA sintetizada transitoriamente se desaparea de la cadena patrón y la polimerasa sufre un cambio conformacional, acerca el centro catalítico corrector y elimina el nucleótido añadido más recientemente. <GATT>

Tabla 5–1 Las tres etapas que dan lugar a síntesis de DNA de alta fidelidad

ETAPA DE REPLICACIÓN	ERRORES POR NUCLEÓTIDO POLIMERIZADO
Polimerización de 5' → 3'	1 de cada 10^5
Corrección exonucleolítica de pruebas de 3' → 5'	1 de cada 10^2
Corrección de errores de apareamiento	1 de cada 10^2
Efecto combinado	1 de cada 10^9

El tercer proceso, corrección de errores de apareamiento, se describe más adelante en este capítulo.

Sólo la replicación del DNA en sentido 5' a 3' permite la existencia de un proceso eficiente de corrección de errores

Probablemente la necesidad de que el proceso sea exacto explica por qué la replicación del DNA únicamente tiene lugar en el sentido 5' a 3' de la cadena. Si existiera una DNA polimerasa que añadiera desoxirribonucleósidos trifosfato de forma que produjera el crecimiento de la cadena en sentido 3' a 5', el extremo 5' en crecimiento proporcionaría el trifosfato activador necesario para la unión covalente, en lugar de hacerlo el mononucleótido entrante. En este caso, los errores de polimerización no serían simplemente eliminados por hidrólisis, ya que la síntesis de un extremo 5' desnudo terminaría de inmediato la síntesis de DNA (Figura 5-10). Por consiguiente, sólo es posible corregir una base mal apareada que acaba de ser añadida al extremo 3' de una cadena de DNA. Por lo tanto, aunque el tipo de mecanismo

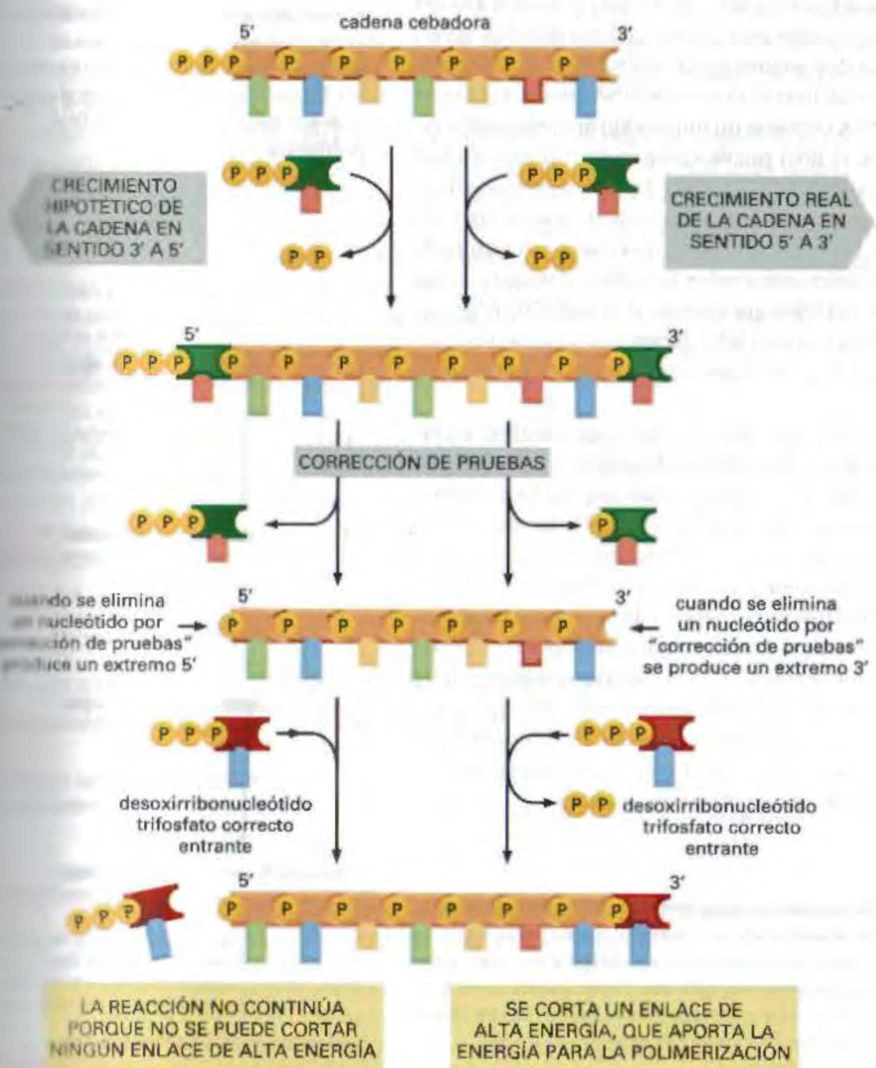


Figura 5–10 Una explicación de la razón por la que el crecimiento de la cadena de DNA se produce en sentido 5' a 3'. El crecimiento en sentido 5' a 3', indicado a la derecha, permite que la cadena se alargue de forma continua cuando se ha eliminado un error en la polimerización mediante la corrección exonucleolítica (véase Figura 5-8). Por el contrario, la corrección exonucleolítica en el esquema de la hipotética polimerización 3' a 5', mostrado a la izquierda, provocaría el bloqueo en el crecimiento de la cadena. Por conveniencia sólo se muestra la cadena cebadora de la doble hélice de DNA.

necesario para la replicación del DNA (véase Figura 5–7) parezca complejo, preserva el sentido de polimerización de 5' a 3' necesario para la corrección de pruebas exonucleolítica.

A pesar de estas medidas, para evitar los errores de replicación del DNA, las DNA polimerasas también se equivocan. Sin embargo, como veremos más adelante, las células todavía tienen otro mecanismo de corregir dichos errores por un proceso denominado *corrección de errores de apareamiento*. Antes de abordar este mecanismo, describiremos otros tipos de proteínas que actúan en la horquilla de replicación.

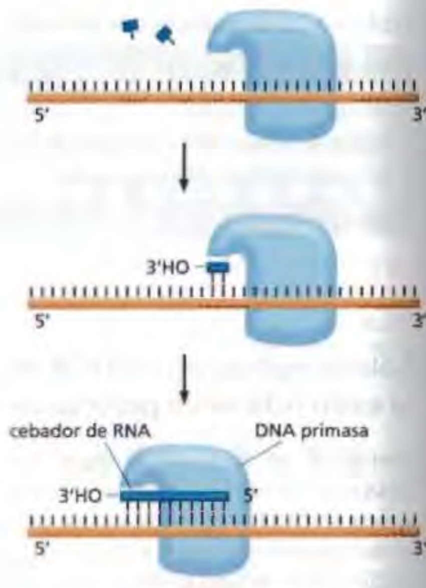


Figura 5–11 Síntesis del cebador de RNA. Representación esquemática de la reacción catalizada por la *DNA primasa*, que es la enzima que sintetiza los pequeños cebadores de RNA sobre la cadena retrasada utilizando DNA como patrón. A diferencia de la DNA polimerasa, esta enzima puede iniciar una nueva cadena de polinucleótidos al unir entre sí dos nucleósidos trifosfato. La primasa sintetiza un polinucleótido corto en sentido 5' a 3' y luego se detiene, dejando el extremo 3' de este cebador accesible a la DNA polimerasa.

Una enzima especial que polimeriza nucleótidos sintetiza moléculas cebadoras de RNA cortas sobre la cadena retrasada

Para el caso de la cadena conductora, únicamente es necesario un cebador especial al inicio de la replicación: en cuanto se ha establecido la horquilla de replicación, la DNA polimerasa dispone de forma continua de un extremo de cadena con bases apareadas sobre el que sintetizar la nueva cadena. Sin embargo, en la parte de la cadena retrasada, cada vez que la DNA polimerasa completa un fragmento corto de DNA (en tan sólo unos segundos) tiene que empezar a sintetizar otro fragmento completamente nuevo en un punto situado más adelante de la cadena patrón (véase Figura 5–7). Un mecanismo especial genera estas cadenas cebadoras de bases apareadas necesarias para que actúe la DNA polimerasa. El mecanismo incluye una enzima denominada **DNA primasa**, que utiliza ribonucleósidos trifosfato para sintetizar pequeñas cadenas **cebadoras de RNA** sobre la cadena retrasada (**Figura 5–11**). En los eucariotas, estos cebadores tienen aproximadamente 10 nucleótidos de longitud y son sintetizados a intervalos de 100-200 nucleótidos sobre la cadena retrasada.

La estructura química del RNA se presentó en el Capítulo 1 y se describe con detalle en el Capítulo 6. Solamente destacaremos que la estructura del RNA es muy parecida a la del DNA. Una cadena de RNA puede formar bases apareadas con una cadena de DNA, generando híbridos DNA/RNA de doble hélice si las dos secuencias de nucleótidos son complementarias. Así, el mismo principio de patrón usado para la síntesis de DNA guía la síntesis de cebadores de RNA. Dado que un cebador de RNA contiene un nucleótido apareado adecuadamente con un grupo 3'-OH en un extremo, el RNA puede elongarse mediante la DNA polimerasa por este extremo empezando un fragmento de Okazaki. La síntesis de cada fragmento de Okazaki acaba cuando la DNA polimerasa se encuentra con el cebador de RNA unido al extremo 5' del fragmento anterior de DNA. Para producir una cadena continua de DNA a partir del gran número de fragmentos sintetizados sobre la cadena retrasada, actúa con rapidez un sistema especial de reparación del DNA que elimina el cebador de RNA y lo sustituye por DNA. A continuación, una enzima llamada **DNA ligasa** une el extremo 3' de cada nuevo fragmento de DNA al extremo 5' del fragmento anterior y completa todo el proceso (**Figuras 5–12 y 5–13**).

¿Por qué se tiene que sintetizar un RNA cebador, que luego se tendrá que eliminar, en lugar de utilizar un cebador de DNA que no sería necesario eliminar? El argumento de que una polimerasa autocorrectora no puede iniciar cadenas *de novo* también implica lo contrario: una enzima capaz de iniciar cadenas *de novo* no puede presentar un sistema eficiente de autocorrección. Por consiguiente, cualquier enzima que inicie la síntesis de los fragmentos de Okazaki producirá, por necesidad, una copia relativamente incorrecta (con un error cada 10^5 bases, por lo menos). Incluso aunque la cantidad que se conservara de esta copia en el producto final constituyera una parte tan pequeña como el 5% del genoma total (p. ej., 10 nucleótidos por cada fragmento de DNA de 200 nucleótidos), el incremento resultante de la frecuencia general de mutación sería enorme. Por consiguiente, parece razonable que la utilización de moléculas de RNA como cebador en lugar de moléculas de DNA suponga una poderosa ventaja evolutiva, ya que los ribonucleótidos del cebador marcan automáticamente estas secuencias como "copia dudosa" que debe ser eliminada y reemplazada.

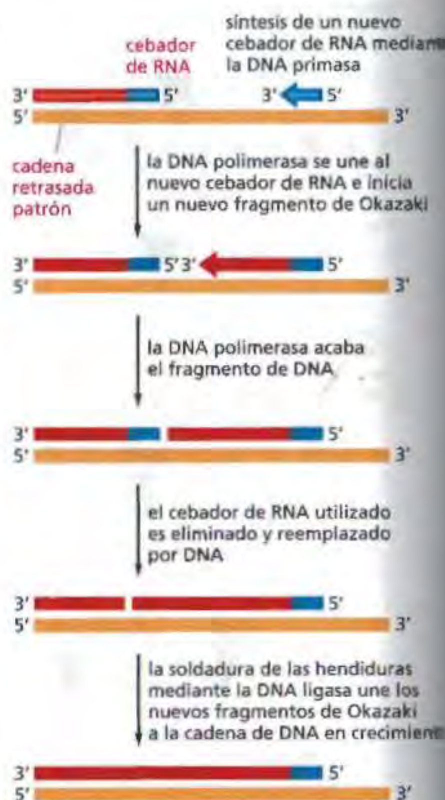


Figura 5–12 Síntesis de uno de los muchos fragmentos de DNA sobre la cadena retrasada. En los eucariotas, los cebadores de RNA sobre la cadena retrasada se presentan a intervalos de unos 200 nucleótidos, cada uno de los cuales tiene unos 10 nucleótidos de longitud. El cebador es eliminado por una enzima especial de reparación de DNA (una RNAsa H) que reconoce una cadena de RNA de una hélice RNA/DNA y la fragmenta; esta intervención produce una hendidura que es rellenada por la DNA polimerasa y la DNA ligasa.

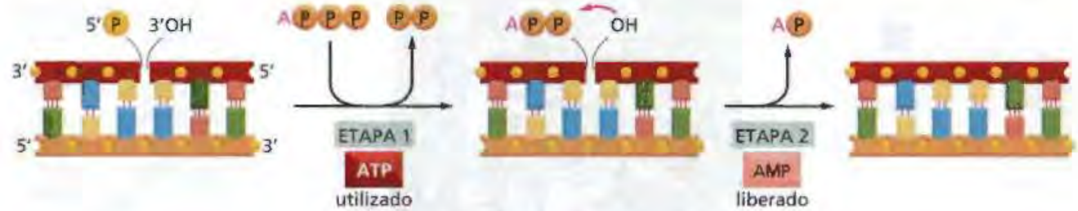


Figura 5–13 Reacción que cataliza la DNA ligasa. Esta enzima sella los enlaces fosfodiéster que se han cortado. Como se indica, la DNA ligasa utiliza una molécula de ATP para activar el extremo 5' en la hendidura (etapa 1) antes de formar el nuevo enlace (etapa 2). De este modo, la reacción de sellado de la hendidura, que no es energéticamente favorable, se puede realizar acoplándose a un proceso de hidrólisis de ATP energéticamente favorable.

Unas proteínas especiales ayudan a abrir la doble hélice del DNA por delante de la horquilla de replicación

Para que la síntesis de DNA se lleve a cabo, la doble hélice de DNA tiene que ir abriéndose rápidamente por delante de la horquilla de replicación, de manera que los desoxirribonucleósidos trifosfato entrantes puedan aparearse con los de la cadena patrón. Sin embargo, la doble hélice de DNA es muy estable en condiciones fisiológicas: los pares de bases están tan bien encajados en su lugar, que se requieren temperaturas próximas a las de ebullición del agua para separar las dos cadenas en un tubo de ensayo. Por esta razón se necesitan dos tipos de proteínas de replicación adicionales para abrir la doble hélice: las DNA helicasas y las proteínas de unión a DNA de cadena sencilla; este sistema proporciona así una cadena patrón de DNA apropiada para que la DNA polimerasa pueda copiarla.

Las **DNA helicasas** fueron aisladas inicialmente como proteínas que hidrolizan ATP cuando se unen a moléculas de DNA de una sola cadena. Como se describe en el Capítulo 3, la hidrólisis de ATP varía de forma cíclica la conformación de una molécula proteica y permite a la proteína realizar trabajos mecánicos. Las DNA helicasas utilizan este principio general para desplazarse con rapidez a lo largo de DNA de una sola cadena; cuando encuentran una región de doble hélice, continúan desplazándose por la misma cadena, desenrollando así la hélice a una velocidad de hasta 1000 pares de nucleótidos por segundo (**Figuras 5–14** y **5–15**).

Las dos cadenas de DNA tienen polaridades opuestas y, en principio, una helicasa puede desenrollar la doble hélice de DNA desplazándose en sentido 5' a 3' a lo largo de una de las cadenas o bien en sentido 3' a 5' a lo largo de la otra. De hecho, existen ambos tipos de DNA helicasas. En el sistema de replicación mejor entendido de bacterias, parece que la helicasa que se desplaza en sentido 5' a 3' por la cadena retrasada es la que desempeña el papel principal, por razones que pronto quedarán aclaradas.

Las **proteínas de unión a DNA de cadena sencilla** (SSB: ***single-strand DNA-binding***) –también llamadas *proteínas desestabilizadoras de la hélice*– se unen fuertemente y de un modo cooperativo a cadenas de DNA abiertas, sin obturar las bases de la cadena, las cuales, por lo tanto, quedan disponibles para actuar como patrón. Estas proteínas no son capaces de abrir de forma directa una larga cadena de DNA, pero colaboran con las helicasas estabilizando la conformación desenrollada de las cadenas sencillas. Además, su unión cooperativa recubre por completo las regiones de DNA de cadena sencilla de la cadena retrasada y evita así la formación de cortas hélices en forma de horquilla que se forman rápidamente en cadenas sencillas de DNA (**Figuras 5–16** y **5–17**), que impedirían la actuación de la DNA polimerasa.

Una abrazadera deslizante mantiene unida al DNA una molécula de DNA polimerasa móvil

La mayoría de las DNA polimerasas sólo sintetizan, por sí mismas, cadenas cortas de nucleótidos antes de separarse del DNA patrón. Esta tendencia a dejar rápidamente la molé-

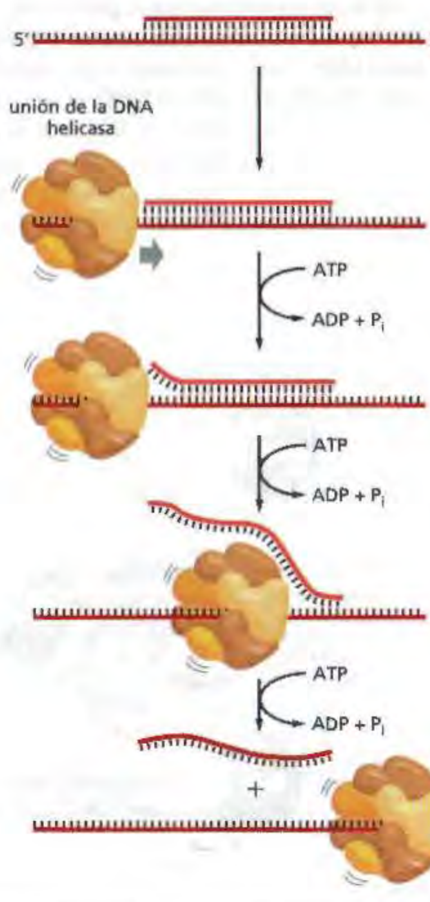


Figura 5–14 Ensayo utilizado para medir la actividad de las DNA helicasas. Un corto fragmento de DNA se hibrida con una larga cadena sencilla de DNA formando una región de DNA de doble hélice. La doble hélice se deshace a medida que la helicasa se desplaza a lo largo de la cadena sencilla de DNA y libera el fragmento corto de DNA. Esta reacción necesita la presencia tanto de la proteína helicasa como de ATP. La hidrólisis del ATP hace posible el rápido desplazamiento de la helicasa (véase Figura 3–77). Como se indica, muchas helicasas están formadas por seis subunidades.

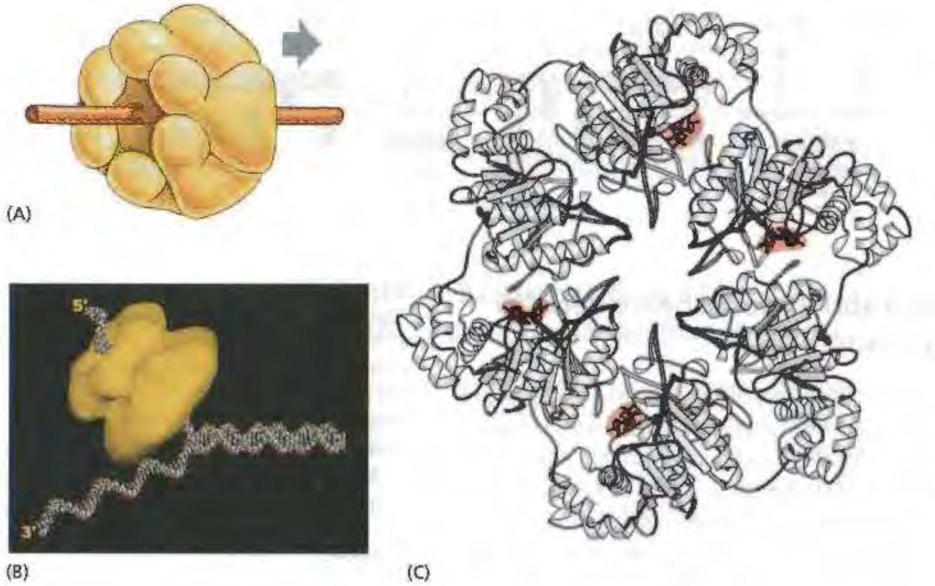


Figura 5–15 Estructura de una DNA helicasa. <TGCC> (A) Representación esquemática de la proteína como un anillo hexamérico. (B) Representación esquemática mostrando la horquilla de replicación de DNA y la helicasa a escala. (C) Estructura detallada de la helicasa replicativa del bacteriófago T7, determinada por difracción de rayos X. Existen seis subunidades idénticas que se unen a ATP y lo hidrolizan a través de un proceso ordenado, propulsando la molécula de helicasa como una máquina de rotación a lo largo de la cadena sencilla de DNA que la atraviesa a través del agujero central. Las moléculas de ATP unidas a la estructura están marcadas en *rojo*. (B, cortesía de Edward H. Egelman; C, a partir de M.R. Singleton et al., *Cell* 101:589-600, 2000. Con la autorización de Elsevier.)

cula de DNA permite a la molécula de DNA polimerasa que acaba de sintetizar un fragmento de Okazaki sobre la cadena retrasada, reciclarse rápidamente, empezando de nuevo a sintetizar el siguiente fragmento de Okazaki sobre la misma cadena. Sin embargo, esta rápida disociación supondría una dificultad para que la polimerasa sintetizara largas cadenas de DNA en la horquilla de replicación, si no existiera una proteína accesoria que actuase como una **abrazadera deslizante** regulada. Esta abrazadera mantiene la polimerasa unida con firmeza al DNA cuando se desplaza, pero la libera en cuanto la polimerasa se detiene ante una región de doble cadena.

¿Cómo puede impedir una abrazadera deslizante que la polimerasa se disocie sin impedir al mismo tiempo que la polimerasa se desplace con rapidez a lo largo de la molécula de DNA? La estructura tridimensional que tiene la proteína abrazadera, determinada por difracción de rayos X, indica que esta proteína forma un amplio anillo alrededor de la doble hélice de DNA. Un lado del anillo se une a la parte posterior de la DNA polimerasa y el anillo completo se desliza libremente a medida que la polimerasa se desplaza a lo largo de la cadena de DNA. El ensamblaje de la abrazadera alrededor del DNA requiere una hidrólisis de ATP mediante un complejo de proteínas especial, el denominado **cargador de la abrazadera**, que hidroliza el ATP uniendo la abrazadera al complejo patrón-cebador (**Figura 5–18**).

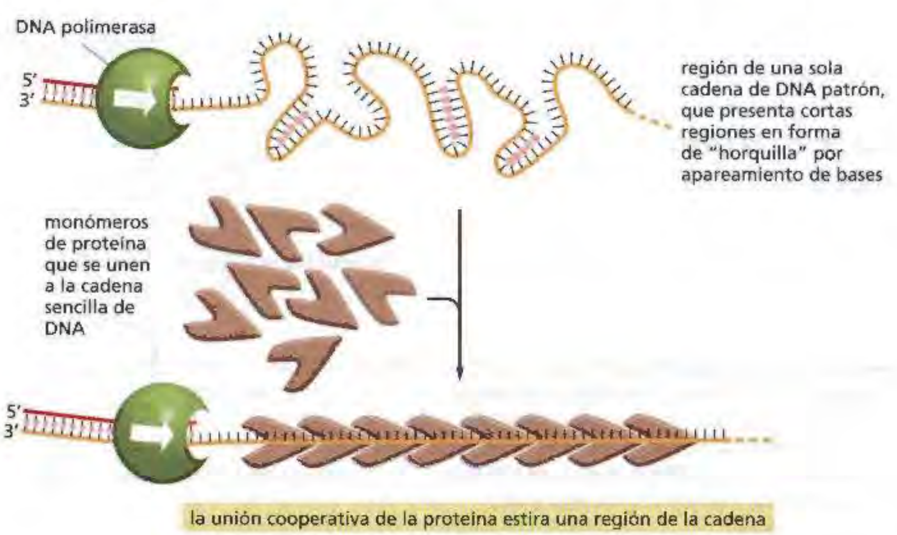


Figura 5–16 Efecto de las proteínas de unión a DNA de una sola cadena (proteínas SSB) sobre la propia estructura del DNA de cadena sencilla. Cada molécula de proteína se une preferentemente a otra molécula que ya se ha unido, por lo que sobre la cadena sencilla de DNA se forman largas hileras de estas proteínas. Esta *unión cooperativa* provoca un estiramiento de la cadena patrón de DNA y facilita el proceso de polimerización del DNA. Las "hélices en horquilla" que aparecen en la molécula de DNA de cadena sencilla se producen por apareamiento de bases entre cortas regiones de secuencias complementarias dentro de la propia cadena. Son semejantes a las pequeñas hélices que se forman típicamente en las moléculas de RNA (véase Figura 1–6).

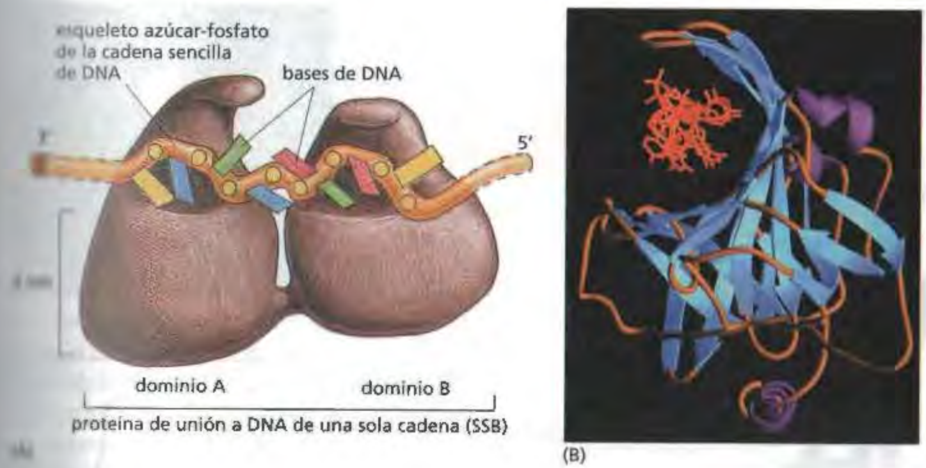


Figura 5–17 Estructura de la proteína humana de unión a DNA de una sola cadena unida al DNA. (A) Vista frontal de los dos dominios de unión al DNA de la proteína RPA, que cubre un total de ocho nucleótidos. En este complejo de proteína-DNA, las bases de DNA permanecen expuestas. (B) Diagrama que muestra la estructura tridimensional, con la cadena de DNA (*rojo*) vista desde su parte final. (B, a partir de A. Bochkarev et al., *Nature* 385:176-181, 1997. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

En el patrón de la cadena conductora, la DNA polimerasa que se desplaza está fuertemente unida a la abrazadera y ambas permanecen asociadas durante un largo periodo de tiempo. La DNA polimerasa que está sobre el patrón de la cadena retrasada también utiliza la abrazadera pero, cada vez que llega al extremo 5' del fragmento de Okazaki precedente, la polimerasa se libera de la abrazadera y, por tanto, se separa de la cadena patrón. Esta molécula de polimerasa se asocia a una nueva abrazadera en el cebador de RNA del siguiente fragmento de Okazaki.

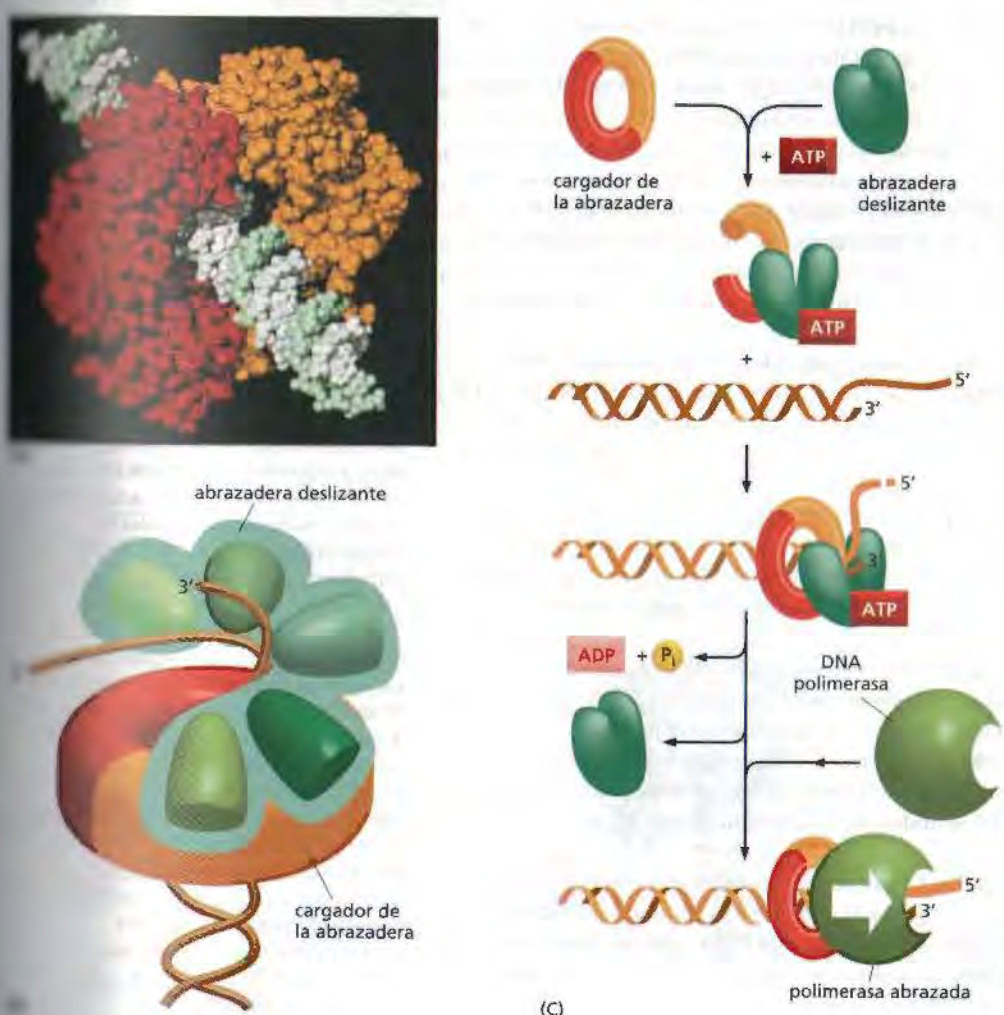


Figura 5–18 La abrazadera deslizante regulada que une la DNA polimerasa al DNA. (A) Estructura de la abrazadera deslizante de *E. coli*, determinada por cristalografía de rayos X. Se ha añadido una hélice de DNA para indicar de qué forma la proteína se ajusta alrededor del DNA. (B) La estructura del cargador de la abrazadera, formada por cinco subunidades, recuerda a la de un tornillo, con la rosca encajando en las ranuras del DNA. Parece que se apriete alrededor de la unión con el cebador hasta que su progreso queda bloqueado por el extremo 3' del cebador, momento en el que el cargador hidroliza el ATP y libera la abrazadera. (C) Ilustración esquemática mostrando cómo se ensambla la abrazadera uniéndose a una molécula de DNA polimerasa que se desplaza sobre el DNA. En la reacción simplificada que se muestra, el cargador de la abrazadera se disocia al medio una vez se ha formado el complejo entre la abrazadera deslizante y la DNA polimerasa. En una horquilla de replicación real, el cargador de la abrazadera permanece próximo a la polimerasa de la cadena retrasada, preparado para asociarse a una nueva abrazadera al inicio de cada nuevo fragmento de Okazaki (véase Figura 5–19). (A, a partir de X.P. Kong et al., *Cell* 69:425-437, 1992. Con la autorización de Elsevier. C, a partir de G.D. Bowman, M. O'Donnell y J. Kuriyan, *Nature* 429:708-709, 2004. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

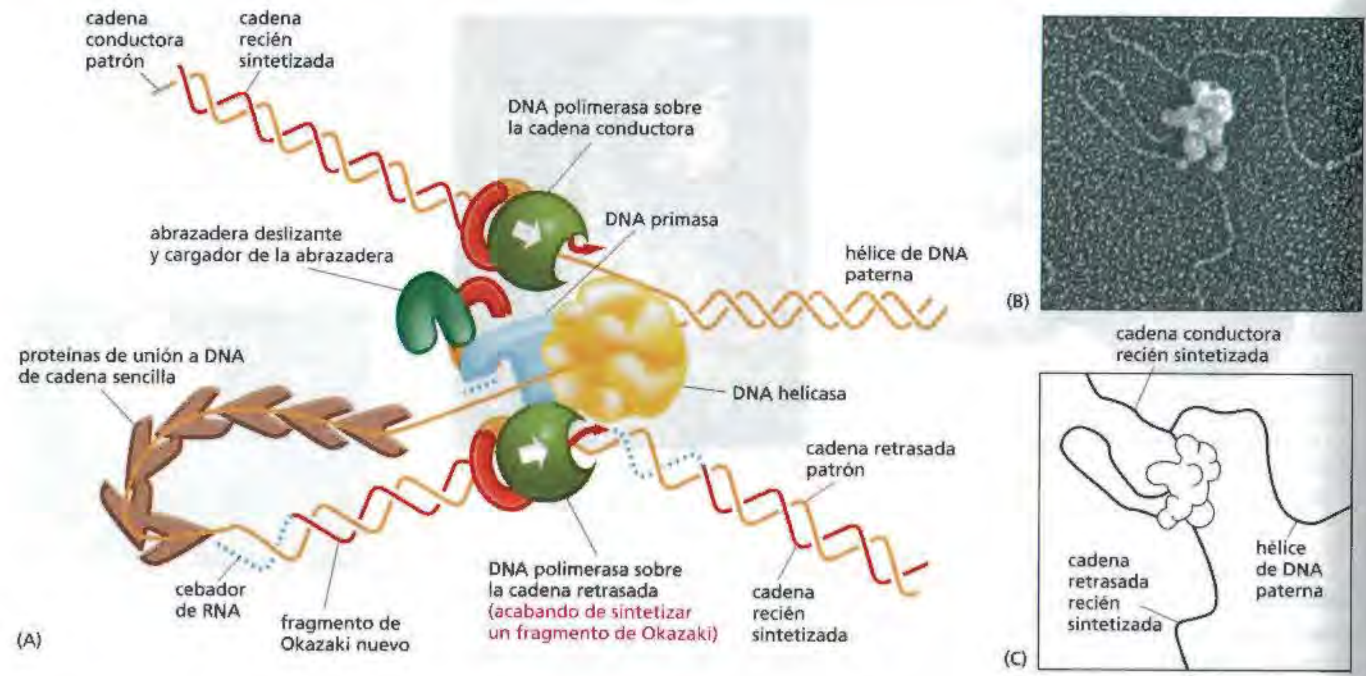


Figura 5–19 Horquilla de replicación en movimiento. (A) Este esquema muestra la visión actual de la situación de las proteínas de replicación sobre la horquilla de replicación cuando se está sintetizando DNA. La cadena retrasada se ha plegado para permitir que la molécula de DNA polimerasa situada sobre la cadena retrasada forme un complejo con la molécula de DNA polimerasa de la cadena conductora. Este plegamiento también consigue que el extremo 3' de cada fragmento de Okazaki completo quede situado cerca del lugar de inicio del siguiente fragmento de Okazaki. Debido a que la DNA polimerasa de la cadena retrasada permanece unida al resto de proteínas de replicación, puede ser reutilizada para sintetizar los sucesivos fragmentos de Okazaki. En el esquema que mostramos, está a punto de dejar su fragmento de DNA completado y de desplazarse hasta el cebador de RNA que se sintetizará en las proximidades, necesario para iniciar el siguiente fragmento de DNA. Otras proteínas adicionales (que no se muestran) ayudan a mantener unidos todos los componentes proteicos en la horquilla, permitiendo que todos ellos actúen como una máquina proteica bien coordinada. <AATA> <CCCG> (B) Electromicrografía que muestra la maquinaria de replicación del bacteriófago T4 cuando se desplaza a lo largo de un DNA patrón, sintetizándose el DNA por detrás de la horquilla. (C) Interpretación de la imagen obtenida con el microscopio electrónico: nótese especialmente el bucle de DNA en la cadena retrasada. Aparentemente, las proteínas de replicación se separan de forma parcial de la parte más frontal de la horquilla de replicación durante la preparación de esta muestra para electromicroscopía. (B, cortesía de Jack Griffith; véase P.D. Chastain et al., *J. Biol. Chem.* 278:21276-21285, 2003.)

En la horquilla de replicación, una serie de proteínas cooperan entre sí formando una "maquinaria de replicación"

A pesar de que hemos presentado la replicación del DNA como un proceso en el que participan una serie de proteínas de replicación que actúan independientemente unas de las otras, en realidad muchas de estas proteínas se hallan unidas entre sí formando un gran complejo multienzimático organizado que sintetiza rápidamente el DNA. Este complejo puede compararse con una diminuta máquina de coser compuesta por piezas proteicas y accionada por la hidrólisis de moléculas nucleósido trifosfato. Como en una máquina de coser, el complejo de replicación permanece probablemente estacionario respecto a lo que lo rodea. Se puede imaginar que el DNA es como un largo pedazo de tela que es cosido rápidamente. A pesar de que este complejo de replicación sólo se ha caracterizado por completo en la bacteria *E. coli* y en algunos de sus virus, el de los eucariotas es muy similar, como veremos más adelante.

La **Figura 5–19A** resume las funciones de las subunidades de esta maquinaria de replicación. En el inicio de la horquilla de replicación, la DNA helicasa abre la hélice de DNA. En la horquilla de replicación actúan dos moléculas de DNA polimerasa, una en la cadena conductora y la otra en la cadena retrasada. Mientras que la molécula de la DNA polimerasa que actúa sobre la cadena conductora puede proceder de una forma continua, la molécula de DNA polimerasa que actúa sobre la cadena retrasada tiene que volver a empezar a intervalos, utilizando como cebador segmentos cortos de RNA sintetizados por una molécula de DNA primasa. La estrecha asociación de estos componentes proteicos aumenta la eficiencia de la replicación y es posible gracias al plegamiento de la cadena retrasada tal como se indica en la Figura 5–19A.

Este ordenamiento también facilita la unión de la abrazadera de la polimerasa cada vez que se sintetiza un fragmento de Okazaki: el cargador de la abrazadera y la DNA polimerasa de la cadena retrasada se mantienen en su lugar como parte de la maquinaria proteica, incluso cuando se separan de su patrón de DNA. Así pues, las proteínas de replicación se mantienen unidas entre sí formando una gran unidad (peso molecular total > 10^6 dalton) que permite la síntesis de DNA en los dos sentidos de la horquilla de una forma totalmente coordinada y eficiente.

Esta maquinaria de replicación de DNA va dejando tras de sí series de fragmentos de Okazaki sobre la cadena retrasada, los cuales todavía tienen en sus extremos 5' los pequeños trozos de RNA que actuaron como cebadores para su síntesis. Estos trozos de RNA deben ser eliminados y los fragmentos de DNA deberán unirse entre sí mediante enzimas reparadoras de DNA que actuarán detrás de la horquilla de replicación (véase la Figura 5–12).

Un sistema de corrección de errores de apareamiento elimina los errores de replicación producidos por la maquinaria de replicación

Como apuntamos, las bacterias como *E. coli* son capaces de dividirse cada 40 minutos, por lo que es relativamente sencillo estudiar grandes poblaciones buscando mutantes raros que tengan alterados determinados procesos. Una clase interesante de mutantes son los que presentan alteraciones en los llamados *genes mutadores*, que incrementan de forma notable la frecuencia de mutación espontánea. No es sorprendente que uno de estos genes mutadores codifique una forma defectuosa de la exonucleasa correctora 3' a 5', que es una subunidad de la enzima DNA polimerasa (véase Figuras 5–8 y 5–9). La DNA polimerasa mutante no corrige de forma efectiva y en el DNA se van acumulando una serie de errores de replicación que normalmente serían eliminados.

El estudio de otros mutantes de *E. coli* que presentan proporciones de mutaciones más elevadas de lo normal ha permitido descubrir otro sistema corrección de pruebas que normalmente elimina errores de replicación que no son detectados por el sistema de la exonucleasa. Este sistema de **corrección de errores de apareamiento** detecta la distorsión potencial sobre la hélice provocada por un desajuste entre bases que no son complementarias.

Si este sistema de corrección reconociera simplemente un error de ajuste en una cadena de DNA acabada de replicar y eliminara de forma aleatoria uno de los dos nucleótidos que no encajan, podría cometer el error de "corregir" la cadena patrón original y una de cada dos ocasiones mantendría el error. Para que un sistema de corrección de pruebas sea efectivo, tiene que ser capaz de distinguir cuál es el nucleótido equivocado y eliminarlo de forma específica de la cadena acabada de sintetizar, que es donde se produjo el error de replicación.

El sistema de reconocimiento utilizado por el sistema de corrección de errores de apareamiento de *E. coli* depende de la metilación de determinados residuos A del DNA. Transcurrido un cierto tiempo después de que los A se hayan incorporado a la cadena de DNA acabada de sintetizar, se añaden grupos metilo a todos los residuos A que se encuentren en la secuencia GATC. Dado que únicamente contendrán secuencias GATC no metiladas las cadenas acabadas de sintetizar y que se encuentren justo detrás de la horquilla de replicación, será posible distinguir estas cadenas de las originales que se han utilizado como patrón. Este proceso en tres etapas incluye el reconocimiento de un error de apareamiento, la escisión del segmento de DNA que contiene el error de la cadena de DNA recién sintetizada y la resíntesis del fragmento escindido utilizando la cadena original como patrón. Este sistema de corrección de errores de apareamiento reduce el número de errores cometidos durante la replicación del DNA por un factor adicional de 100 (véase Tabla 5–1, p. 271).

En las células humanas funciona un sistema de corrección de errores de apareamiento similar a este (**Figura 5–20**). En humanos, la importancia de este sistema queda evidenciada en individuos que heredan una copia defectuosa de un gen reparador de errores (junto con



Figura 5–20 Un modelo de la corrección de errores de apareamiento en eucariotas. (A) Las dos proteínas que se muestran están presentes tanto en bacterias como en células eucariotas: MutS se une específicamente a un par de bases mal apareado, mientras que MutL rastrea el DNA cercano en busca de una muesca. Cuando MutL encuentra una muesca, provoca la degradación hacia atrás de la cadena que la contiene hasta las bases mal apareadas. Debido a que en eucariotas las muescas casi sólo se encuentran en las cadenas replicadas, los errores de replicación son eliminados de forma selectiva. En bacterias, el mecanismo es el mismo, excepto que una proteína adicional del complejo (MutH) corta secuencias GATC no metiladas (y, por consiguiente, recién sintetizadas), e inicia el proceso que se ilustra. (B) Estructura de la proteína MutS unida a un DNA mal apareado. Esta proteína es un dímero, que sujeta la doble hélice de DNA tal como se indica, enroscando el DNA donde están las bases mal apareadas. Parece ser que la proteína MutS rastrea el DNA en busca de apareamientos incorrectos, comprobando los lugares que pueden ser enroscados rápidamente, que son precisamente aquellos en los que hay un apareamiento de bases no complementarias. (B, a partir de G. Obmolova et al., *Nature* 407:703-710, 2000. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

un gen funcional en la otra copia del cromosoma). Estas personas tienen una marcada predisposición para ciertos tipos de cáncer. Por ejemplo, en un tipo de cáncer de colon llamado *cáncer de colon hereditario no poliposo* (*HNPCC: hereditary nonpolyposis colon cancer*), mutaciones espontáneas en el gen funcional que queda, producen un clon de células somáticas que acumulan mutaciones de forma extraordinariamente rápida, debido a que son deficientes en el sistema de corrección de errores de apareamiento. La mayoría de cánceres aparecen en células que han acumulado varias mutaciones (véase Figura 20–11), por lo que las células deficientes en este sistema de corrección de pruebas tienen una probabilidad mucho mayor de transformarse en cancerosas. Afortunadamente, la mayoría de nosotros heredamos dos copias correctas de cada gen que codifican una proteína para la corrección de errores; este sistema nos protege, porque es muy improbable que ambas copias muten en la misma célula.

En eucariotas, el mecanismo para distinguir la cadena recién sintetizada de la cadena patrón original en el lugar donde se produce el error de apareamiento no depende de la metilación del DNA. Es más, algunos eucariotas –entre los que se incluyen las levaduras y *Drosophila*– no metilan nunca su DNA. Las cadenas retrasadas de DNA acabadas de sintetizar contienen *muescas* de forma transitoria (antes de ser selladas por la DNA ligasa) y experimentos bioquímicos han revelado que este tipo de muescas (también llamadas *roturas de una de las dos cadenas*) proporcionan la señal que dirige las correcciones a la cadena adecuada (véase Figura 5–20). Esta idea requiere que la cadena de DNA recién sintetizada sobre la cadena conductora también contenga muescas; la forma en que esto ocurre todavía se desconoce.

Las DNA topoisomerasas evitan que el DNA se enrede durante la replicación

A medida que una horquilla de replicación se va desplazando a lo largo de una doble cadena de DNA, genera lo que se ha llamado un "problema del enrollamiento y empaquetamiento": 10 pares de bases replicadas en la horquilla corresponden a una vuelta completa del DNA que se replica alrededor del eje de la doble hélice. Así pues, para que la horquilla de replicación pueda desplazarse, todo el cromosoma que está por delante de la horquilla tendría que girar rápidamente (**Figura 5–21**), lo que exigiría la utilización de grandes cantidades de energía en el caso de los cromosomas largos. Por ello, durante la replicación del DNA se utiliza una estrategia alternativa: unas proteínas conocidas como **DNA topoisomerasas** forman un lugar de giro en la hélice del DNA.

Puede considerarse que una DNA topoisomerasa es una especie de nucleasa reversible que se une covalentemente a un fosfato del DNA rompiendo un enlace fosfodiéster de una cadena del DNA. Esta reacción es reversible y el enlace fosfodiéster se vuelve a formar en cuanto la proteína se separa.

Un tipo de topoisomerasa, llamada *topoisomerasa I*, genera de forma transitoria una rotura en una sola cadena (una muesca). Esta rotura en el esqueleto fosfodiéster permite a las dos secciones de la hélice del DNA, situadas a cada lado de la muesca, girar libremente una respecto a la otra utilizando como punto de giro el enlace fosfodiéster de la cadena opuesta a la que se ha producido la muesca (**Figura 5–22**). Cualquier tensión que se genere en la hélice de DNA dirigirá la rotación en el sentido en el que esta tensión se disipe. Como resultado de ello, la replicación del DNA podrá ocurrir sólo con la rotación de un corto tramo de la hélice –la zona justo por delante de la horquilla. Dado que el enlace covalente que une la topoisomerasa al fosfato del DNA retiene la energía del enlace fosfodiéster roto, la nueva formación del enlace fosfodiéster es rápida y no requiere ningún aporte adicional de energía. En este aspecto, el mecanismo de unión difiere del que cataliza la enzima DNA ligasa, descrito previamente (véase Figura 5–13).

Un segundo tipo de DNA topoisomerasa, la *topoisomerasa II*, forma una unión covalente con ambas cadenas de la hélice de DNA al mismo tiempo, generando transitoriamente una *rotura en las dos cadenas* del DNA. Estas enzimas se activan por determinadas zonas del cromosoma en las que dos dobles hélices se cruzan entre sí. Cuando la topoisomerasa se une a un lugar de cruce como éste, la proteína utiliza la hidrólisis de ATP para llevar a cabo de forma eficiente las siguientes reacciones: (1) rompe una de las dobles hélices, de forma reversible, generando una "puerta" en el DNA; (2) hace que la otra doble hélice pase a través de esta rotura, y (3) vuelve a unir las cadenas de DNA que había roto y se separa del DNA (**Figura 5–23**). De esta forma, las DNA topoisomerasas de tipo II pueden separar de forma eficiente dos anillos de DNA entrelazados (**Figura 5–24**).

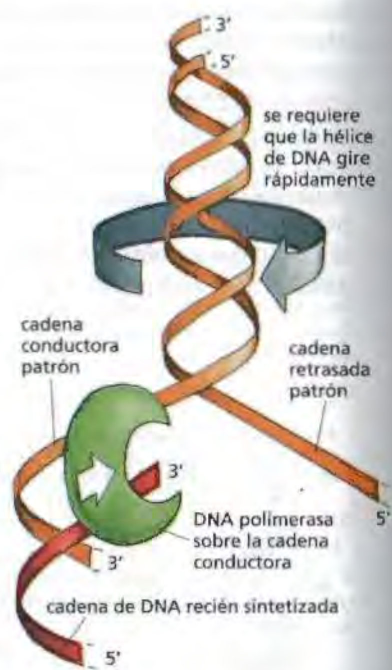


Figura 5–21 El "problema de enrollamiento" que aparece durante el proceso de replicación del DNA. Si se trata de una horquilla de replicación bacteriana que se desplaza a 500 nucleótidos por segundo, la hélice paterna de DNA, situada por delante de la horquilla, tiene que girar a 50 revoluciones por segundo.

Esta misma reacción evita que se generen los graves problemas de enmarañamiento que, en caso contrario, aparecerían durante la replicación del DNA. Este papel queda bien ilustrado en mutantes de células de levadura que, en lugar de la topoisomerasa II normal, producen una versión que se inactiva por encima de 37 °C. Cuando las levaduras mutantes se calientan hasta esta temperatura, sus cromosomas hijos quedan entrelazados después

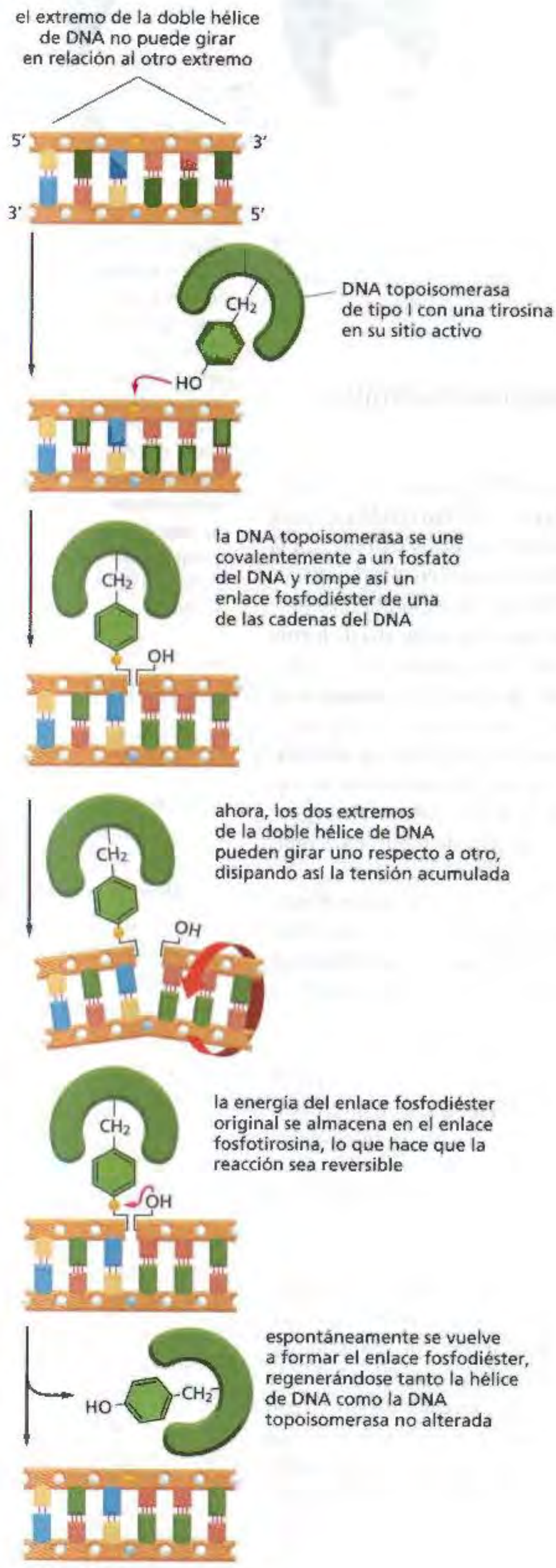


Figura 5–22 Reacción reversible de formación de una muesca en el DNA, catalizada por una enzima DNA topoisomerasa I eucariota. Tal como se indica, estas enzimas forman un enlace covalente transitorio con el DNA y así permiten la libre rotación alrededor del enlace covalente unido al fosfato *azul*.

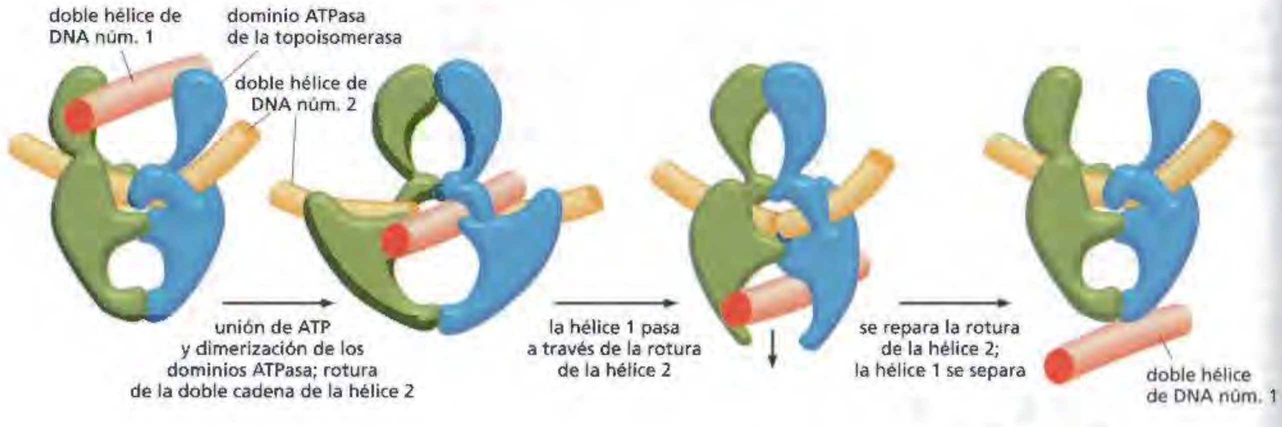


Figura 5–23 **Modelo de acción de la topoisomerasa II.** Tal como se muestra, la unión de ATP a los dos dominios ATPasa provoca su dimerización y las reacciones que se indican. Parece que la hidrólisis del ATP sólo es necesaria para recomponer la enzima para un nuevo ciclo de reacciones, ya que puede darse un ciclo de reacciones en presencia de un análogo de ATP no hidrolizable. Este modelo está basado en la estructura de la enzima en combinación con experimentos bioquímicos. (Modificado a partir de J.M. Berger, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:26-32, 1998. Con la autorización de Elsevier.)

del proceso de replicación de DNA y no pueden separarse. La utilidad de la topoisomerasa II para desenmarañar los cromosomas se puede comprender fácilmente por cualquiera que haya intentado deshacer un nudo de un hilo de pescar sin la ayuda de unas tijeras.

La replicación del DNA en los eucariotas es básicamente similar a la de los procariotas

La mayor parte de lo que conocemos respecto a la replicación del DNA procede de estudios sobre sistemas multienzimáticos purificados a partir de bacterias y de bacteriófagos, que son capaces de realizar *in vitro* la replicación del DNA. El desarrollo de estos sistemas en la década de 1970 tuvo como condición previa la disponibilidad de mutantes en diversos genes de replicación que pudieron utilizarse para identificar y purificar las correspondientes proteínas de replicación. El primer sistema de replicación en mamíferos que replicaba de forma exacta DNA *in vitro* se describió a mediados de la década de 1980. Actualmente se han aislado y analizado mutaciones de genes que codifican prácticamente todos los componentes de replicación que utiliza la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Como resultado de estos estudios, se conoce con bastante detalle la enzimología de la replicación del DNA en los eucariotas y queda claro que a lo largo de la evolución que separó bacterias de eucariotas se han conservado las características fundamentales de la replicación del DNA, incluyendo la geometría de la horquilla de replicación y la utilización de una maquinaria de replicación multiproteica.

En eucariotas, la maquinaria de replicación está formada por más componentes proteicos que en sus homólogas de bacterias, a pesar de que las funciones básicas son las mismas. Así, por ejemplo, la proteína de unión a DNA de cadena sencilla (SSB: ***s**ingle-**s**trand **b**inding*) en eucariotas está formada por tres subunidades, mientras que en bacterias solamente tiene una subunidad. De forma similar, la DNA primasa de eucariotas es incorporada a una enzima con varias subunidades que también contiene la llamada DNA polimerasa α-primasa. Este complejo proteico empieza cada fragmento de Okazaki en la cadena retrasada con RNA y luego alarga el cebador de RNA con un fragmento corto de DNA. Llegado este punto, entran en juego las dos principales polimerasas de replicación en eucariotas, δ y ε, y completan cada fragmento de Okazaki, mientras que simultáneamente extienden la cadena conductora. La manera como se distribuyen las tareas de síntesis de la cadena conductora y retrasada entre estas dos polimerasas todavía no se conoce completamente.

Como veremos en la próxima sección, la maquinaria de replicación de eucariotas tiene la complicación añadida de tener que replicar el DNA entre nucleosomas, que son las unidades estructurales repetitivas de los cromosomas, descritas en el Capítulo 4. Los nucleosomas están distribuidos a lo largo del DNA, a intervalos de 200 pares de bases, lo que podría explicar por qué en los eucariotas los fragmentos de Okazaki se sintetizan sobre la cadena retrasada a intervalos de entre 100 y 200 nucleótidos y no a intervalos de entre 1000 y 2000 nucleótidos como ocurre en las bacterias. Los nucleosomas también actúan como barreras que frenan el desplazamiento de las moléculas de DNA polimerasa, lo cual puede ser la causa fundamental de que las horquillas de replicación se desplacen a aproximadamente una décima parte de la velocidad a la que se desplazan las horquillas de replicación en las bacterias.

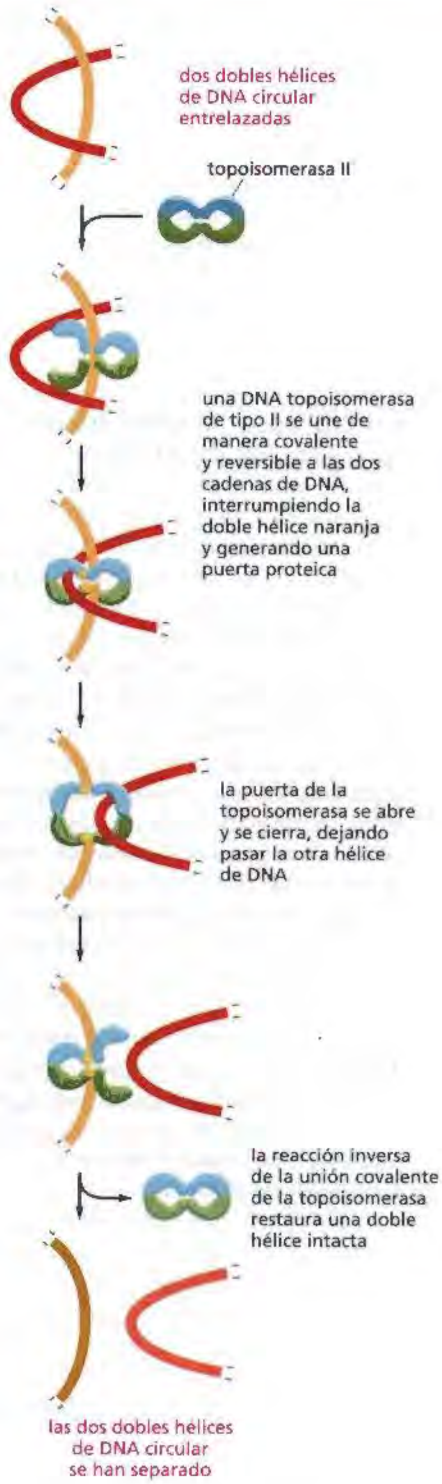


Figura 5–24 Reacción de "paso a través de la hélice de DNA" catalizada por la DNA topoisomerasa II. Se utilizan reacciones idénticas a ésta para desenredar el DNA dentro de la célula. A diferencia de la topoisomerasa de tipo I, las topoisomerasas de tipo II requieren la hidrólisis de ATP y algunas de las versiones bacterianas pueden introducir en el DNA tensión superhelicoidal. En eucariotas, las topoisomerasas de tipo II se hallan casi exclusivamente en células proliferantes; en parte por esta razón, son muy utilizadas como dianas para fármacos anticancerosos.

Resumen

La replicación del DNA tiene lugar en una estructura en forma de Y llamada horquilla de replicación. Una DNA polimerasa autocorrectora cataliza la polimerización de nucleótidos en sentido 5' a 3' copiando un patrón de DNA con una fidelidad notable. Puesto que las dos cadenas de una doble hélice de DNA son antiparalelas, esta síntesis 5' a 3' del DNA sólo puede ocurrir de forma continua en una de las dos cadenas (la cadena conductora) de la horquilla de replicación. En la cadena retrasada se sintetizan pequeños fragmentos de DNA mediante un proceso de "punto hacia atrás". Debido a que la DNA polimerasa autocorrectora no puede iniciar la síntesis de una cadena de DNA, estos fragmentos de DNA sobre la cadena retrasada se inician mediante cortas moléculas de cebador de RNA, las cuales serán eliminadas más tarde y sustituidas por DNA.

La replicación del DNA requiere la cooperación de muchas proteínas, entre las cuales se encuentran: (1) una DNA polimerasa y una DNA primasa, que catalizan la polimerización de nucleósidos trifosfato, (2) DNA helicasas y proteínas de unión a DNA de cadena sencilla, que colaboran en la apertura de la hélice de DNA que se va a copiar, (3) una DNA ligasa y una enzima que degrada los cebadores de RNA, uniendo los fragmentos de DNA de la cadena retrasada sintetizados de forma discontinua, y (4) DNA topoisomerasas que actúan solventando problemas de enrollamiento y enmarañamiento de la hélice. Muchas de estas proteínas se asocian unas con otras en la horquilla de replicación formando una "maquinaria de replicación" altamente eficiente, mediante la cual se coordinan las actividades y los movimientos espaciales de los componentes individuales.

INICIACIÓN Y TERMINACIÓN DE LA REPLICACIÓN DE DNA EN LOS CROMOSOMAS

Hemos visto cómo un conjunto de proteínas de replicación generan con fidelidad y rapidez las dobles hélices de DNA hijas mediante una horquilla de replicación. Pero, ¿cómo se ensambla esta maquinaria de replicación en el lugar de iniciación, y cómo se forman las horquillas de replicación en la molécula de DNA de doble cadena? En esta sección describiremos cómo las células inician la replicación del DNA y de qué forma regulan este proceso asegurando que se lleva a cabo no sólo en las posiciones correctas en el cromosoma sino también en el momento adecuado de la vida de la célula. También expondremos brevemente los problemas especiales que tiene que superar la maquinaria de replicación en las células eucariotas. Entre ellos, la necesidad de replicar las extraordinariamente largas moléculas de DNA que se encuentran en los cromosomas, así como la dificultad de copiar las moléculas de DNA que forman complejos muy cohesionados con histonas en los nucleosomas.

La síntesis de DNA empieza en los orígenes de replicación

Como se ha explicado, la doble hélice de DNA por lo general es muy estable: las dos cadenas de DNA están firmemente unidas entre sí por enlaces de hidrógeno formados entre las bases de cada cadena. Para poder utilizar el DNA como patrón, la doble hélice debe abrirse y permitir que las dos cadenas separadas expongan las bases desapareadas. Como veremos, el proceso de replicación del DNA empieza mediante *proteínas iniciadoras* especiales que se unen a la doble cadena de DNA, separan las dos cadenas y rompen los enlaces de hidrógeno entre las bases.

Las posiciones por las que se abre en primer lugar la hélice de DNA se denominan **orígenes de replicación** (**Figura 5–25**). En células sencillas como las bacterias o las levaduras, los orígenes están especificados por secuencias de DNA formadas por varios centenares de pares de nucleótidos. Este DNA contiene secuencias cortas que atraen a las proteínas inicia-

doras y además tramos de DNA especialmente fáciles de abrir. En la Figura 4–4 se describió cómo los pares de bases A-T se mantienen unidos por un número menor de enlaces de hidrógeno que los pares G-C. Así pues, el DNA que tiene más pares de bases A-T es más fácil de separar, por lo que los orígenes de replicación se encuentran en regiones de DNA enriquecidas en pares A-T.

A pesar de que el proceso básico de iniciación de la horquilla de replicación, descrito en la Figura 5–25, es fundamentalmente el mismo en bacterias y eucariotas, la forma detallada en que tiene lugar el proceso y su regulación difiere entre ambos grupos de organismos. Consideraremos primero el caso de las bacterias, porque es más sencillo y se conoce mejor, y luego describiremos la situación más compleja que se da en levaduras, mamíferos y otros eucariotas.

Los cromosomas bacterianos normalmente tienen un solo origen de replicación del DNA

El genoma de *E. coli* está contenido en una sola molécula circular de DNA de $4{,}6 \times 10^6$ pares de nucleótidos. La replicación del DNA empieza en un solo origen de replicación y las dos horquillas de replicación que se ensamblan en él se desplazan (a una velocidad aproximada de 500-1000 nucleótidos por segundo) en sentidos opuestos hasta que se encuentran aproximadamente a medio camino del cromosoma (**Figura 5–26**). El único punto en el que *E. coli* puede controlar la replicación de su DNA es al inicio: una vez la horquilla se ha ensamblado en el origen, se sintetiza DNA a una velocidad relativamente constante hasta terminar la replicación. De este modo, no es sorprendente que el inicio de la replicación del DNA esté muy regulado. El proceso comienza cuando varias copias de las proteínas iniciadoras se unen a lugares específicos en el origen de replicación, de manera que el DNA envuelve las proteínas formando un gran complejo proteína-DNA. Entonces, este complejo atrae a la DNA helicasa unida a un cargador de helicasa y ésta es cargada sobre una cadena sencilla de DNA adyacente cuyas bases han quedado expuestas tras el ensamblaje del complejo iniciador proteína-DNA. El cargador de helicasa es análogo al cargador de la abrazadera del que tratamos anteriormente; pero tiene la función adicional de mantener la helicasa inactiva hasta que sea cargada de forma correcta en la horquilla de replicación naciente. Cuando se ha cargado la helicasa, empieza a abrir el DNA y deja expuesta suficiente cadena de DNA sencilla para que la primasa sintetice el cebador de RNA que hará empezar la cadena conductora (**Figura 5–27**). Este hecho conduce rápidamente al ensamblaje de las proteínas restantes dando lugar a dos horquillas de replicación, con complejos proteicos que se desplazan en sentidos opuestos respecto al origen de replicación. Estas máquinas proteicas continúan sintetizando DNA hasta que ha sido replicado todo el DNA patrón anterior a cada horquilla de replicación.

En *E. coli*, la interacción entre la proteína iniciadora y el origen de replicación está cuidadosamente regulada; la iniciación sólo tiene lugar cuando las bacterias disponen de suficientes nutrientes para completar un ciclo entero de replicación. Está controlada la actividad de la proteína iniciadora, pero también un origen de replicación que acaba de ser utilizado experimenta un "periodo refractario" debido a un retraso en la metilación de nucleótidos A recién sintetizados. Una iniciación posterior de la replicación queda bloqueada hasta que estas A son metiladas (**Figura 5–28**).

Los cromosomas de células eucariotas tienen varios orígenes de replicación

Hemos constatado cómo en las bacterias, dos horquillas de replicación comienzan en un mismo origen de replicación y se desplazan en sentidos opuestos, desde el origen hasta que se ha replicado todo el DNA del cromosoma circular de una sola cadena. El genoma bacteriano es lo bastante pequeño para que estas dos horquillas de replicación dupliquen el genoma en unos 40 minutos. En el caso de los eucariotas, cuyos cromosomas son mucho mayores, se necesita una estrategia diferente para permitir su replicación en un tiempo similar.

A principios de la década de 1960 se desarrolló un método para determinar el patrón general de la replicación de los cromosomas de células eucariotas. Este método consiste en hacer crecer células humanas en cultivo y marcarlas con un breve pulso de timidina-^{3}H, de manera que el DNA sintetizado durante este periodo se convierte en radiactivo. A continua-

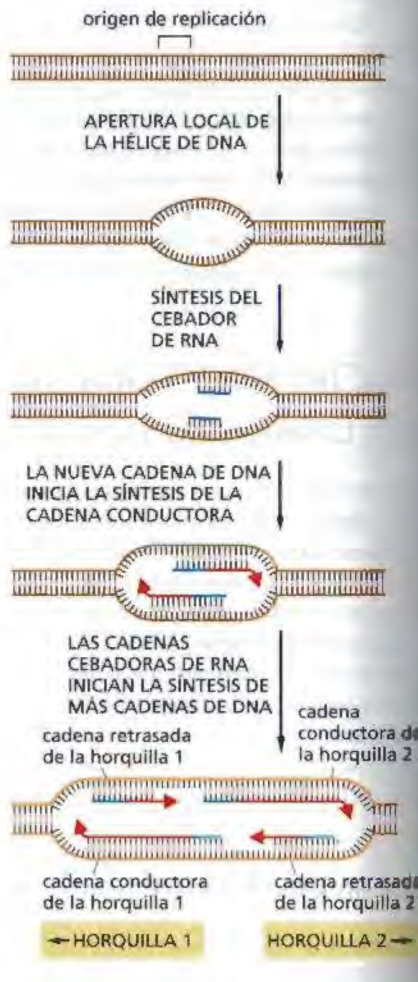


Figura 5–25 Al inicio de la horquilla de replicación, se forma una burbuja de replicación. Este diagrama destaca las etapas principales de la iniciación de las horquillas de replicación en los orígenes de replicación. La estructura que se forma en la última etapa, en la que ambas cadenas de la hélice de DNA paterna se han separado una de otra y actúan de patrones para la síntesis de DNA, se denomina *burbuja de replicación*.

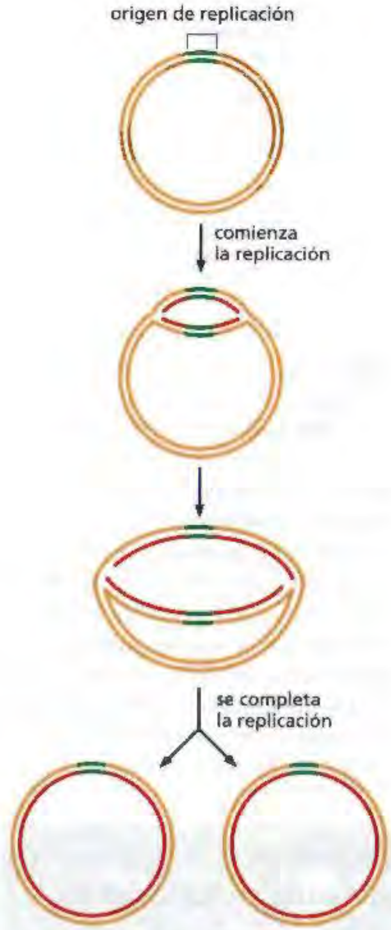


Figura 5–26 Replicación del DNA de un genoma bacteriano. *E. coli* tarda cerca de 40 minutos en duplicar su genoma que tiene 4,6 × 10[6] pares de bases. Para simplificar, no se muestran fragmentos de Okazaki en la cadena retrasada. Todavía no se comprende bien lo que ocurre a medida que las dos horquillas de replicación se acercan y chocan al final del ciclo de replicación, aunque se sabe que como parte del proceso, la maquinaria de replicación se desensambla.

ces, las células son lisadas con cuidado y el DNA se extiende sobre una superficie de vidrio cubierta con una emulsión fotográfica. El revelado de la emulsión permite ver el patrón del DNA marcado mediante la técnica conocida como *autorradiografía*. El tiempo asignado para el marcaje radiactivo se elige de forma que permita que cada horquilla de replicación se haya desplazado varios micrómetros a lo largo del DNA, de forma que el DNA replicado pueda detectarse mediante microscopio óptico como líneas de granos de plata, a pesar de que la molécula de DNA es demasiado delgada para ser visible con este tipo de microscopio. De esta manera se pueden determinar la velocidad y el sentido del desplazamiento de las horquillas de replicación (**Figura 5–29**). A partir de la velocidad a la que las marcas de DNA replicado aumentan de longitud durante el tiempo de marcaje, se ha estimado que las horquillas de replicación se desplazan a unos 50 nucleótidos por segundo. Ésta es, de forma aproximada, una décima parte de la velocidad a la que se desplazan las horquillas de replicación en las bacterias, lo que refleja, posiblemente, la mayor dificultad para replicar el DNA empaquetado de la cromatina.

Un cromosoma mediano de la especie humana contiene una sola molécula lineal de DNA de unos 150 millones de pares de nucleótidos. Se necesitarían unos 0,02 segundos/nucleótido × 150 × 10^6 nucleótidos = 3 × 10^6 segundos (unas 800 horas) para replicar esta molécula de DNA de principio a fin con una sola horquilla de replicación desplazándose a una velocidad de 50 nucleótidos por segundo. Tal como se esperaba, los experimentos con auto-

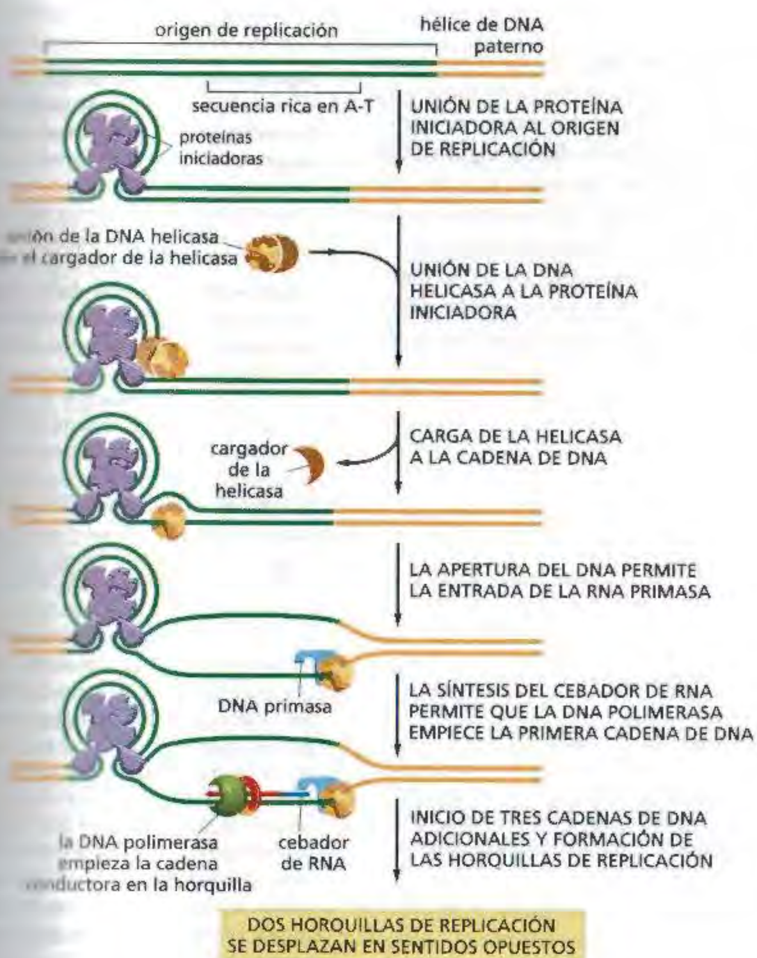


Figura 5–27 Proteínas que inician la replicación del DNA en bacterias. El mecanismo que se muestra fue establecido a partir de estudios *in vitro* con mezclas de proteínas altamente purificadas. Para la replicación del DNA de *E. coli*, la proteína iniciadora principal, la helicasa y la primasa son la DnaA, DnaB y DnaG, respectivamente. En el primer paso, varias moléculas de proteína iniciadora se unen específicamente a secuencias de DNA en el origen de replicación y forman una estructura compacta en la que el DNA envuelve la proteína. Entonces, la helicasa es cargada por la proteína cargadora de helicasa (la proteína DnaC), que inhibe a la helicasa hasta que esté convenientemente cargada en el origen de replicación. La proteína cargadora de helicasa impide que la helicasa se una de forma inadecuada a otras zonas del genoma bacteriano de cadena sencilla. Ayudada por una proteína de unión a cadena sencilla (no mostrada), la helicasa cargada abre la doble cadena de DNA permitiendo la entrada de la primasa y la síntesis del cebador para la primera cadena de DNA. Las etapas siguientes (no mostradas) llevan a la iniciación de tres cadenas adicionales más de DNA y al ensamblaje final de las dos horquillas de replicación completas.



Figura 5–28 La metilación del origen de replicación de *E. coli* genera un periodo refractario para el inicio de la síntesis de DNA. La metilación del DNA tiene lugar en secuencias GATC, 11 de las cuales se encuentran en el origen de replicación (que ocupa aproximadamente una zona de 250 pares de nucleótidos). En el estado hemimetilado, el origen de replicación tiene unida una proteína inhibidora (Seq A, no mostrada), que bloquea el acceso a las proteínas iniciadoras. Unos 20 minutos después de que se haya iniciado la replicación, los orígenes hemimetilados son metilados completamente mediante la enzima DNA metilasa y entonces se libera SeqA.

Una sola enzima, la *Dam* metilasa, es la responsable de la metilación de todas las secuencias GATC de *E. coli*. El sistema de corrección de errores de apareamiento de *E. coli* también utiliza la demora en la metilación después de la replicación de las secuencias GATC para distinguir la cadena de DNA recién sintetizada de la cadena de DNA paterna; en este caso, las secuencias relevantes de GATC se reparten por todo el cromosoma y no están unidas a SeqA.

rradiografía que hemos descrito revelaron la existencia de varias horquillas de replicación desplazándose simultáneamente sobre cada cromosoma eucariota.

Otros experimentos de este tipo han demostrado lo siguiente: (1) Los orígenes de replicación tienden a ser activados en grupos formados por unos 20-80 orígenes, llamados *unidades de replicación*. (2) Parece que a diferentes tiempos del ciclo celular se activan nuevas unidades de replicación hasta que se ha replicado todo el DNA; más adelante profundizaremos sobre este punto. (3) Dentro de una unidad de replicación, los orígenes de replicación están espaciados a intervalos de 30.000-250.000 pares de nucleótidos. (4) Como en las bacterias, las horquillas de replicación se forman a pares y generan una burbuja de replicación a medida que se van desplazando en sentidos opuestos desde un punto de origen común. Solamente se detienen cuando chocan con otra horquilla de replicación que se desplaza en sentido opuesto (o cuando llegan al final del cromosoma). De este modo, en cada cromosoma actúan de forma independiente muchas horquillas de replicación que generan dos hélices de DNA hijas completas.

En eucariotas la replicación de DNA sólo tiene lugar durante una parte del ciclo celular

Cuando crecen con rapidez, las bacterias replican su DNA continuamente, y pueden empezar un nuevo ciclo de replicación incluso antes de finalizar el anterior. Por lo contrario, en la mayoría de células eucariotas la replicación de DNA sólo tiene lugar durante una parte específica del ciclo de división celular, la llamada *fase de síntesis de DNA* o **fase S** (**Figura 5–30**). En una célula de mamífero, la fase S dura unas 8 horas; en células eucariotas más sencillas como las levaduras, la fase S puede llegar a durar solamente unos 40 minutos. Al final, cada cromosoma se ha replicado produciendo dos copias completas, que permanecen juntas por sus centrómeros hasta la *fase M* (M de *mitosis*), que la sucede rápidamente. En el Capítulo 17 describimos el sistema de control que regula el ciclo celular y explicamos por qué la entrada en cada fase del ciclo necesita que la célula haya superado de forma satisfactoria la fase precedente.

En las próximas secciones, exploraremos cómo se coordina la replicación cromosómica en la fase S del ciclo celular.

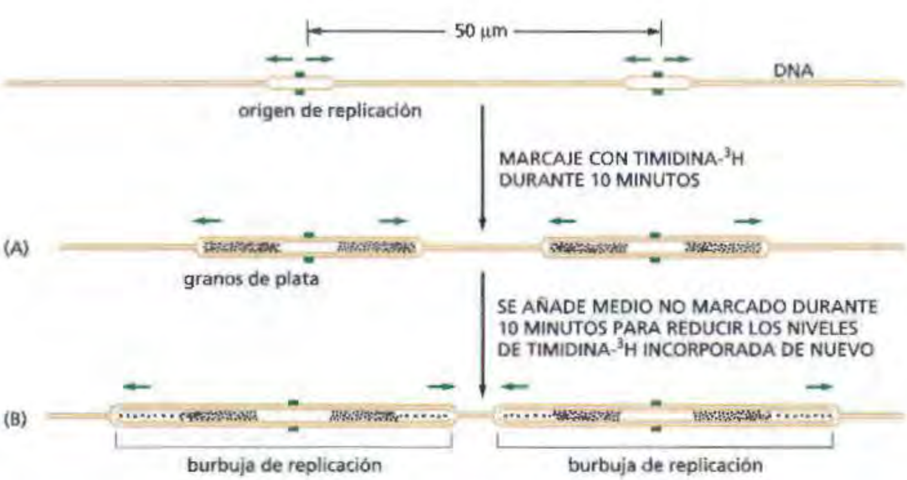


Figura 5–29 Experimentos que demuestran cómo se forman y cómo se desplazan las horquillas de replicación en cromosomas de eucariotas. El nuevo DNA formado en células humanas en cultivo se marcó brevemente con un pulso de timidina muy radiactiva (timidina-^{3}H). (A) En este experimento, se lisaron las células y el DNA se extendió sobre un portaobjetos de vidrio que a continuación se cubrió con una emulsión fotográfica. Después de varios meses, se reveló la emulsión y se observó una línea de granos de plata sobre el DNA radiactivo. El DNA *marrón* de esta figura solamente se muestra para ayudar en la interpretación de la autorradiografía; el DNA no marcado es invisible en estos experimentos. (B) Este experimento era igual que el anterior, pero después del marcaje las células se incubaron en un medio sin radiactividad, lo que permitió que se replicara más DNA con un nivel de radiactividad menor. Se observó que las parejas de trazas oscuras en (B) contenían granos de plata que disminuían en número en sentidos opuestos, demostrando así el desplazamiento bidireccional de la horquilla desde un origen de replicación central en donde se forma una burbuja de replicación (véase Figura 5–25). Se cree que una horquilla de replicación solamente se detiene cuando se encuentra con otra horquilla de replicación que se desplaza en sentido opuesto o cuando llega al final del cromosoma; de esta manera, se replica la totalidad del DNA.

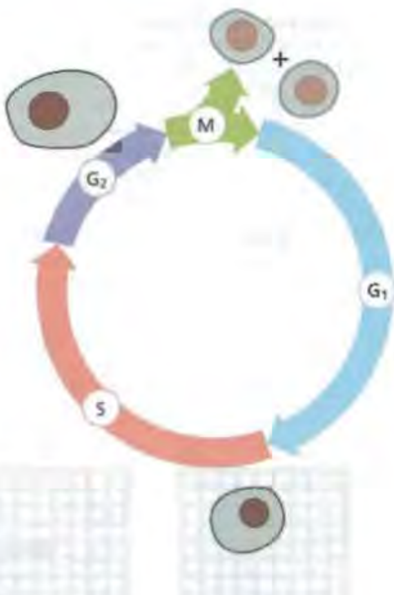


Figura 5–30 Las cuatro fases sucesivas del ciclo celular estándar en eucariotas. Durante las fases G_1, S y G_2, la célula crece de forma continua. Durante la fase M, el crecimiento se detiene, el núcleo se divide y la célula se divide en dos. La replicación del DNA ocurre solamente en la parte del ciclo celular conocido con el nombre de fase S. G_1 es el periodo entre la fase M y la fase S; G_2 es el periodo entre la fase S y la fase M.

En la fase S se replican distintas regiones de un mismo cromosoma a distintos tiempos

Dada la velocidad a la que una horquilla de replicación se desplaza y las mayores distancias medidas entre orígenes de replicación, en las células de mamífero, la replicación del DNA en la región comprendida entre un origen de replicación y el siguiente normalmente sólo necesitaría alrededor de una hora para completarse. Sin embargo, en los mamíferos la fase S dura unas 8 horas. Este hecho implica que no todos los orígenes de replicación están activados de forma simultánea y que, en cada unidad de replicación, el DNA (que contiene un grupo de unos 20-80 orígenes de replicación) es replicado durante únicamente una pequeña parte del intervalo total de la fase S.

¿Las distintas unidades de replicación se activan al azar o las distintas regiones del genoma se replican en un orden específico? Una forma de responder a esta cuestión es utilizando bromodeoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina, para marcar el DNA sintetizado de nuevo en poblaciones de células sincronizadas y añadirlo a diferentes tiempos durante la fase S. Más adelante, durante la fase M, aquellas regiones de los cromosomas mitóticos que han incorporado BrdU en su DNA pueden ser reconocidas porque sus propiedades de tinción están alteradas o mediante anticuerpos anti-BrdU. Los resultados demuestran que durante la fase S distintas regiones de cada cromosoma se replican en un orden reproducible (**Figura 5–31**). Además, como se esperaría a partir de los grupos de las horquillas de replicación observadas en las autorradiografías de DNA (véase Figura 5–29), el tiempo de replicación está coordinado entre grandes regiones del cromosoma.

Actualmente existen métodos mucho más sofisticados para el seguimiento del inicio de la replicación del DNA y del desplazamiento de las horquillas de replicación en las células. Estos métodos utilizan microchips de DNA (rejillas del tamaño de un sello cubiertas con decenas de miles de fragmentos de DNA con secuencia conocida). Como veremos más detalladamente en el Capítulo 8, cada fragmento de DNA se coloca en una única posición en el microchip, de esta manera se pueden representar genomas completos de forma ordenada. Si una muestra de DNA de un grupo de células en fase S se lisa y se hibrida con un microchip que contenga el genoma de este organismo, es posible determinar la cantidad de cada secuencia de DNA. Debido a que un segmento del genoma que ha sido replicado tiene dos veces más DNA que uno que todavía no se ha replicado, se puede seguir de forma precisa el inicio y el desplazamiento de la horquilla de replicación (**Figura 5–32**). A pesar de que este método proporciona mucha más precisión, conduce a muchas de las conclusiones a las que se llegaron en estudios anteriores.

La cromatina altamente condensada se replica de forma tardía, mientras que los genes presentes en la cromatina menos condensada tienden a replicarse antes

Parece que el orden en el que se activan los orígenes de replicación depende, en parte, de la estructura de la cromatina en la que se encuentran. En el Capítulo 4, se expuso que la heterocromatina es un estado muy condensado de la cromatina, mientras que la eucromatina tiene una conformación menos condensada, aparentemente necesaria para la transcripción. La heterocromatina tiende a ser replicada muy tarde en la fase S, lo que sugiere que el tiempo de replicación se relaciona con el empaquetamiento del DNA en la cromatina. Este hecho se basa en el examen de los dos cromosomas X de una célula femenina de mamífero. Mientras que estos dos cromosomas contienen esencialmente las mismas secuencias de DNA, una está activa para la transcripción del DNA y la otra no lo está (véase Capítulo 7). Casi todo el cromosoma X inactivo está condensado en forma de heterocromatina y su DNA se replica tarde en la fase S. Su cromosoma homólogo activo está menos condensado y se replica durante la fase S.

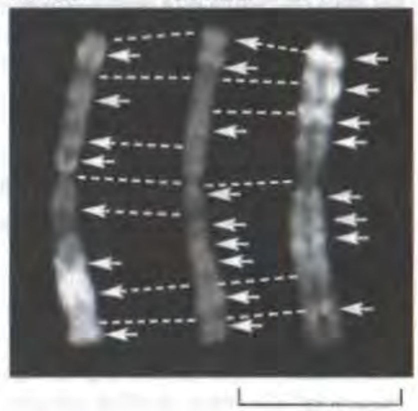


Figura 5–31 Diferentes regiones de un cromosoma se replican en diferentes momentos de la fase S. Estas fotografías, obtenidas con el microscopio óptico, muestran cromosomas mitóticos teñidos en los que se ha marcado de forma diferencial el DNA en replicación durante intervalos definidos de la fase S. En estos experimentos, las células se hicieron crecer en presencia de BrdU (un análogo de la timidina) y en ausencia de timidina para marcar el DNA. Después, las células fueron expuestas a pulsos breves de timidina en ausencia de BrdU durante la fase S temprana, media o tardía. Dado que el DNA sintetizado durante el pulso con timidina es DNA de doble hélice con timidina en una cadena y BrdU en la otra, se marca más intensamente que el otro DNA (que contiene BrdU en las dos cadenas) y en estos negativos se visualiza como bandas más brillantes (*flechas*). Las líneas discontinuas conectan posiciones similares de las tres copias del cromosoma mostrado. (Por cortesía de Elton Stubblefield.)

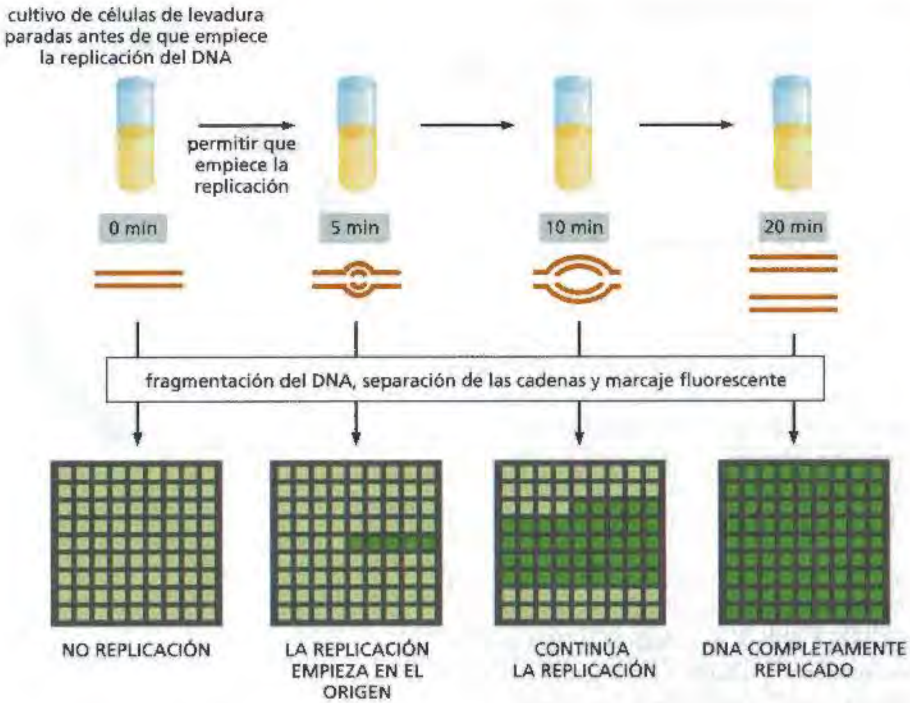


Figura 5–32 Utilización de microchips de DNA para seguir la formación y el progreso de las horquillas de replicación en el genoma de levadura. Para llevar a cabo este experimento, se sincronizó una población de células de manera que todas empezasen la replicación al mismo tiempo. Se recogió el DNA y se hibridó con el microchip; el DNA que se hubiera replicado una vez daría una señal de hibridación dos veces más alta (*cuadrados verde oscuro*) que el que no se hubiese replicado (*cuadrados verde claro*). Los cuadrados en estos microchips representan secuencias consecutivas a lo largo de un segmento de un cromosoma de levadura colocados de izquierda a derecha y de arriba abajo. En esta figura sólo se muestran 81 cuadrados, pero los chips actuales contienen decenas de miles de secuencias que abarcan el genoma de levadura completo. Tal y como se puede observar, la replicación empieza en un origen y avanza en los dos sentidos. Para simplificar, sólo se ha mostrado un origen. En las células de levadura, la replicación empieza a la vez en centenares de orígenes localizados a lo largo de todo el genoma.

Estos hallazgos sugieren que las primeras regiones en replicarse del genoma son aquellas cuya cromatina está menos condensada. Las horquillas de replicación parecen desplazarse a velocidades comparables durante la fase S, de forma que parece que el grado de condensación del cromosoma influencia más el momento en el que se inician las horquillas de replicación que su velocidad una vez formadas.

Unas secuencias bien definidas de DNA actúan como origen de replicación en eucariotas sencillos como la levadura

Después de constatar que la replicación del cromosoma eucariota utiliza muchos orígenes de replicación, cada uno de los cuales se "enciende" en un momento característico de la fase S del ciclo celular, pasamos a estudiar la naturaleza de estos orígenes de replicación. Vimos anteriormente en este capítulo que, en las bacterias, los orígenes de replicación son secuencias específicas de DNA que atraen a las proteínas de iniciación y que ensamblan la maquinaria de replicación de DNA. Por analogía, es previsible que en los cromosomas de las células eucariotas, los orígenes de replicación también fueran secuencias específicas de DNA.

La búsqueda de secuencias de DNA eucariotas que contengan la información necesaria para especificar los orígenes de replicación ha sido muy productiva en la levadura *S. cerevisiae*. Para encontrarlos, se han diseñado potentes métodos de selección utilizando células mutantes de levadura defectuosas para un gen esencial. Estas células pueden sobrevivir en un medio selectivo solamente si se las provee de un DNA que lleve una copia funcional del gen que le falta. Si en estas células mutantes de levadura se introduce de forma directa un plásmido bacteriano circular que contenga este gen, el plásmido no podrá replicar el DNA por falta de un origen de replicación funcional. En cambio, si se insertan al azar secciones de DNA de la levadura en el plásmido, solamente se replicarán aquellas moléculas de DNA de plásmido que contengan un origen de replicación de la levadura. Las células de levadura que llevan tales plásmidos son capaces de proliferar porque se les ha proporcionado el gen esencial en una forma que se puede replicar y puede pasar a la progenie celular (**Figura 5–33**). La *secuencia de replicación autónoma* (*ARS: **a**utonomously **r**eplicating **s**equence*) es una secuencia de DNA identificada por estar presente en un plásmido aislado a partir de estas células supervivientes de levadura. Se ha demostrado que la mayoría de las ARS son auténticos orígenes de replicación en el cromosoma, lo que valida la estrategia utilizada para obtenerlos.

Se ha determinado la localización de cada uno de los orígenes de replicación en cada uno de los cromosomas de la levadura. El cromosoma particular que se muestra en la **Figura 5–34**, el cromosoma III de la levadura *S. cerevisiae*, es uno de los cromosomas más pe-

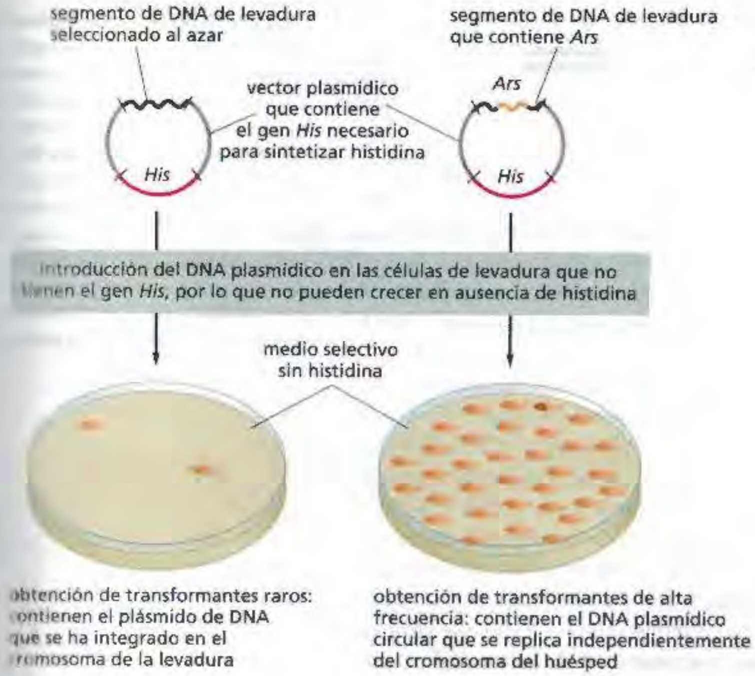


Figura 5–33 Estrategia utilizada para identificar secuencias de DNA que son suficientes para iniciar la replicación del DNA. Las secuencias de DNA de levadura identificadas de esta manera fueron denominadas secuencias replicativas autónomas (*Ars*), ya que permiten que un plásmido que las contenga se replique en la célula huésped sin tener que incorporarse al cromosoma de la célula.

[illegible] que se conoce, con una longitud inferior a 1/100 parte de la longitud de un cromo[illegible] [illegible]mano típico. Sus orígenes de replicación principales están espaciados por prome[illegible] [illegible] 30.000 pares de nucleótidos; esta densidad de los orígenes permite que el [illegible]ma se replique en unos 10 minutos en el caso de que todos los orígenes empezaran [illegible]. Como hemos mencionado, los orígenes de replicación en mamíferos se encuentran [illegible] espaciados, normalmente entre 100.000 y 250.000 pares de nucleótidos.

[illegible] han realizado experimentos genéticos con *S. cerevisiae* para analizar el efecto de la [illegible]ón de varios orígenes de replicación en el cromosoma III. La eliminación de unos [illegible] orígenes tiene un efecto pequeño, porque las horquillas de replicación que empie[illegible] [illegible] orígenes vecinos pueden continuar en regiones que no tengan sus propios orígenes. [illegible], la deleción de un mayor número de orígenes de replicación resulta en la pér[illegible] [illegible] cromosoma a medida que las células se dividen, porque se replica con demasiada [illegible]. Muchos cromosomas eucariotas tienen un exceso de orígenes de replicación, pro[illegible]mente para asegurar que el genoma completo se puede replicar dentro del tiempo es[illegible] a pesar de que algunos de los orígenes de replicación fallen.

[illegible] orígenes de replicación de eucariotas se unen grandes [illegible]plejos formados por muchas subunidades

[illegible] secuencia de DNA que se requiere para dirigir la iniciación de la replicación del [illegible] la levadura *S. cerevisiae* se ha determinado mediante fragmentos de DNA cada vez [illegible]ños, como se muestra en el experimento de la Figura 5–33. Se vio que cada una de [illegible] de DNA que puede actuar como origen de replicación contiene: (1) un lugar [illegible] para una proteína iniciadora muy grande, formada por varias subunidades, deno[illegible] ORC o **complejo de reconocimiento del origen** (ORC: *origin recognition complex*), [illegible] de DNA rico en A y T y, por lo tanto, sencillo de desenrollar y desempaquetar, y [illegible] un sitio de unión para proteínas que ayudan a atraer el ORC hacia el origen [illegible] 5–35). En bacterias, cuando la unión de la proteína iniciadora al único origen de

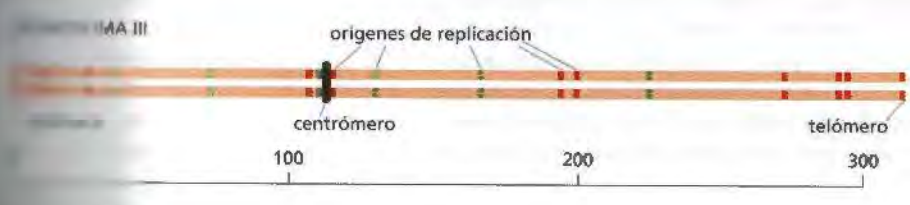


Figura 5–34 Orígenes de replicación del DNA en el cromosoma III de la levadura *S. cerevisiae*. Este cromosoma, uno de los cromosomas eucariotas más pequeños que se conocen, tiene un total de 180 genes. Como se indica, contiene 19 orígenes de replicación, aunque se utilizan con distintas eficiencias. Los que están representados en *rojo* son los que normalmente se utilizan en menos del 10% de las ocasiones, mientras que los señalados en *verde* se utilizan en el 90% de las fases S.

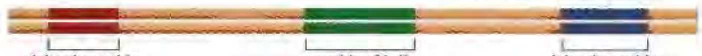


Figura 5–35 Un origen de replicación en las levaduras. Este origen de replicación comprende unos 150 pares de nucleótidos y se identificó mediante el procedimiento mostrado en la Figura 5–33. Tiene un sitio de unión para ORC y uno para Abf1, una proteína auxiliar que facilita la unión del ORC. Todos los orígenes contienen sitios de unión a ORC, pero las proteínas auxiliares que actúan en cada uno son diferentes respecto al siguiente. La mayoría de los orígenes, como el que se muestra, también contienen un tramo de DNA que es especialmente fácil de desenrollar.

replicación es correcta, el ensamblaje de la horquilla de replicación sucede más o menos de forma automática. En eucariotas, la situación es notablemente diferente debido al gran problema que tienen los eucariotas al replicar cromosomas con tantos orígenes de replicación (p. ej., se han estimado unos 400 para levadura y unos 10.000 en humanos). Con tantos sitios en los que empezar la replicación, ¿cómo se regula el proceso para asegurar que todo el DNA se copia una sola vez?

La respuesta se encuentra en la forma en la que el complejo ORC, una vez unido al origen de replicación, se activa e inactiva de forma secuencial. Este tema se trata a fondo en el Capítulo 17, cuando consideremos la maquinaria celular que conlleva el ciclo de la división celular. La interacción ORC-origen persiste durante todo el ciclo celular, separándose únicamente y de forma breve justo después de la replicación del origen. Otras proteínas que se unen al origen regulan su actividad; éstas incluyen la DNA helicasa y dos proteínas cargadoras de helicasas (Cdc6 y Cdt1) que se unen al complejo ORC-DNA formando un *complejo prerreplicativo* en cada origen durante la fase G_1 (**Figura 5–36**). En una célula, el paso de la fase G_1 a la fase S se desencadena por la activación de proteínas quinasa (Cdk) que llevan a la disociación de las proteínas cargadoras de helicasa, la activación de la helicasa, el desenrollamiento del origen de DNA y a la carga del resto de proteínas implicadas en la replicación, incluida la DNA polimerasa (véase Figura 5–36).

Las quinasas que desencadenan la replicación del DNA previenen de forma simultánea el ensamblaje de un nuevo complejo prerreplicativo hasta que la fase M siguiente reinicie el ciclo entero (para más detalles véase páginas 1067-1069). Esta estrategia proporciona una sola oportunidad para que se formen los complejos prerreplicativos (en la fase G_1, cuando la actividad Cdk es baja) y una ocasión para que estos complejos sean activados y después desactivados (fase S, cuando la actividad Cdk es alta). Debido a que estas dos fases del ciclo celular son mutuamente excluyentes y que ocurren en un orden establecido, cada origen de replicación se puede activar una sola vez en cada ciclo celular.

Dificultad para identificar las secuencias de DNA que especifican el inicio de la replicación en mamíferos

Comparado con la situación en la levadura *S. cerevisiae*, las secuencias de DNA que especifican los orígenes de replicación en otros eucariotas han sido más difíciles de definir. Recientemente, sin embargo, se han identificado secuencias de DNA específicas de humanos, cada varios miles de pares de bases, que son suficientes para actuar como orígenes de replicación. Estos orígenes siguen manteniendo su función cuando, mediante técnicas de DNA recombinante, se trasladan a otra región del cromosoma, siempre que se sitúen en una región en la que la cromatina está relativamente descondensada. Uno de estos orígenes pertenece al conjunto de genes de la β-globina. En su posición normal en el genoma, la función de este origen depende de secuencias de DNA distantes (**Figura 5–37**). Como se expone en el Capítulo 7, se sabe que este DNA distante es necesario para la expresión de todos los genes del conjunto de genes de la β-globina, y sus efectos en la transcripción y en la funcionalidad del origen deberían reflejar el elevado grado de descondensación de la cromatina.

Para el inicio de la replicación se necesita un ORC humano homólogo al de las células de levadura. Muchas de las otras proteínas que intervienen en el proceso de iniciación de levadura también tienen papeles centrales en humanos. Por ello, parece probable que los mecanismos de iniciación de la levadura y de humanos sean similares en líneas generales. Sin embargo, los sitios de unión para la proteína ORC parecen ser menos específicos en humanos de lo que lo son en levaduras, lo cual podría explicar por qué los orígenes de replicación en humanos están definidos menos claramente. De hecho, la estructura de la cromatina, más que las secuencias de DNA, debe desempeñar un papel central en la definición de los orígenes de replicación. Así, como en muchas otras áreas de la biología celular, el mecanismo de iniciación de la replicación del DNA en levadura debe corresponder al proceso general, mientras que la situación en humanos representa una elaborada variación sobre el tema.

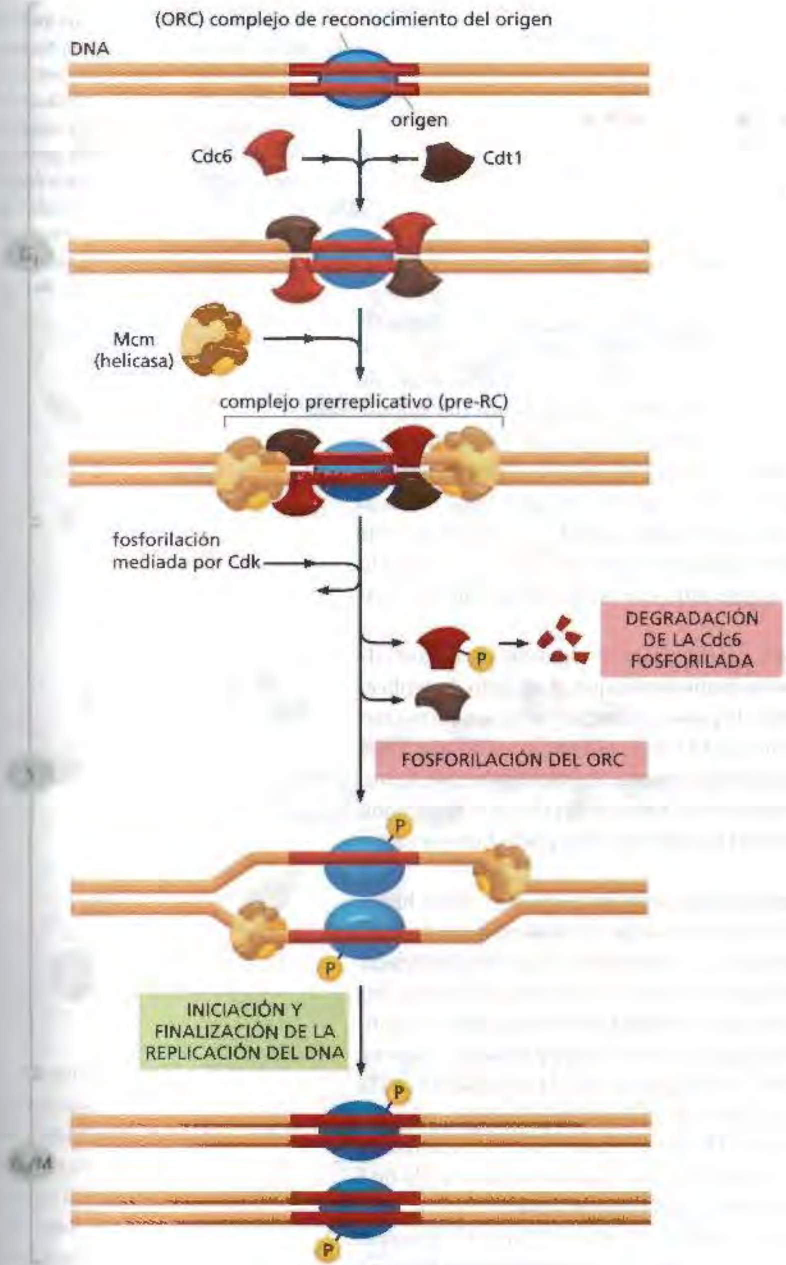


Figura 5–36 Mecanismo de iniciación de la replicación del DNA en eucariotas. Este mecanismo asegura que cada origen de replicación es activado una sola vez en cada ciclo celular. Un origen de replicación sólo se puede utilizar si el complejo prerreplicativo se forma durante la fase G_1. Al inicio de la fase S, las quinasas dependientes de ciclina (Cdk) fosforilan diversas proteínas de replicación, provocando el desensamblaje del complejo prerreplicativo y el inicio de la replicación del DNA. No se podrá formar un nuevo complejo prerreplicativo hasta que la célula no avance hasta la siguiente fase G_1.

Detrás de la horquilla de replicación se ensamblan nuevos nucleosomas

Hay algunos aspectos adicionales de la replicación del DNA que son específicos para eucariotas. Como se describió en el Capítulo 4, los cromosomas de las células eucariotas están formados por una mezcla equitativa de DNA y de proteínas. Por lo tanto, la duplicación de los cromosomas necesita la replicación del DNA, pero además requiere la síntesis y el ensamblaje de las nuevas proteínas cromosómicas situadas sobre el DNA detrás de cada horquilla de replicación. A pesar de que todavía estamos lejos de comprender este proceso en detalle, estamos empezando a aprender cómo se duplica el nucleosoma, que es la unidad fundamental de empaquetamiento de la cromatina. Para la síntesis de nuevos nucleosomas en cada ciclo celular, se necesita una gran cantidad de proteínas histonas nuevas que sean de forma aproximadamente iguales en masa a la del nuevo DNA sintetizado. Por esta razón, la mayor parte de los organismos eucariotas tienen varias copias del gen de cada histona. Las células de vertebrados, por ejemplo, tienen alrededor de 20 conjuntos de genes repetidos, y muchos de ellos contienen los genes que codifican las cinco histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4).



Figura 5–37 Deleciones que inactivan un origen de replicación en humanos. Estas dos deleciones se encontraron de forma independiente en dos individuos que sufren *talasemia*, una enfermedad causada por la incapacidad de expresar un gen (o más de uno) del grupo de genes de la β-globina, que se muestra aquí. En ambos mutantes, el DNA en esta región se replica mediante horquillas que empiezan en orígenes de replicación de fuera del conjunto de genes de la β-globina.

A diferencia de lo que ocurre con la mayoría de las proteínas, que son sintetizadas de forma continua durante la interfase, las histonas se sintetizan sobre todo durante la fase S, cuando el nivel de mRNA de histonas aumenta aproximadamente 50 veces como resultado de un incremento en la transcripción y una disminución de la degradación del mRNA. Cuando la síntesis de DNA se detiene al final de la fase S, los principales mRNA de histonas son degradados en cuestión de minutos. El mecanismo depende de las propiedades especiales del extremo 3' de estos mRNA (véase Capítulo 7). En cambio, las proteínas histonas son notablemente estables y pueden sobrevivir durante toda la vida de la célula. La fuerte conexión entre la síntesis de DNA y la síntesis de histonas refleja un mecanismo de retroalimentación que controla el nivel de histona libre, asegurando que las cantidades de histonas y de DNA sintetizadas coincidan.

A medida que la horquilla de replicación avanza, debe pasar de algún modo a través de los nucleosomas paternos. En estudios *in vitro* se ha demostrado que el aparato de replicación tiene una capacidad intrínseca poco conocida de pasar a través de ellos sin desplazarlos del DNA. Sin embargo, para replicar cromosomas de forma eficiente, en la célula son necesarias las proteínas que modifican la estructura de la cromatina (tratadas en el Capítulo 4), y desestabilizan la interfaz DNA-histona. Mediante la colaboración de estos complejos, las horquillas de replicación pueden avanzar de forma eficiente incluso por la heterocromatina altamente condensada.

A medida que la horquilla de replicación avanza por la cromatina, muchas de las histonas viejas permanecen unidas al DNA y son distribuidas entre las dos hélices hijas de DNA de detrás de la horquilla de replicación. Pero dado que la cantidad de DNA se ha duplicado, se necesita una cantidad igual de nuevas histonas para completar el empaquetamiento del DNA en la cromatina. Las histonas viejas y las nuevas se combinan de forma curiosa. Cuando la horquilla de replicación atraviesa un nucleosoma, el octámero de histona se rompe en un tetrámero H3-H4 y en dos dímeros H2A-H2B (véase Figura 4–26). El tetrámero H3-H4 permanece asociado al DNA y se distribuye al azar entre las cadenas dúplex hijas, pero los dímeros H2A-H2B se liberan del DNA. Los tetrámeros H3-H4 se añaden al DNA sintetizado llenando los "espacios" libres; los dímeros H2AB, la mitad de los cuales son nuevos y la otra mitad viejos, se añaden al azar completando los nucleosomas (**Figura 5–38**).

Para el ordenamiento y la rápida adición de los nuevos tetrámeros H3-H4 y los dímeros H2A-H2B detrás de la horquilla de replicación son necesarias las **chaperonas de histona** (también denominadas *factores ensambladores de cromatina*). Estos complejos multisubunidad unen las histonas más básicas y las liberan, ensamblándolas sólo en el contexto apropiado. Estas chaperonas de histona, juntamente con la carga que transportan, son dirigidas hacia el DNA recién replicado mediante una interacción específica con la abrazadera deslizante eucariota, llamada *PCNA* (véase Figura 5–38B). Estas abrazaderas se liberan detrás de la horquilla de replicación y permanecen en el DNA el tiempo suficiente para que las chaperonas de histona finalicen su función.

Los mecanismos de duplicación cromosómica en eucariotas aseguran que los patrones de modificación de histonas se puedan heredar

En el Capítulo 4 se explicó que las histonas están sujetas a muchos tipos de modificaciones covalentes y que los patrones de dichas modificaciones pueden llevar información importante teniendo en cuenta el destino del DNA adyacente. Tiene poco sentido borrar estos patrones cada vez que la célula se divide, pero como esa información está codificada en las proteínas de histona más que en el DNA, tiene que existir algún mecanismo especial que la preserve y duplique. Tal como se describió, los tetrámeros H3-H4 se distribuyen al azar entre los cromosomas hijos que aparecen detrás de la horquilla de replicación. Tanto las colas

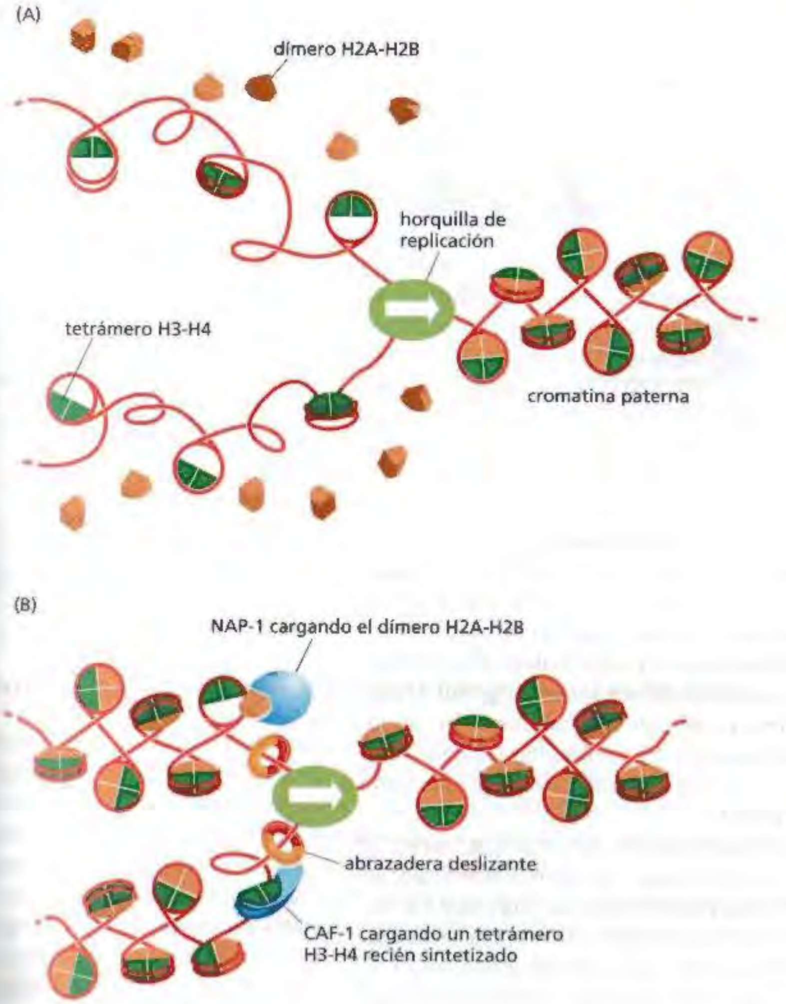


Figura 5–38 Distribución de las histonas paternas y de las de nueva síntesis detrás de la horquilla de replicación eucariota. (A) Aparentemente, la distribución de los tetrámeros H3-H4 paternos entre las moléculas de DNA hijas se hace al azar, de forma que las cadenas hijas heredan aproximadamente la misma cantidad de tetrámeros. Por el contrario, los dímeros H2A-H2B se liberan del DNA a medida que la horquilla de replicación avanza. (B) Las chaperonas de histona (NAP1 y CAF1) restauran el complejo de histonas completo en las moléculas hijas. A pesar de que algunos nucleosomas hijos sólo contienen histonas paternas o sólo histonas de nueva síntesis, muchos de ellos son híbridos de histonas viejas y nuevas. (Adaptado de J.D. Watson et. al. Molecular Biology of the Gene, 5.ª ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004.)

como otras regiones de H3 y H4 pueden ser ampliamente modificadas (véase Figura 4–39), de forma que cada cromosoma hijo resulta "sembrado" con la memoria del patrón de modificaciones paternas de H3 y H4. Una vez ha finalizado el ensamblaje del nucleosoma detrás de la horquilla de replicación, los patrones de modificaciones paternas de H3-H4 pueden ser reforzados mediante enzimas modificadoras de histonas en complejos de lectura-escritura que reconocen el mismo tipo de modificación que generaron (**Figura 5–39**).

La duplicación fiel de los patrones de modificaciones de histonas puede ser la responsable de muchos ejemplos de *herencia epigenética*, en los que el cambio heredable en el fenotipo de la célula ocurre sin un cambio en la secuencia de nucleótidos del DNA. Volveremos a tratar el tema de la epigenética en al Capítulo 7, cuando consideremos cómo las decisiones tomadas por una célula son "recordadas" por las células de su progenie muchas generaciones más tarde.

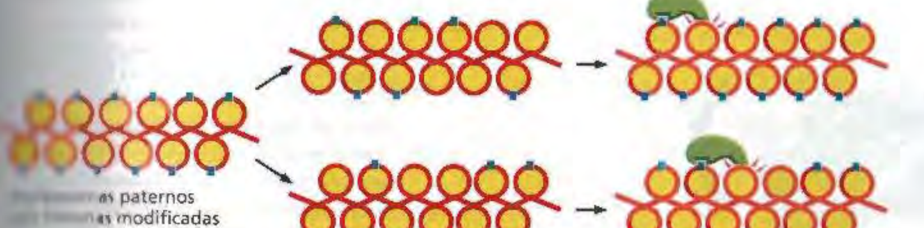


Figura 5–39 Estrategia mediante la cual los patrones de modificaciones de las histonas H3 y H4 pueden ser heredados por los cromosomas hijos. A pesar de que es poco probable que este mecanismo se aplique a todas las modificaciones de histonas, parece apropiado para algunas (véase Figura 4–51). Por ejemplo, un número de complejos histona metilasa reconoce específicamente las colas N-terminal de las histonas que han sido metiladas en el mismo sitio que modifica la metilasa.

La telomerasa replica los extremos de los cromosomas

Se expuso anteriormente que la síntesis de la cadena retrasada en la horquilla de replicación se tiene que producir de forma discontinua a través de un proceso de "punto hacia atrás" que produce fragmentos cortos de DNA. Este mecanismo debe afrontar un problema especial cuando la horquilla de replicación llega al final de un cromosoma lineal: no hay lugar para producir el cebador del RNA necesario para iniciar el último fragmento de Okazaki al final de una molécula lineal de DNA.

Las bacterias resuelven este problema de "final de replicación" teniendo como cromosomas moléculas de DNA circulares (véase Figura 5–27). Los eucariotas lo resuelven de un modo ingenioso: tienen secuencias de nucleótidos especializadas en los extremos de sus cromosomas incorporadas en estructuras llamadas *telómeros* (véase Capítulo 4). Los telómeros contienen muchas repeticiones en tándem de secuencias cortas que son similares en organismos tan diversos como los protozoos, los hongos, las plantas y los mamíferos. En humanos, la secuencia de repetición es GGGTTA y se repite aproximadamente unas mil veces en cada telómero.

Las secuencias de DNA del telómero son reconocidas por proteínas de unión al DNA específicas de secuencia que atraen una enzima llamada **telomerasa**, que rellena esas secuencias cada vez que la célula se divide. La telomerasa reconoce la punta de la secuencia repetitiva de un telómero de DNA ya existente y la alarga en sentido 5' a 3' mediante un patrón de RNA, que es un componente de la propia enzima sintetizando nuevas copias de la repetición (**Figura 5–40**). La parte enzimática de la telomerasa se parece a otras *transcriptasas inversas*, que son enzimas que sintetizan DNA utilizando RNA a modo de patrón (véase Figura 5–72). Después del alargamiento de la cadena paterna de DNA por medio de la telomerasa, la replicación de la cadena retrasada en el extremo del cromosoma se puede completar mediante DNA polimerasas convencionales; estas extensiones sirven como patrón para sintetizar la cadena complementaria (**Figura 5–41**).

El mecanismo que acabamos de describir, ayudado por una nucleasa que "masca" el extremo 5', asegura que el extremo 3' del DNA de cada telómero sea siempre más largo que el extremo 5' con el que está apareado y que el extremo protuberante sea una cadena sencilla (véase Figura 5–41). Se ha demostrado que este extremo protuberante se curva hacia atrás e introduce su extremo de cadena sencilla en el DNA dúplex de la secuencia telomérica repetitiva formando un *lazo t* (**Figura 5–42**). En líneas generales, esta reacción se parece a la invasión de una cadena durante la recombinación homóloga, tratada más adelante, y debe haber evolucionado a partir de estos antiguos sistemas de recombinación. El lazo t proporciona a los extremos normales de un cromosoma una estructura única, que los protege de las enzimas degradativas y los distingue con claridad de los extremos de moléculas de DNA rotas que la célula repara rápidamente (véase Figura 5–51).

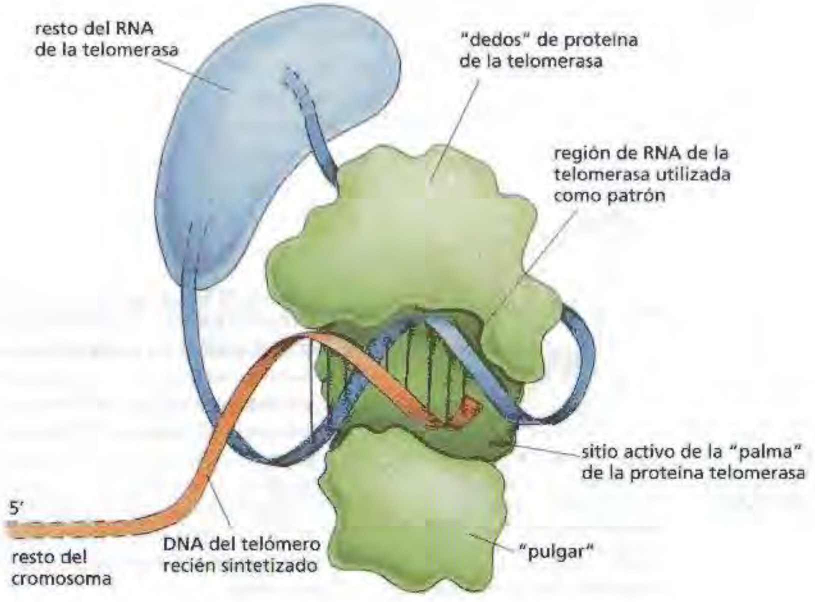


Figura 5–40 Estructura de una porción de la telomerasa. La telomerasa es un gran complejo proteína-RNA. El RNA (*azul*) contiene una secuencia patrón para la síntesis de nuevas secuencias de DNA repetitivas. La reacción de síntesis es llevada a cabo por el dominio de la proteína transcriptasa inversa, mostrada en *verde*. Una transcriptasa inversa es una forma especial de enzima polimerasa que utiliza un patrón de RNA para sintetizar una cadena de DNA; el rango característico de la telomerasa es que siempre transporta su propio patrón de RNA. La telomerasa también tiene varios dominios proteicos más (no mostrados) que son necesarios para el correcto ensamblaje de la enzima a los extremos de los cromosomas. (Modificado de J. Lingner y T.R. Cech, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8:226-232, 1998. Con la autorización de Elsevier).

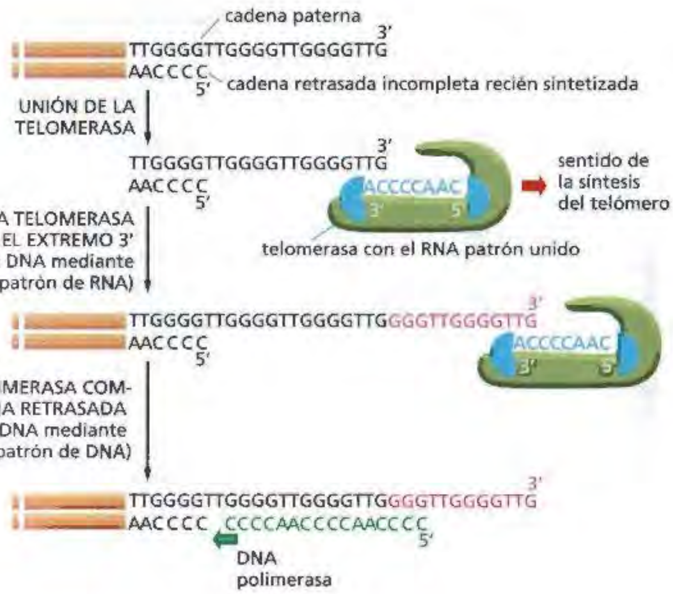


Figura 5–41 Replicación del telómero. Se muestran las reacciones que sintetizan las secuencias repetitivas ricas en G que forman los extremos de los cromosomas (telómeros) de varios eucariotas. El extremo 3' de la cadena de DNA paterna se alarga mediante la síntesis de DNA utilizando un patrón de RNA; este hecho permite el alargamiento en sentido 5' de la cadena de DNA hija incompleta que está apareada con la primera. Parece que esta cadena retrasada incompleta se acaba mediante la DNA polimerasa α, una de cuyas subunidades es una DNA primasa. La secuencia de telómero que se ilustra pertenece al ciliado *Tetrahymena*, en el que fueron descubiertas estas reacciones.

Las células y los organismos regulan la longitud del telómero

Un cromosoma puede contener un número variable de repeticiones teloméricas porque los procesos que hacen crecer y disminuir cada telómero están equilibrados solamente de forma aproximada. No es sorprendente que algunos experimentos muestren que las células que proliferan indefinidamente (como las células de levadura) tienen mecanismos homeostáticos que limitan el número de estas repeticiones (**Figura 5–43**).

En las células somáticas humanas, se ha propuesto que las repeticiones del telómero son un mecanismo que aporta a la célula un sistema de contaje que impide la proliferación ilimitada de células rebeldes en tejidos adultos. La forma más simple de esta idea mantiene que nuestras células somáticas nacen con un conjunto completo de repeticiones del telómero. Algunas células madre, sobre todo las de los tejidos que tienen un elevado recambio celular a lo largo de la vida (como p. ej. la médula ósea o la piel) retienen la actividad telomerasa invariable. Sin embargo, en muchos otros tipos celulares, el nivel de telomerasa disminuye, de forma que la enzima no puede asumir la duplicación de los cromosomas y cada vez que la célula se divide, pierde 100-200 nucleótidos de cada uno de sus telómeros. Después de muchas generaciones celulares, las células descendientes heredarán cromosomas deficientes (porque sus puntas no se pueden replicar por completo) y, en consecuencia, quedarán retiradas permanentemente del ciclo celular y dejarán de dividirse –un proceso llamado *senescencia celular replicativa* (véase Capítulo 17). En teoría, tal mecanismo podría proporcionar una protección contra la proliferación celular descontrolada de células anormales en tejidos somáticos y prevenir el cáncer.

La idea de que la longitud del telómero actúa como una "vara graduada" para contar las divisiones celulares y así regular la vida de las células, se ha puesto a prueba de distintas maneras. Para ciertos tipos de células humanas que crecen en cultivo, los resultados experimentales apoyan esta teoría. Los fibroblastos humanos proliferan unas 60 divisiones celulares antes de entrar en la senescencia replicativa. Al igual que otras células somáticas de humanos, los fibroblastos sólo son capaces de producir niveles bajos de telomerasa y sus telómeros se acortan gradualmente cada vez que las células se dividen. Cuando se inserta un gen activo para la telomerasa en fibroblastos, la longitud del telómero se mantiene y muchas células pueden continuar proliferando de forma indefinida. Parece claro que el acortamiento del telómero puede contar las divisiones celulares y provocar la senescencia replicativa en algunas células humanas.

Se ha propuesto que este tipo de control sobre la proliferación celular es importante para el mantenimiento de la arquitectura tisular y también que es en parte responsable del envejecimiento tanto en animales como en humanos. Estas ideas se han intentado corroborar produciendo ratones transgénicos completamente deficientes en telomerasa. En estos ratones, los telómeros son aproximadamente cinco veces más largos que los telómeros humanos. De este modo los ratones pueden reproducirse durante tres o más generaciones antes



Figura 5–42 Un lazo t al final de un cromosoma de mamífero. Electromicrografía del DNA de un cromosoma humano al final del proceso de interfase. El cromosoma se fijó, se desproteinizó y se aumentó su grosor artificialmente antes de la observación. El lazo observado tiene aproximadamente 15.000 pares de nucleótidos de longitud. Parece que unas proteínas especializadas conforman y mantienen la inserción del extremo 3' de cadena sencilla sobre las repeticiones de la doble hélice formando el lazo t. (A, a partir de J.D. Griffith et al., *Cell* 97:503-514, 1999. Con la autorización de Elsevier.)

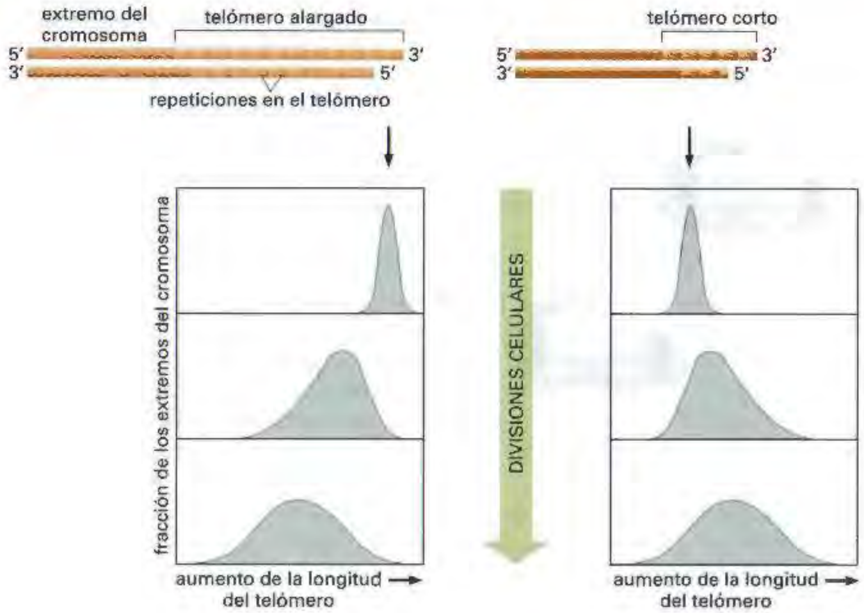


Figura 5–43 Demostración de que las células de levadura controlan la longitud de sus telómeros. En este experimento, un telómero situado en el extremo de un cromosoma cualquiera se alarga (*izquierda*) o se acorta (*derecha*) artificialmente más de lo normal. Después de muchas divisiones celulares, el cromosoma se recupera y presenta una longitud de telómero normal y una distribución de longitud típica y de acuerdo con el resto de cromosomas de levadura. Se ha propuesto un mecanismo de retroalimentación similar en células de la línea germinal de animales.

de que sus telómeros se acorten hasta la longitud normal de los telómeros humanos. Por ello quizás no es sorprendente que las primeras generaciones de ratones se desarrollen de forma normal. Sin embargo, los ratones de las últimas generaciones desarrollan progresivamente más defectos en algunos de sus tejidos más proliferativos. Además, estos ratones muestran signos de envejecimiento prematuro y tienen una tendencia pronunciada a desarrollar tumores. En éste y en otros aspectos, estos ratones se parecen a humanos afectados de la enfermedad genética *disqueratosis congénita.* Los individuos que padecen esta enfermedad sólo tienen una copia funcional de la telomerasa y por lo general mueren por un fallo progresivo de la médula ósea. También suelen desarrollar cicatrices de pulmón y cirrosis hepática y muestran anormalidades en varias estructuras epidérmicas (incluyendo la piel, las uñas y los folículos pilosos).

Las observaciones anteriores demuestran que el control de la proliferación celular mediante el acortamiento de los telómeros tiene riesgos para el organismo, porque no todas las células que empiezan a perder los extremos de los telómeros dejarán de dividirse. Algunas parece que se convierten en genéticamente inestables, pero continúan dividiéndose dando lugar a células que pueden transformarse en cancerosas. Así, nos podemos cuestionar si la disminución de telomerasa que se observa en muchas células somáticas humanas proporciona una ventaja evolutiva; como sugieren aquellos que postulan que el acortamiento de los telómeros proporciona una protección frente al cáncer y frente a otras enfermedades proliferativas.

Resumen

Las proteínas que inician la replicación del DNA se unen a secuencias de DNA en el origen de replicación y catalizan la formación de una burbuja de replicación con dos horquillas de replicación que se desplazan en sentidos opuestos. El proceso empieza cuandn se forma un complejo iniciador proteína-DNA y posteriormente carga una DNA helicasa al patrón de DNA. Después se añaden otras proteínas formando la "maquinaria de replicación" multienzimática que en cada horquilla de replicación cataliza la síntesis de DNA.

En bacterias y en algunos organismos eucariotas sencillos, los orígenes de replicación están determinados por secuencias de DNA específicas que tienen una longitud de unos centenares de pares de bases. En otros organismos eucariotas, como los humanos, parece que las secuencias necesarias para especificar el origen de replicación del DNA no están tan bien definidas y el origen puede abarcar varias miles de pares de bases.

Por lo general, las bacterias tienen un único origen de replicación en un cromosoma circular. Pueden replicar su genoma en menos de una hora, con una horquilla de replicación que se desplaza a una velocidad de 1000 nucleótidos por segundo. La replicación del DNA en células eucariotas sólo tiene lugar durante una parte del ciclo celular, la fase S. La horquilla de replicación se desplaza

aproximadamente 10 veces más despacio que la horquilla de replicación de bacterias; debido a la mayor longitud de los cromosomas es necesaria la presencia de varios orígenes de replicación para completar la replicación en la fase S, que suele durar unas 8 horas en las células humanas. En estos cromosomas eucariotas, los diferentes orígenes de replicación se activan siguiendo una secuencia, determinada en parte por la estructura de la cromatina, replicándose en último lugar las regiones de cromatina más condensada. Después de pasar la horquilla de replicación, la estructura de la cromatina se vuelve a formar con la adición de nuevas histonas a las histonas ya existentes que hereda cada molécula de DNA hija. El mecanismo de duplicación de los cromosomas permite que el patrón de modificaciones de histonas paterno se transmita a los cromosomas hijos y proporcione así un medio de transmisión de la herencia epigenética.

Los eucariotas resuelven el problema de la replicación de los extremos de sus cromosomas lineales con una estructura especializada en su extremo, el telómero, que se mantiene gracias a una DNA polimerasa especial llamada telomerasa. La telomerasa alarga una de las cadenas de DNA del final del cromosoma mediante un patrón de RNA que es parte integral de la propia enzima; el resultado es una secuencia de DNA altamente repetida de algunos miles de pares de nucleótidos al final de cada cromosoma.

REPARACIÓN DEL DNA

Mantener la estabilidad genética que un organismo necesita para vivir requiere no sólo mecanismos muy exactos para la replicación del DNA, sino también mecanismos para la reparación de muchas lesiones accidentales que ocurren continuamente en el DNA. Muchos de estos cambios espontáneos en el DNA son transitorios porque son corregidos de inmediato por unos procesos, que en conjunto se denominan **reparación del DNA**. Solamente se acumulan en forma de mutaciones en la secuencia de DNA unos cuantos de los miles de cambios al azar que se producen cada día en el DNA de una célula humana, producidos por sus accidentes metabólicos, distintos tipos de radiación y exposición a sustancias del ambiente. Por ejemplo, ahora sabemos que menos de 1 de cada 1000 cambios accidentales de bases en el DNA da lugar a una mutación permanente; el resto son eliminados con una eficacia extraordinaria, mediante la reparación del DNA.

La importancia de la reparación del DNA resulta evidente si nos fijamos en la enorme inversión que hacen las células en enzimas reparadoras de DNA. Por ejemplo, los análisis del genoma de bacterias y de levaduras han revelado que un alto porcentaje de la capacidad codificante de estos organismos se dedica a las funciones de reparación del DNA. La importancia de la reparación del DNA también queda demostrada por el incremento en la frecuencia de mutación que se produce tras la inactivación de un gen de reparación de DNA. Muchas de las proteínas de reparación del DNA y de los genes que las codifican (de los que ahora sabemos que actúan en una amplia variedad de organismos, incluidos los humanos) se identificaron originalmente en bacterias, mediante el aislamiento y la caracterización de

Tabla 5-2 Algunos síndromes hereditarios con defectos de reparación del DNA

SÍNDROME	FENOTIPO	ENZIMA O PROCESO AFECTADO
MSH2, 3, 6, MLH1, PMS2	cáncer de colon	reparación de errores
Xeroderma pigmentosum (XP) grupos A-G	cáncer de piel, sensibilidad celular a rayos ultravioleta (UV), anormalidades neurológicas	reparación por eliminación de nucleótidos
Variante XP	sensibilidad celular a UV, cáncer de piel	síntesis de la translesión mediante la DNA polimerasa η
Ataxia telangiectasia (AT)	leucemia, linfoma, sensibilidad a rayos γ, inestabilidad del genoma	proteína ATM, una proteína quinasa que se activa por roturas del DNA de doble cadena
BRCA2	cáncer de mama, de ovario y de próstata	reparación por recombinación homóloga
Síndrome de Werner	envejecimiento prematuro, cáncer en diferentes lugares, inestabilidad del genoma	exonucleasa 3' accesoria y DNA helicasa
Síndrome de Bloom	cáncer en diferentes lugares, atrofia en el crecimiento, inestabilidad del genoma	DNA helicasa accesoria para la replicación
Anemia de Fanconi grupos A-G	anormalidades congénitas, leucemia, inestabilidad del genoma	reparación por entrecruzamiento de DNA intercatenario
Paciente 46 BR	hipersensibilidad a agentes que dañan el DNA, inestabilidad del genoma	DNA ligasa I

mutantes que mostraban una mayor frecuencia de mutación o una mayor sensibilidad a agentes perjudiciales para el DNA.

Estudios recientes de las consecuencias de una capacidad reducida para la reparación del DNA en humanos han relacionado muchas enfermedades humanas con una menor capacidad de reparación (**Tabla 5–2**). Así, hemos visto que los defectos en un gen humano, que normalmente actúa reparando las bases mal apareadas durante el proceso de replicación del DNA, pueden conducir a una predisposición a heredar ciertos cánceres, lo cual refleja un aumento de la frecuencia de mutación. En otra enfermedad humana, *xeroderma pigmentosum* (XP), los individuos afectados tienen una sensibilidad extrema a la radiación ultravioleta porque no son capaces de reparar ciertos fotoproductos del DNA. Este defecto de reparación provoca un aumento de la frecuencia de mutación que conduce a graves lesiones de la piel y a un aumento en la susceptibilidad a ciertos cánceres.

Si no fueran corregidas, las alteraciones espontáneas del DNA podrían cambiar rápidamente las secuencias del DNA

El DNA es un material muy estable, tal como requiere el almacenamiento de información genética, pero también es una molécula orgánica susceptible de sufrir cambios espontáneos, incluso en las condiciones normales de la célula que, si no son reparados, pueden conducir a mutaciones (**Figura 5–44**). Por ejemplo, el DNA de cada una de las células humanas pierde cada día alrededor de 5000 bases púricas (adenina y guanina) porque los enlaces N-glucosídicos entre estas bases y la desoxirribosa se hidrolizan espontáneamente a través de una reacción llamada *despurinación*. De forma similar, en el DNA también se produce una *desaminación* de citosina a uracilo a una tasa de alrededor de 100 bases por célula y día (**Figura 5–45**). Las bases de DNA también se pueden dañar mediante metabolitos reactivos producidos en la misma célula (como las formas reactivas del oxígeno) o por exposición a productos químicos del ambiente. Asimismo, la radiación ultravioleta del sol puede favorecer la formación de un enlace covalente entre dos bases de pirimidina del DNA formándose, por ejemplo, un dímero de timina (**Figura 5–46**). Muchos de estos cambios podrían conducir, si no se corrigieran, a la eliminación de uno o más pares de bases, o a la sustitución de un par de bases de la cadena de DNA hija (**Figura 5–47**); entonces la mutación se propagaría a las siguientes generaciones celulares. Una tasa tan alta de cambios al azar en la secuencia de DNA tendría consecuencias desastrosas para un organismo.

La doble hélice de DNA es reparada con rapidez

La estructura de doble hélice del DNA es muy adecuada para la reparación porque contiene dos copias de toda la información genética, una en cada una de sus dos cadenas. Así, cuando se daña una de las cadenas, la cadena complementaria retiene una copia intacta con la misma información y esta copia por lo general se utiliza para restaurar la secuencia correcta de nucleótidos de la cadena dañada.

Un indicio de la importancia que tiene una hélice de doble cadena para el almacenamiento seguro de la información genética es que las células la utilizan; solamente unos

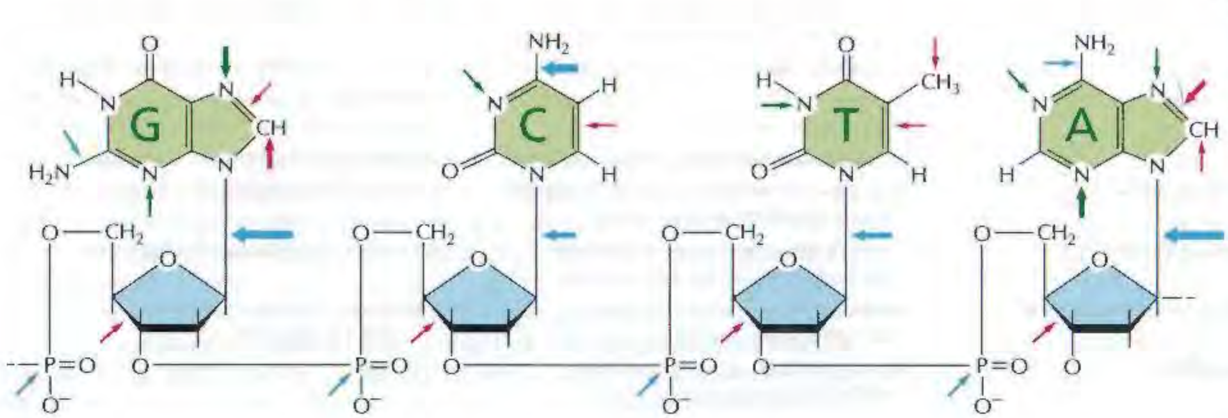


Figura 5–44 Resumen de alteraciones espontáneas que probablemente requieren reparación del DNA. Se muestran los lugares donde cada nucleótido es modificado por oxidación espontánea (*flechas rojas*), por hidrólisis (*flechas azules*) o por metilación no controlada mediante el dador de grupo metil S-adenosilmetionina (*flechas verdes*). El tamaño de las flechas indica la frecuencia relativa de cada acontecimiento. (A partir de T. Lindahl, *Nature* 362:709-715, 1993. Con la autorización de Macmillan Publishers, Ltd.)

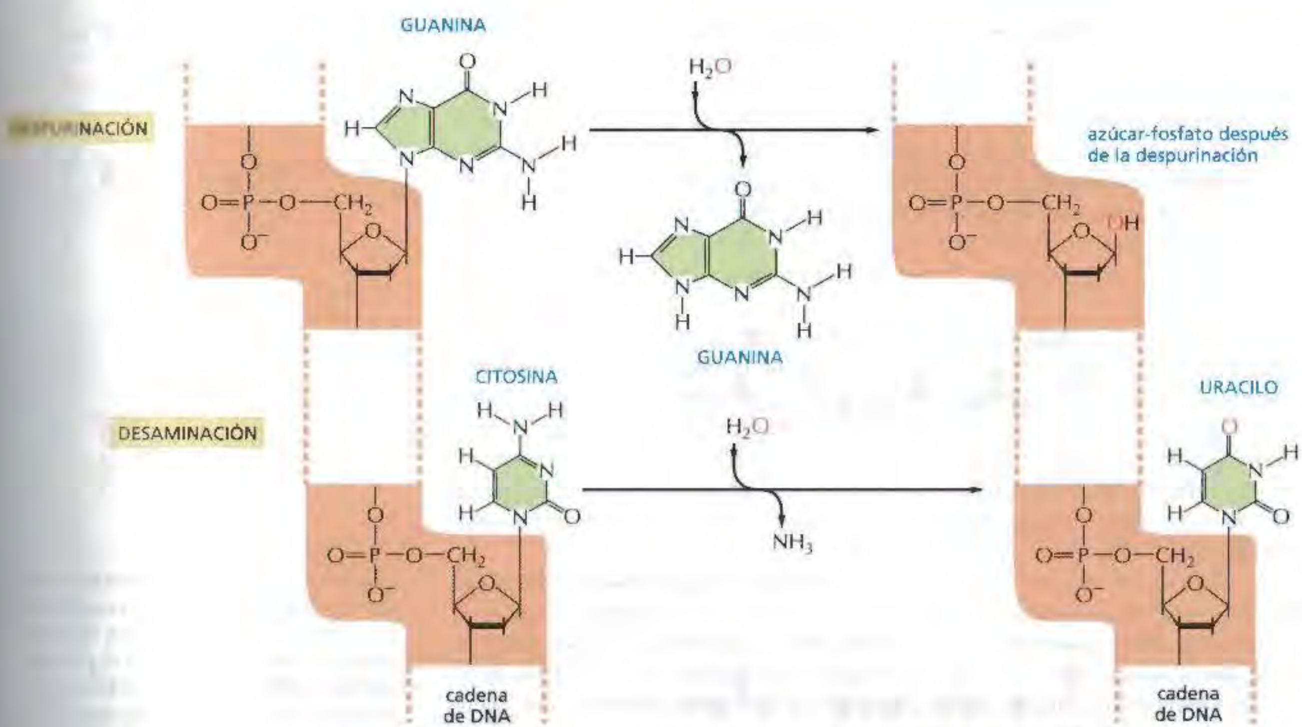


Figura 5–45 Despurinación y desaminación. Estas son las dos reacciones químicas espontáneas más frecuentes que se sabe que provocan daños importantes en el DNA de las células. La despurinación puede liberar guanina (como se muestra) a partir del DNA, además de adenina. El tipo mayoritario de desaminación transforma citosina en una base de DNA alterada, uracilo (mostrado aquí), pero la desaminación también se puede producir sobre otras bases. Estas reacciones normalmente tienen lugar en el DNA de doble hélice; sin embargo, para simplificar, solamente se muestra la cadena sencilla.

Algunos virus pequeños utilizan DNA de cadena sencilla o RNA como material genético. Los tipos de procesos de reparación descritos en esta sección no pueden actuar sobre estos ácidos nucleicos. Una vez dañados, la probabilidad de que un cambio de nucleótido resulte ser permanente, en los genomas de cadena sencilla de estos virus, es muy alta. Parece, pues, que los únicos organismos capaces de codificar su información genética en cualquier otra molécula distinta al DNA de doble hélice son aquellos que tienen genomas muy pequeños (y por lo tanto pocas dianas para el daño del DNA).

Las alteraciones del DNA pueden ser eliminadas por más de una vía

Las células disponen de muchas vías para reparar su DNA y utilizan distintas enzimas que actúan sobre distintos tipos de lesiones. En la **Figura 5–48** se muestran dos de las vías más comunes. En ambos casos, la porción de DNA dañada es eliminada, se restablece la secuencia original de DNA mediante una DNA polimerasa que utiliza la cadena no dañada como patrón y la rotura que queda en la doble hélice se sella mediante la DNA ligasa (véase Figura 5–13).

Ambas vías se diferencian en la manera en que se elimina la alteración de la cadena de DNA. La primera vía, llamada **reparación por eliminación de bases**, implica la actuación de una batería de enzimas diferentes llamadas *DNA glucosilasas*. Cada DNA glucosilasa reconoce un tipo de base de DNA alterada y cataliza su eliminación por hidrólisis. Como mínimo

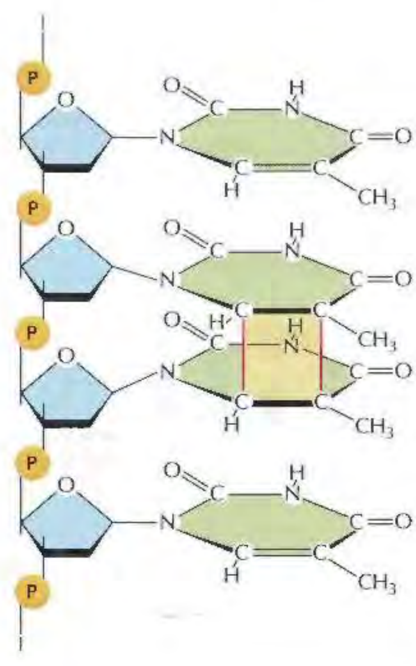


Figura 5–46 El dímero de timina más común. Este tipo de alteración ocurre en el DNA de células expuestas a radiación ultravioleta (como la luz solar). Puede formarse un dímero similar entre dos bases de pirimidina vecinas cualesquiera (residuos C o T) en el DNA.

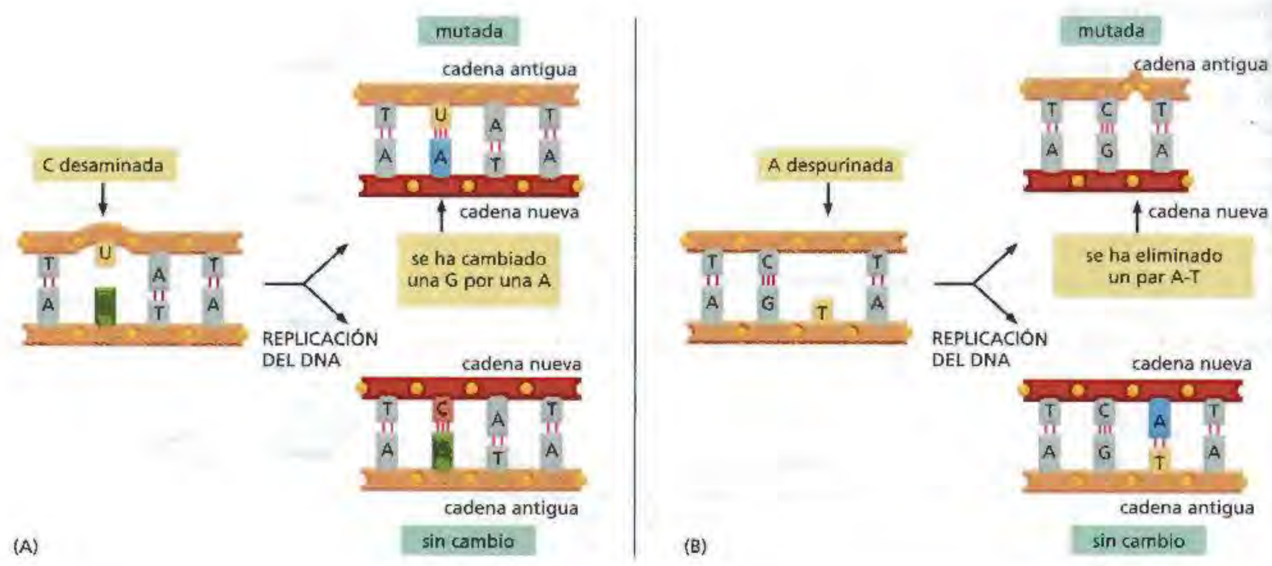
existen seis tipos de estas enzimas, entre las que se encuentran las que eliminan C desaminadas, A desaminadas, diferentes tipos de bases alquiladas u oxidadas, bases con anillos abiertos y bases en las que un doble enlace carbono–carbono se ha convertido accidentalmente en un enlace sencillo carbono–carbono. ¿Cómo se detecta la base alterada en el contexto de la doble hélice? Una etapa clave mediada enzimáticamente consiste en "darle la vuelta" al nucleótido alterado en la hélice, lo que permite a la enzima DNA glucosilasa probar todas las caras de la base en busca de daños (**Figura 5–49**). Se cree que estas enzimas se desplazan a lo largo del DNA utilizando esta capacidad de darle la vuelta a las bases para evaluar su estado en cada par de bases. Cuando una enzima encuentra una base dañada, la elimina del azúcar.

Este hueco creado por la acción de la DNA glucosilasa es reconocido por una enzima denominada *AP endonucleasa* (se denomina AP por los sitios *apurínicos* o *apirimidínicos* que la endonucleasa deja en la cadena de polinucleótidos), que corta el esqueleto de fosfodiéster, después de lo cual la alteración es eliminada y el hueco resultante se repara (véase Figura 5–48A). La despurinación, que es el tipo de alteración más frecuente del DNA, también da lugar a un azúcar de desoxirribosa sin su base. Las despurinaciones son reparadas directamente empezando con la AP endonucleasa y siguen la vía que se describe en la mitad inferior de la Figura 5–48A.

La segunda vía principal de reparación se llama **reparación por eliminación de nucleótidos**. Este mecanismo es capaz de eliminar casi cualquier tipo de gran lesión del DNA que genere un cambio importante en la estructura de la doble hélice de DNA. Entre las "grandes lesiones" se encuentran las que se generan a través de la reacción covalente de las bases del DNA con grandes moléculas de hidrocarbonos (como el compuesto carcinógeno benzopireno) o con varios dímeros de pirimidina T-T, T-C y C-C generados por la acción de la luz solar. En esta vía, un gran complejo multienzimático rastrea el DNA buscando, más que cambios específicos de bases, distorsiones en la doble hélice. Cuando se detecta una gran lesión, el esqueleto fosfodiéster de la cadena anormal es cortado a cada lado de la distorsión y una DNA helicasa elimina el fragmento de la cadena sencilla que contiene la lesión. A continuación, mediante una DNA polimerasa y una DNA ligasa, se repara el hueco producido en la cadena del DNA (Figura 5–48B).

Una alternativa a los procesos de reparación por eliminación de bases y por eliminación de nucleótidos es la inversión química directa del daño en el DNA; esta estrategia se utiliza para eliminar rápidamente ciertas lesiones citotóxicas o altamente mutagénicas. Por ejemplo, en la lesión de alquilación O^6-metilguanina, el grupo metil es eliminado por transferencia directa a un residuo cisteína de la propia proteína reparadora, la cual queda destruida por la reacción. En otro ejemplo, los grupos metilos implicados en las lesiones de alquilación 1-metiladenina y 3-metilcitosina son "quemadas" por una desmetilasa dependiente de hierro, con la liberación de formaldehído procedente del DNA metilado y la consiguiente generación de la base nativa.

Figura 5–47 Cómo producen mutaciones las modificaciones químicas de los nucleótidos. (A) La desaminación de la citosina, si no se corrige, da lugar a la sustitución de una base por otra cuando se replica el DNA. Como se muestra en la Figura 5–45, la desaminación de la citosina produce uracilo. El uracilo difiere de la citosina en sus propiedades de apareamiento de bases y preferentemente se aparea con adenina. De este modo, cuando la maquinaria de replicación del DNA se encuentra con un uracilo en la cadena patrón, añade una adenina. (B) El proceso de despurinación puede dar lugar a la pérdida de un par de nucleótidos. Como queda ilustrado, cuando la maquinaria de replicación detecta la ausencia de una purina en la cadena patrón puede saltar al siguiente nucleótido completo y producir así la eliminación del nucleótido en la cadena recién sintetizada. Existen muchos otros tipos de alteraciones del DNA (véase Figura 5–44) que, de no ser reparados, también producen mutaciones cuando se replica el DNA.



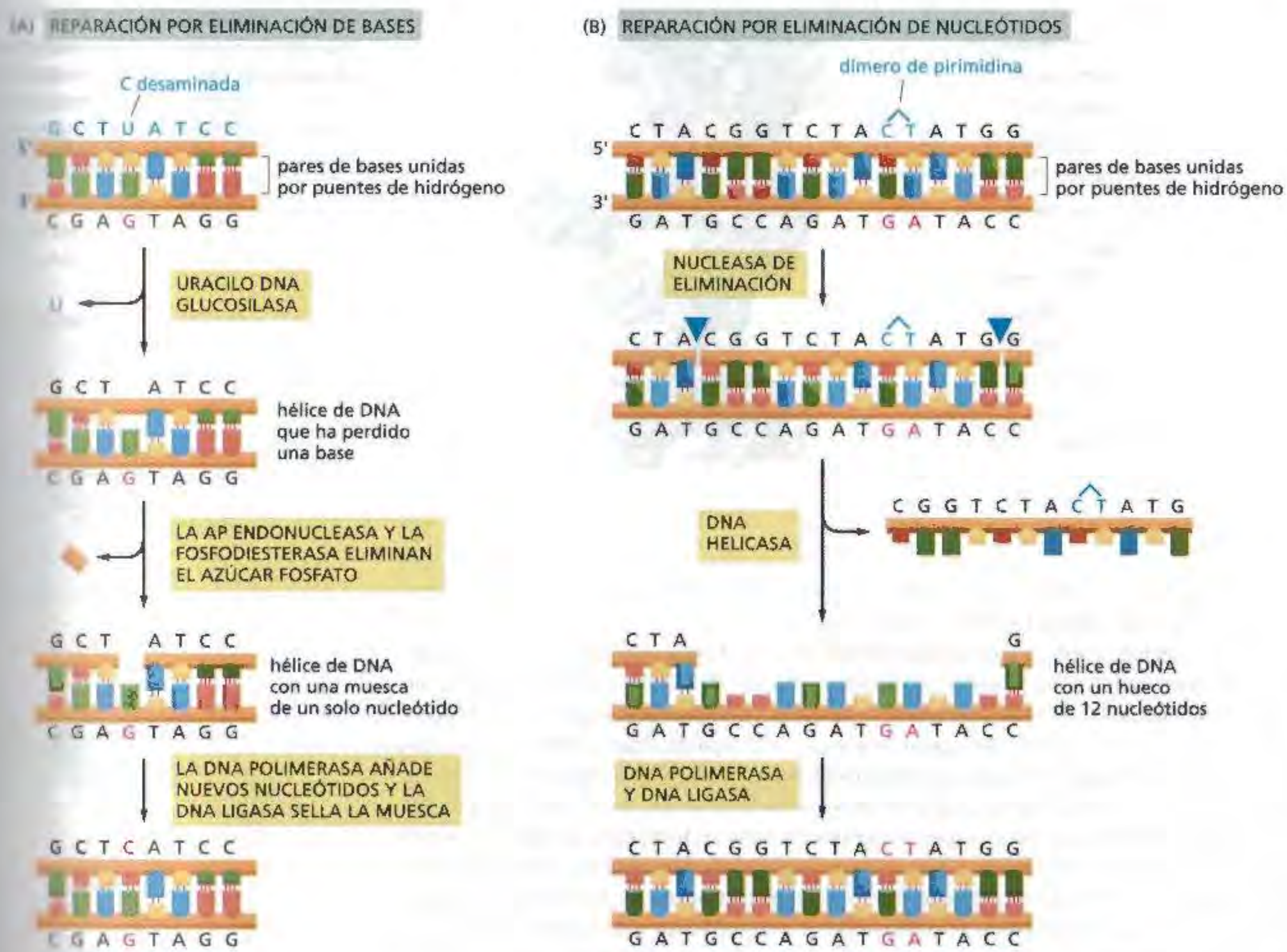


Figura 5–48 Comparación entre los dos sistemas principales de reparación del DNA. (A) *Reparación por eliminación de bases.* Esta vía empieza con una DNA glucosilasa. La enzima uracilo DNA glucosilasa elimina del DNA una citosina desaminada accidentalmente. Después de actuar esta glucosilasa (u otra DNA glucosilasa que reconozca otro tipo de alteración), el azúcar-fosfato al que estaba unida la base que se ha perdido se elimina mediante la acción secuencial de la AP endonucleasa y una fosfodiesterasa (estas mismas enzimas empiezan a reparar directamente los lugares despurinados). El hueco dejado por el nucleótido se rellena mediante la DNA polimerasa y la DNA ligasa. El resultado neto es que el U que fue generado por la desaminación accidental, es restaurado como C. El nombre de la AP endonucleasa se debe a que reconoce cualquier sitio de la hélice de DNA que contenga un azúcar desoxirribosa que ha perdido la base; estos sitios pueden aparecer por la pérdida de una purina (sitios *a*purínicos) o por la pérdida de una pirimidina (sitios *a*pirimídicos.) (B) *Reparación por eliminación de nucleótidos.* En las bacterias, después de que un complejo multienzimático reconozca una lesión, como un dímero de pirimidinas (véase Figura 5–46), se produce un corte a cada lado de la lesión y una DNA helicasa asociada elimina toda la porción de la cadena dañada. En las bacterias, la maquinaria de reparación por eliminación deja un hueco de 12 nucleótidos, como se muestra en el esquema. En humanos, una vez se ha reconocido el daño, se recluta una helicasa para separar de forma local las dos cadenas de DNA. Después, la nucleasa de eliminación entra y corta en ambos lados del daño dejando un hueco de unos 30 nucleótidos. La maquinaria de la reparación por eliminación de nucleótidos puede reconocer y reparar muchos tipos de alteraciones del DNA, tanto en humanos como en bacterias.

El acoplamiento de la reparación del DNA a la transcripción asegura que el DNA más importante de la célula se repara de forma eficiente

Todo el DNA de una célula está bajo constante vigilancia ante cualquier posible daño y los sistemas de reparación que se han descrito actúan sobre todo el genoma. Sin embargo, las células tienen un mecanismo para dirigir la reparación del DNA hacia las secuencias de DNA que se necesitan más urgentemente: la unión de la RNA polimerasa, la enzima que transcribe el DNA a RNA, en el primer paso de la expresión génica, e indica la reparación del DNA dañado. La RNA polimerasa se detiene ante una lesión del DNA y mediante unas proteínas acopladas, dirige la maquinaria de reparación hacia esos sitios. En las bacterias, en las que los genes son relativamente cortos, cuando la RNA polimerasa se detiene puede llegar para indicar disociarse del DNA, éste se repara y se inicia la transcripción de nuevo desde el principio. En los eucariotas, en los que los genes puede llegar a ser realmente grandes,

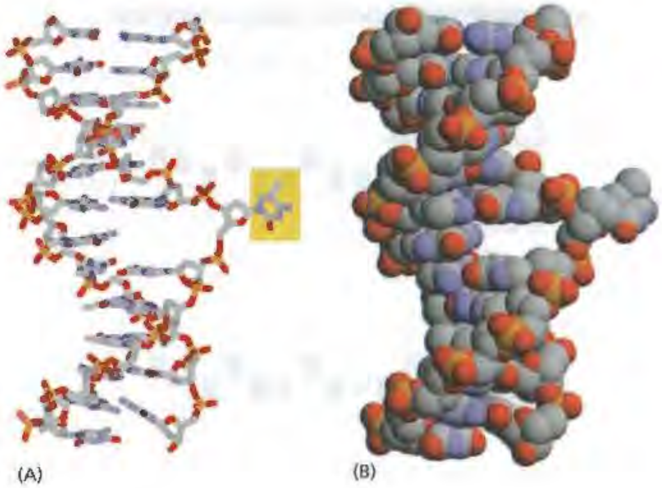


Figura 5–49 Reconocimiento de un nucleótido inusual en el DNA mediante el sistema de darle la vuelta a las bases. La familia de DNA glucosilasas reconoce bases específicas en la conformación que se ilustra. Cada una de estas enzimas corta el enlace glucosil que conecta una base reconocida particular (*amarillo*) con el azúcar del esqueleto, eliminándola del DNA. (A) Modelo en esqueleto; (B) modelo espacial.

se utiliza una reacción más compleja para hacer retroceder a la RNA polimerasa, reparar el daño y reanudar la actividad de la RNA polimerasa.

La *trascripción acoplada a la reparación* funciona con la eliminación de bases, la eliminación de nucleótidos y otra maquinaria de reparación que dirige de inmediato la reparación de las secuencias de DNA más importantes de la célula, es decir, aquellas que se están expresando cuando ocurre el daño. Hay que destacar que este tipo de reparaciones es específico para la cadena patrón del DNA que se está transcribiendo; la otra cadena se repara a la misma velocidad y con la misma eficiencia que el DNA que no está siendo transcrito. La transcripción acoplada a la reparación es especialmente ventajosa en humanos, ya que en un momento dado sólo se transcribe una pequeña fracción de nuestro genoma. Su importancia queda reflejada en individuos que padecen el síndrome de Cockayne, provocado por un defecto en la transcripción acoplada a la reparación. Estos individuos sufren retraso en el crecimiento, anormalidades esqueléticas, retraso neuronal progresivo y sensibilidad severa a la luz del sol. Se cree que muchos de estos problemas son debidos a que la RNA polimerasa se queda parada de forma permanente en los sitios con DNA dañado de genes importantes.

Las propiedades químicas de las bases del DNA facilitan la detección de las alteraciones

La doble hélice del DNA parece una estructura óptima para ser reparada. Como se describió anteriormente, contiene una copia de seguridad de toda la información genética. Pero también es importante que la naturaleza de las cuatro bases de DNA permita distinguir entre bases dañadas y no dañadas de forma clara. Por ejemplo, cualquier posible suceso de desaminación en el DNA da lugar a una base no natural, que puede ser reconocida y eliminada mediante una DNA glucosilasa específica. La hipoxantina, por ejemplo, es la base púrica más sencilla capaz de aparearse específicamente con C, pero la hipoxantina es el producto de desaminación directo de A (**Figura 5–50**A). La adición de un segundo grupo amino a la hipoxantina genera G, que no puede formarse a partir de A por desaminación espontánea y cuyo producto de desaminación (la xantina) también es único.

Como se explica en el Capítulo 6, se cree que el RNA apareció durante la evolución antes que el DNA y es probable que el código genético estuviera escrito en los cuatro nucleótidos A, C, G y U. Este hecho plantea la cuestión de por qué se reemplazó la U del RNA por la T (que es 5-metil U) del DNA. La desaminación espontánea de C la transforma en U, pero esta característica es relativamente inofensiva gracias a la uracil DNA glucosidasa. Sin embargo, si el DNA contuviera U como una base natural, el sistema de reparación podría tener dificultades para distinguir una C desaminada de una U natural.

En el DNA de los vertebrados ocurre una situación especial, ya que algunos nucleótidos C determinados están metilados en secuencias C-G específicas de genes inactivos (lo cual se expone en el Capítulo 7). La desaminación accidental de estos nucleótidos C metilados produce el nucleótido natural T (Figura 5–50B), el cual forma un apareamiento erróneo con el nucleótido G de la otra cadena del DNA. Para colaborar en la reparación de estos nucleótidos

desaminados y metilados, una DNA glucosidasa especial reconoce los apareamientos de bases erróneos, donde están involucrados nucleótidos T en las secuencias T-G, y elimina T. Sin embargo, este mecanismo de reparación del DNA debe ser relativamente ineficiente ya que los nucleótidos C metilados son lugares habituales de mutación en el DNA de los vertebrados. Es notable que, aunque en el DNA de los humanos sólo alrededor del 3% de los nucleótidos C están metilados, las alteraciones en estos nucleótidos constituyen cerca de una tercera parte de las mutaciones de una sola base que se han observado en enfermedades hereditarias humanas.

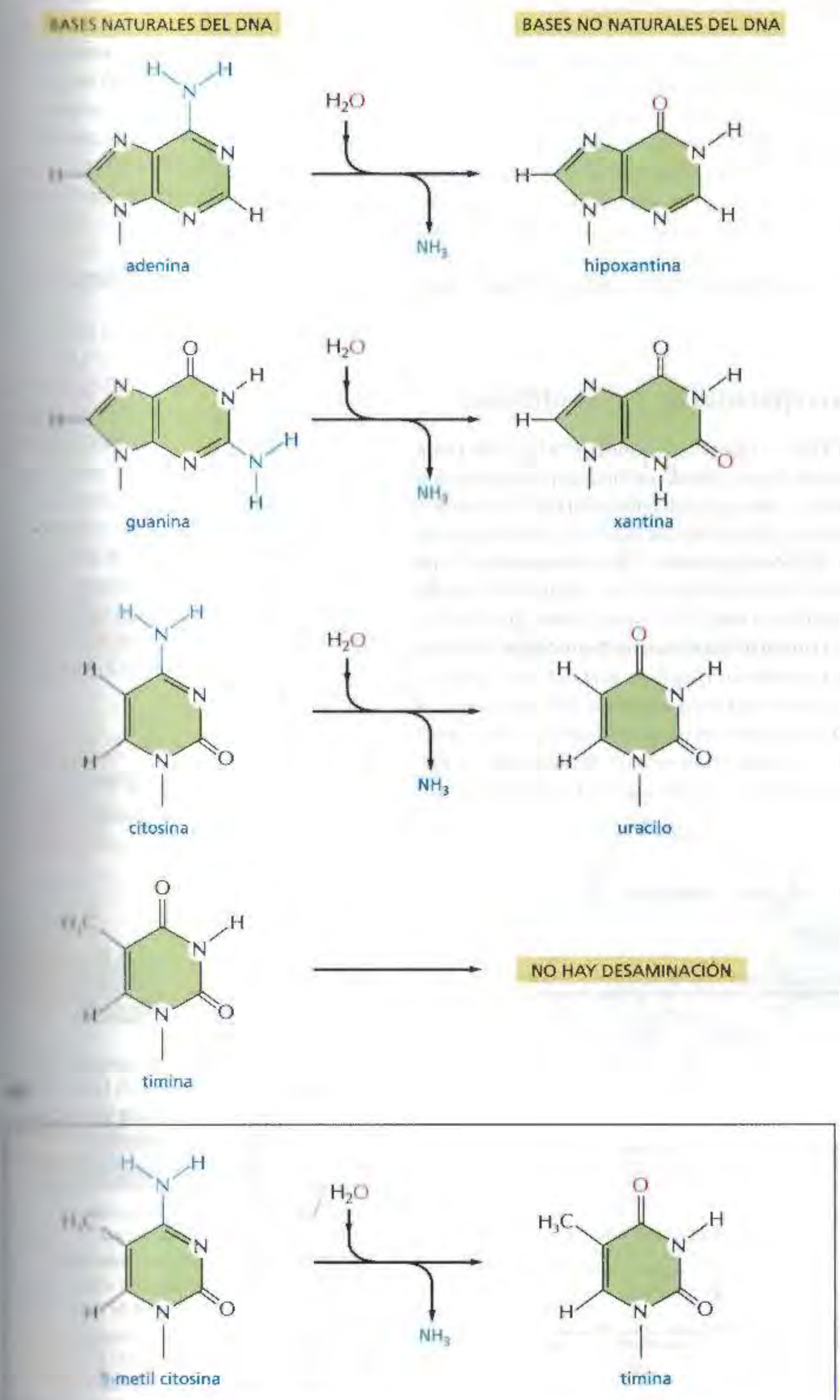


Figura 5–50 Desaminación de nucleótidos del DNA. En cada caso, el átomo de oxígeno añadido en la reacción con el agua, se marca en *rojo*. (A) Los productos de la desaminación espontánea de A y G son reconocidos como no naturales en cuanto aparecen en el DNA y, por ello, son rápidamente detectados y reparados. La desaminación de C a U ilustrada en la Figura 5–45; T no tiene ningún grupo amino para eliminar. (B) Alrededor del 3% de los nucleótidos C en vertebrados están metilados, lo cual ayuda a controlar la expresión génica (véase el Capítulo 7). Cuando estos nucleótidos 5-metil C son desaminados accidentalmente, forman un nucleótido T natural. Sin embargo, esta T se apareará con una G de la cadena opuesta y formará un apareamiento de bases incorrecto.

Se utilizan DNA polimerasas especiales para reparar el DNA en casos de emergencia

Si el DNA de una célula está gravemente dañado, los mecanismos de reparación de los que hemos hablado suelen ser insuficientes. En esos casos, se recurre a una estrategia diferente, que comporta un cierto riesgo para la célula. Las polimerasas que son muy estrictas en la replicación se paran cuando encuentran DNA dañado, de manera que en casos de emergencia la célula utiliza unas DNA polimerasas más versátiles pero menos precisas para empezar de nuevo la replicación del DNA dañado.

Las células humanas contienen más de 10 polimerasas diferentes de este tipo, algunas de las cuales pueden reconocer tipos de daños específicos de DNA y añadir el nucleótido que se necesita para reparar la secuencia inicial. Otras en cambio, sólo hacen "buenas suposiciones", sobre todo cuando la cadena patrón ha sido dañada extensamente. Estas enzimas no son tan precisas como las polimerasas replicativas normales cuando copian una secuencia de DNA normal, por ese motivo carecen de actividad de corrección de pruebas exonucleolítica; además, muchas de ellas son menos discriminantes que las polimerasas replicativas a la hora de elegir qué nucleótido deben incorporar. Se cree que por este motivo estas polimerasas sólo tienen la oportunidad de añadir uno o unos cuantos nucleótidos. A pesar de que los detalles de estas fascinantes reacciones todavía no se conocen en profundidad, proporcionan un elegante testimonio del cuidado con el que los organismos mantienen la integridad de su DNA.

Las roturas en la doble cadena son reparadas de forma eficiente

Cuando las dos cadenas de la doble hélice de DNA se rompen, se produce un tipo de alteración del DNA muy peligroso, porque no queda ninguna cadena patrón que permita la reparación precisa. Las roturas de este tipo son causadas por radiación ionizante, errores de replicación, agentes oxidantes y otros metabolitos producidos en la célula. Si se dejaran sin reparar, estas lesiones llevarían rápidamente al fraccionamiento de los cromosomas en pequeños trozos y a la pérdida de genes cuando la célula se dividiese. Sin embargo, existen dos mecanismos que han evolucionado permitiendo una mejora notable de este tipo de daño (**Figura 5–51**). El más sencillo de entender es la **unión de extremos no homólogos**, en el cual los extremos rotos se juntan y se vuelven a unir mediante la ligadura del DNA, por lo general con la pérdida de uno o más nucleótidos en el punto de unión (**Figura 5–52**). Este mecanismo de unión de extremos, el cual debe ser contemplado como una solución para las roturas de la doble hélice "rápida y sucia", es común en las células somáticas de los mamíferos. A pesar de la aparición de un cambio en la secuencia de DNA (una mutación) en el lugar de la ro-

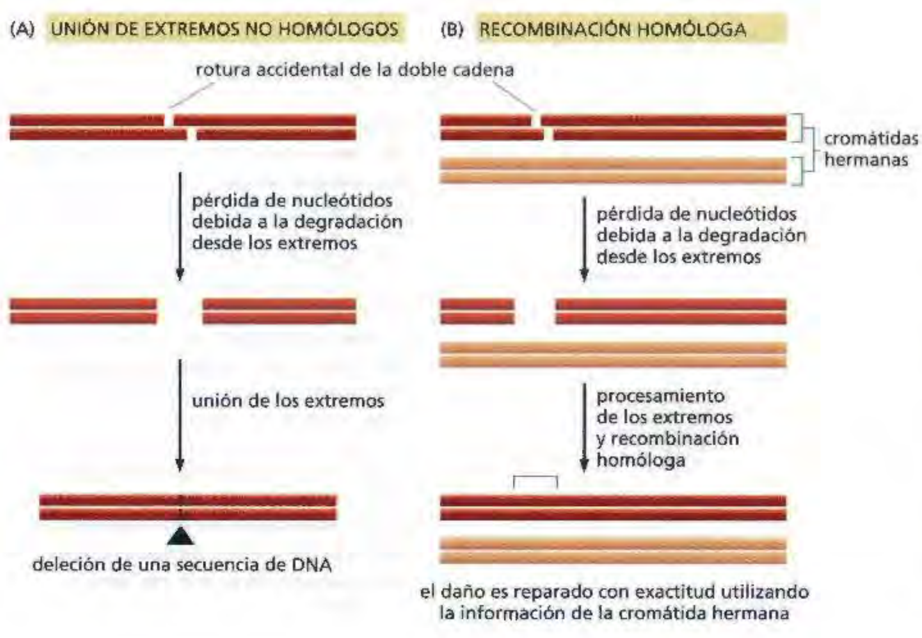


Figura 5–51 Dos vías diferentes para reparar roturas de la doble cadena. (A) La unión de extremos no homólogos altera la secuencia del DNA original cuando repara un cromosoma roto. Estas alteraciones pueden ser deleciones (como se muestra) o inserciones cortas. (B) La reparación de roturas de la doble cadena por recombinación homóloga es más difícil de conseguir, pero este tipo de reparación restaura la secuencia original de DNA. Normalmente tiene lugar después de la duplicación del DNA justo antes de que la célula se divida. Los detalles de la vía de la recombinación homóloga se verán más adelante (véase Figura 5–61).

sin, en mamíferos la porción del genoma que codifica proteínas es tan baja que aparentemente este mecanismo es aceptable para solucionar el problema de la unión de cromosomas rotos. En el tiempo en que un humano alcanza la edad de 70 años, cada célula somática contiene típicamente más de 2000 "cicatrices" de este tipo distribuidas a lo largo de su genoma, representando sitios en los que el DNA ha sido reparado de forma poco exacta por la unión de extremos no homólogos. Como se describió previamente, la estructura especial de los telómeros impide que los extremos naturales de los cromosomas puedan ser confundidos con roturas del DNA.

Un tipo de reparación de roturas de doble cadena mucho más exacto es el que ocurre en el DNA recién replicado (Figura 5–51B). En este caso, el DNA se repara utilizando la cromátida hermana como patrón. Esta reacción es un ejemplo de *recombinación homóloga*; consideraremos su mecanismo más adelante en este capítulo. Muchos organismos, para reparar las roturas de la doble hélice de DNA utilizan ambos mecanismos: la unión de extremos no homólogos y la recombinación homóloga. La unión de extremos no homólogos predomina en los humanos; la recombinación homóloga sólo se utiliza durante y poco después de la replicación del DNA (en las fases S y G_2), cuando las cromátidas hermanas están disponibles para ser utilizadas como patrón.

Las alteraciones del DNA retrasan la progresión del ciclo celular

Acabamos de ver que las células disponen de muchos sistemas enzimáticos que pueden reconocer y reparar muchos tipos de alteraciones en el DNA. Dada la importancia de mantener el DNA intacto y sin daños de una generación a la siguiente, las células eucariotas disponen de un mecanismo adicional que maximiza la eficiencia de sus enzimas de reparación del DNA: el retraso de la progresión del ciclo celular hasta completar la reparación del DNA. Como se expone en detalle en el Capítulo 17, el mantenimiento de la progresión ordenada del ciclo celular se consigue mediante *puntos de control* que aseguran que cada etapa se complete antes de continuar con la siguiente. El ciclo celular se detiene en muchos de estos puntos de control si se detecta DNA alterado. Así, en las células de mamífero, la presencia de alteraciones en el DNA puede bloquear la entrada a la fase S desde la fase G_1, reducir la velocidad de replicación del DNA una vez ha empezado la fase S y puede bloquear la transición desde la fase S a la fase M. Estos retrasos facilitan la reparación del DNA el tiempo suficiente para completarla.

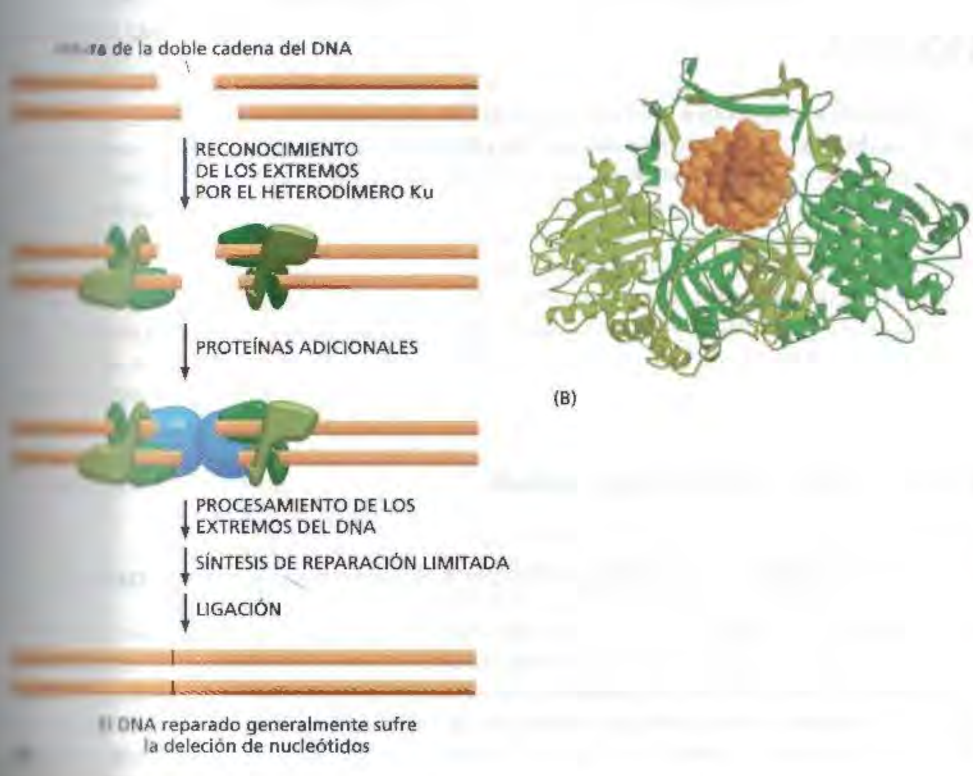


Figura 5–52 Unión de extremos no homólogos. (A) La proteína Ku, un heterodímero que sujeta los extremos del cromosoma roto, desempeña un papel principal en este proceso. Las proteínas adicionales que aparecen en la figura son necesarias para mantener juntos los extremos rotos mientras son procesados y por último unidos covalentemente. (B) La estructura tridimensional del heterodímero Ku unido a los extremos de un fragmento dúplex de DNA. La proteína Ku también es esencial para la unión V(D)J, un proceso de recombinación específico mediante el cual se genera la diversidad de anticuerpos y de receptores celulares de tipo T en el desarrollo de las células B y T (tratado en el Capítulo 25). La unión V(D)J y la unión de extremos no homólogos muestra muchas similitudes en cuanto al mecanismo, pero la primera depende de una rotura de la doble hélice específica producida por la célula. (B, extraído de J.R. Walker, R.A. Corpina y J. Goldberg, *Nature* 412:607-614, 2001. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

El daño en el DNA también provoca el aumento de la síntesis de algunas enzimas de reparación del DNA. La importancia de mecanismos especiales de señalización que responden a la alteración del DNA queda clara en el fenotipo de humanos que nacen con defectos en el gen que codifica la *proteína ATM*. Estos individuos sufren la enfermedad denominada *ataxia telangiectasia (AT)*, cuyos síntomas incluyen neurodegeneración, predisposición al cáncer e inestabilidad del genoma. La proteína ATM es una gran quinasa necesaria para generar las señales intracelulares que producen una respuesta a muchos tipos de daño espontáneo del DNA. Los organismos que presentan defectos en esta proteína sufren los efectos de las lesiones causadas por la falta de reparación del DNA.

Resumen

La información genética puede ser almacenada de forma estable en las secuencias de DNA, solamente porque un gran conjunto de enzimas reparadoras rastrean de forma continua el DNA y reemplazan cualquier nucleótido alterado. La mayoría de los tipos de reparación del DNA dependen de la presencia de una copia separada de la información genética en cada una de las dos cadenas de la doble hélice del DNA. De este modo, una enzima reparadora elimina una lesión accidental en una de las cadenas y resintetiza la cadena utilizando como referencia la información contenida en la cadena no alterada.

La mayor parte de las alteraciones en bases del DNA son eliminadas por una de las dos principales vías de reparación del DNA. En la reparación por eliminación de bases, la base alterada es eliminada por una enzima DNA glucosilasa y a continuación se corta el azúcar fosfato resultante. En la reparación por eliminación de nucleótidos, se elimina de la doble hélice de DNA una pequeña sección de la cadena de DNA que rodea la alteración en forma de oligonucleótido. En ambos casos, el hueco dejado en la hélice de DNA se rellena mediante la acción secuencial de una DNA polimerasa y una DNA ligasa, utilizando la cadena de DNA no alterada como patrón. Algunos tipos de daño del DNA se reparan mediante una estrategia diferente: la reversión química directa del daño, la cual es llevada a cabo por proteínas de reparación especializadas.

Otros sistemas de reparación cruciales –basados en mecanismos de unión de extremos no homólogos o en la recombinación homóloga– son capaces de corregir las roturas accidentales de la doble cadena que ocurren en la hélice de DNA. En la mayoría de las células, un nivel elevado de alteraciones en el DNA provoca un retraso en el ciclo celular mediante los puntos de control, los cuales aseguran que el DNA sea reparado antes de que la célula se divida.

RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

En las dos secciones anteriores se han estudiado los mecanismos a través de los cuales las secuencias de DNA de las células se mantienen, de generación en generación, con muy pocos cambios. En esta sección, profundizaremos en uno de esos mecanismos, la *recombinación homóloga*. Aunque la recombinación homóloga es crucial para reparar las roturas de la doble hélice de DNA (véase Figura 5–51B) y otros tipos de daño celular, ésta también puede reorganizar las secuencias de DNA. A menudo estas reordenaciones alteran tanto las versiones particulares de genes presentes en el genoma de un individuo como el momento y el nivel de expresión de estos genes. En una población, el tipo de variación producida por éste y otros tipos de recombinación genética es crucial para facilitar la evolución de los organismos en respuesta a un ambiente cambiante.

La recombinación homóloga tiene muchas utilidades en la célula

En la **recombinación homóloga** (conocida también como *recombinación general*), el intercambio génico se produce entre dos secuencias homólogas de DNA, es decir, secuencias de DNA similares o idénticas. La recombinación homóloga tiene muchas utilidades en la célula, pero tres de ellas son de suma importancia. La más extendida es la reparación exacta de las roturas de la doble cadena, como se describió en la sección anterior (Figura 5–51B). A pesar de que las roturas en la doble cadena pueden ser consecuencia de la radiación y de productos químicos reactivos, muchas de ellas se presentan en horquillas de replicación del DNA que se paran o se rompen. Esta aplicación de la recombinación homóloga es esencial

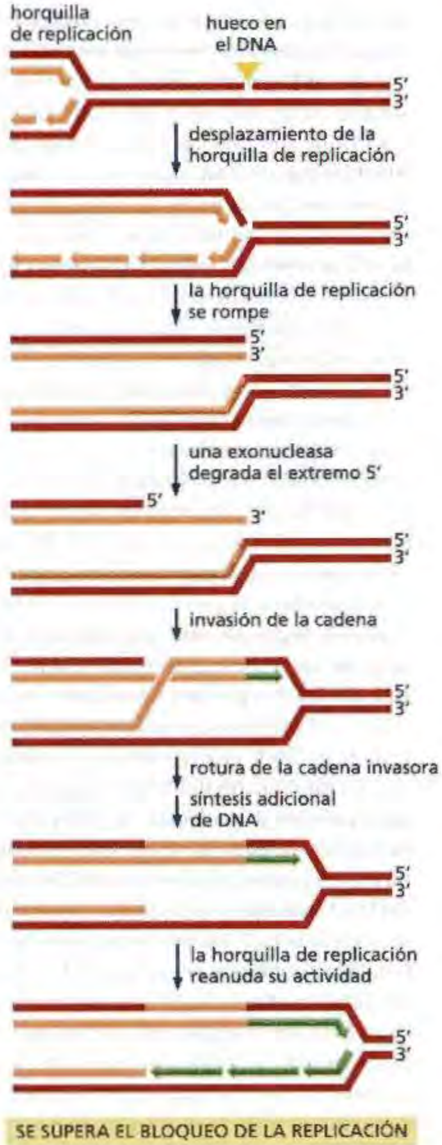


Figura 5-53 Reparación por recombinación homóloga de una horquilla de replicación rota. Cuando una horquilla de replicación en movimiento se encuentra con una rotura en una de las cadenas debería parar, pero el hueco puede ser reparado por recombinación homóloga. Tal y como se muestra en la figura, la invasión de la cadena inicial requiere la existencia de un extremo 3' libre generado por una nucleasa que degrada el extremo 5' de la cadena complementaria. La recombinación empieza con la invasión de la cadena, como se describe con más detalle en las figuras siguientes. Las puntas de flecha representan los extremos 3' de las cadenas de DNA. Los fragmentos de cadena dibujados en *verde* representan el DNA de nueva síntesis después de que la horquilla de replicación se haya roto. Nótese que en este mecanismo, la horquilla reanuda su actividad por delante del sitio en el que había la rotura en la cadena patrón original, utilizando como patrón una copia no dañada del sitio. (Adaptado de M.M. Cox, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 98:8173-8180, 2001. Con la autorización de National Academy of Sciences.)

para cualquier célula proliferativa, porque se producen accidentes prácticamente en cada ciclo de replicación del DNA.

Muchos tipos de sucesos pueden provocar que la horquilla de replicación se rompa durante el proceso de replicación. Consideremos sólo un ejemplo: un solo hueco en una de las cadenas paternas de la hélice de DNA justo enfrente de la horquilla de replicación. Cuando la horquilla alcanza la lesión, se cae, dando lugar a una cromátida rota y a una cromátida hermana intacta. Sin embargo, una serie de reacciones de recombinación, que pueden empezar por un proceso de *invasión de una de las cadenas* que dispara la síntesis de DNA por la DNA polimerasa, puede perfectamente reparar el cromosoma roto (**Figura 5-53**).

Además, la recombinación homóloga se utiliza para intercambiar bits de información genética entre dos cromosomas diferentes, dando lugar a nuevas combinaciones de secuencias de DNA en cada cromosoma. El beneficio evolutivo potencial de este tipo de mezclado de genes se basa en que da lugar a una serie de genes que quizá sean beneficiosos. Durante la meiosis en los hongos, en las plantas y en los animales, la recombinación homóloga también tiene un papel mecánico importante asegurando la correcta segregación de los cromosomas. En esta sección, sólo vamos a considerar las aplicaciones mayoritarias de la recombinación homóloga: las de reparación del daño del DNA y las de herramienta para el intercambio de información genética. Su aplicación mecánica más especializada en la segregación de cromosomas durante la meiosis será descrita en el Capítulo 21.

La recombinación homóloga tiene características comunes en todas las células

La visión actual de la recombinación homóloga como un mecanismo crítico de reparación del DNA en todas las células ha evolucionado lentamente desde su descubrimiento inicial como componente clave en el proceso especializado de la meiosis en plantas y animales. El posterior reconocimiento de que la recombinación homóloga también ocurría en organismos unicelulares menos complejos la hizo mucho más asequible para el análisis molecular. Así, la mayor parte de lo que sabemos de la bioquímica de la recombinación genética procede de estudios en bacterias, especialmente en *E. coli* y sus virus y de experimentos con eucariotas sencillos como las levaduras. Para estos organismos con tiempos de generación cortos y genomas relativamente pequeños, fue posible aislar un gran conjunto de mutantes con defectos en sus procesos de recombinación. Se identificó y estudió la bioquímica de la proteína alterada en cada mutante. Más recientemente también se han descubierto y caracterizado parientes cercanos de estas proteínas en *Drosophila*, ratones y humanos. Estos estudios pusieron de manifiesto que los procesos fundamentales que catalizan la recombinación homóloga son comunes en todas las células, como expondremos a continuación.

El apareamiento de bases de DNA guía la recombinación homóloga

La característica de la recombinación homóloga es que sólo tiene lugar entre dúplex de DNA que tienen largas regiones de secuencias similares (homólogas). Por lo tanto, no es sorprendente que este requerimiento se deba al apareamiento de bases. Los dos dúplex de DNA que van a sufrir recombinación homóloga "estudian" sus secuencias de DNA el uno del otro mediante un extensivo apareamiento de bases entre una cadena de un dúplex de DNA y la ca-

dena complementaria del otro dúplex. Para que la recombinación homóloga se lleve a cabo, el apareamiento no tiene que ser perfecto, pero sí muy similar.

En su forma más sencilla, este tipo de interacción de apareamiento de bases se puede simular en un tubo de ensayo, permitiendo que se forme de nuevo una doble hélice de DNA a partir de sus cadenas separadas. Este proceso, denominado *renaturalización del DNA* o **hibridación del DNA**, tiene lugar cuando una colisión al azar yuxtapone secuencias nucleotídicas complementarias de dos cadenas sencillas de DNA, lo cual permite la formación de una corta zona de doble hélice entre ellas. Este proceso relativamente lento de nucleación de la hélice, viene seguido de un proceso "en cremallera" muy rápido, en el que la doble hélice crece y aumenta al máximo el número de interacciones entre pares de bases (**Figura 5–54**).

La formación de una nueva doble hélice requiere que las cadenas de DNA se hallen en una conformación abierta y desplegada. Por esta razón, las reacciones de hibridación *in vitro* se desarrollan a elevadas temperaturas o en presencia de disolventes orgánicos como la formamida; estas condiciones permiten "fundir" las cortas hélices en horquilla que se forman cuando se producen interacciones entre pares de bases en una cadena que se pliega sobre sí misma. La mayoría de las células no pueden soportar condiciones tan severas como éstas, por lo que para abrir las hélices utilizan proteínas de unión a DNA de una sola cadena o *proteínas SSB* (*single-strand DNA-binding proteins*; véase p. 273). Estas proteínas son esenciales para la replicación del DNA (como se describió anteriormente) y para la recombinación homóloga; se unen con fuerza de forma cooperativa al esqueleto de azúcar–fosfato de cualquier región de una sola cadena de DNA, colocándola en una conformación extendida con sus bases asequibles (véase Figura 5–16 y 5–17). En esta conformación extendida, una cadena de DNA puede formar pares de bases tanto con una molécula de nucleósido trifosfato (en el proceso de replicación del DNA) como con secciones complementarias de otra cadena de DNA (en el proceso de recombinación genética).

La hibridación del DNA da lugar a una región de hélice de DNA formada por cadenas que proceden de moléculas de DNA diferentes. La formación de esta región, conocida como *heterodúplex*, es un paso esencial en cualquier proceso de recombinación homóloga. Debido a que la inmensa mayoría del DNA celular es de doble cadena, el modelo de hibridación del DNA realizado en tubo de ensayo no puede explicar por completo cómo ocurre este proceso en la célula. De hecho, se requieren mecanismos especiales para empezar la recombinación homóloga entre dos moléculas de doble cadena de DNA con secuencias de nucleótidos similares. Las proteínas que permiten la hibridación del DNA mediante la *invasión de cadena* son cruciales en este tipo de mecanismos –el apareamiento de una región de cadena sencilla de DNA con una cadena complementaria de una doble hélice de DNA diferente– tal y como describiremos a continuación.

La proteína RecA y sus homólogas permiten que una molécula de una sola cadena de DNA se aparee con una región homóloga de una doble hélice

Debido a que las interacciones entre pares de bases no pueden ocurrir entre dos dobles hélices de DNA intactas, la hibridación del DNA, que es crítica para la recombinación homólo-

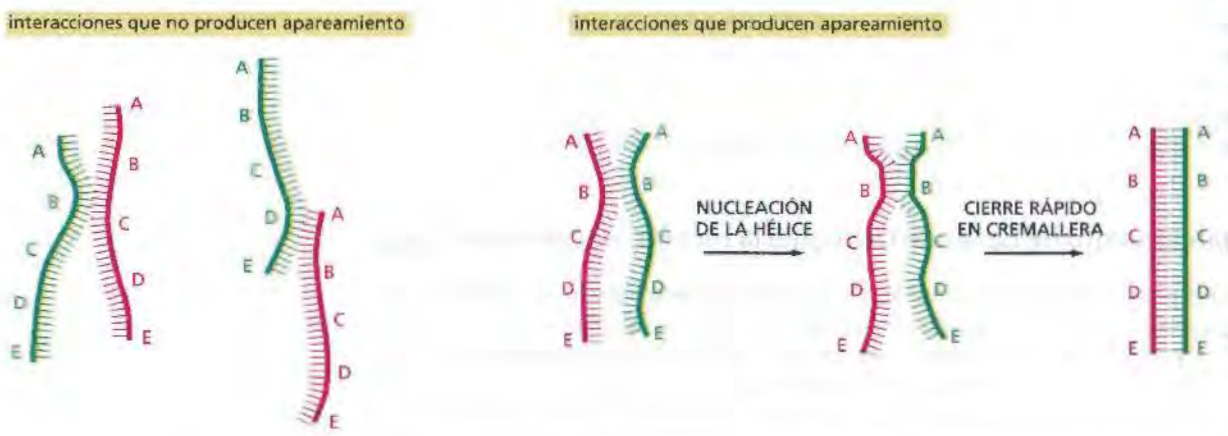


Figura 5–54 Hibridación del DNA. La doble hélice de DNA se vuelve a formar a partir de sus cadenas separadas mediante una reacción que depende de que dos cadenas complementarias de DNA se encuentren al azar. La gran mayoría de estos encuentros no son productivos, tal como se indica a la izquierda, pero algunos de ellos dan como resultado una corta región donde se forman bases complementarias (nucleación de la hélice). Entonces un rápido mecanismo de cierre en cremallera conduce a la formación de una doble hélice completa. Mediante este mecanismo de ensayo y error, una cadena de DNA encontrará su cadena complementaria incluso entre millones de cadenas de DNA no complementarias.

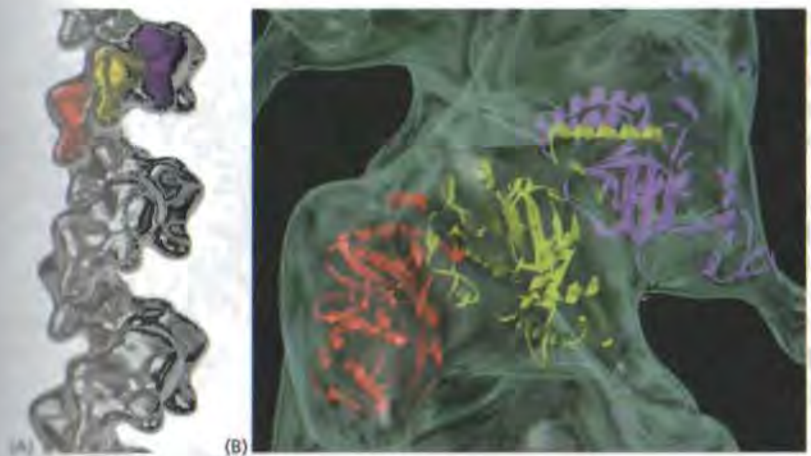


Figura 5–55 Estructura de los filamentos de proteína-DNA de RecA y Rad51. (A) La proteína Rad51, una proteína humana homóloga de la proteína RecA bacteriana, está unida a DNA de cadena sencilla. En la figura se han coloreado tres monómeros sucesivos en el filamento helicoidal. (B) Sección corta de un filamento de RecA, con una estructura tridimensional de la proteína que se ajusta a la imagen del filamento determinada por microscopía electrónica. Existen alrededor de seis monómeros de RecA por vuelta de la hélice, que abrazan 18 nucleótidos de la cadena sencilla de DNA que sujeta la proteína. No se conoce la posición exacta del DNA en esta estructura. (A, cortesía de Edward Egelman; B, a partir de X. Yu et al., *J. Mol. Biol.* 283:985-992, 1998. Con la autorización de Academic Press.)

es sólo puede empezar después de que una cadena de una de las hélices de DNA sea liberada del apareamiento con su cadena complementaria, de esta manera deja expuestos sus nucleótidos necesarios para aparearse con una segunda hélice. En el ejemplo de la Figura 5–53, la cadena sencilla libre se forma cuando la horquilla de replicación encuentra un hueco, se separa y genera un extremo nuevo de doble cadena; entonces, una exonucleasa degrada el extremo 5' de la rotura, dejando una cadena sencilla no apareada en el extremo 3'. En otras aplicaciones de la recombinación homóloga, las regiones de cadena sencilla se generan a través de sistemas similares a éste, como trataremos posteriormente.

La cadena sencilla en el extremo 3' del DNA es tratada por diversas proteínas especializadas que la dirigen hacia la invasión del dúplex de DNA homólogo. La **proteína RecA** (nomenclatura de *E. coli*) y su homóloga **Rad51** (nomenclatura en casi todos los organismos eucariotas) tienen una importancia central en este proceso (**Figura 5–55**). Del mismo modo que una proteína de unión a DNA de cadena sencilla, las proteínas de tipo RecA se unen con fuerza y en largos agregados cooperativos a DNA monocatenario formando un filamento de nucleoproteína. Dado que cada monómero de RecA tiene más de un punto de unión al DNA, el filamento de RecA sujeta a la vez una cadena sencilla y una doble hélice (Figura 5–56). Esta ordenación permite que RecA catalice una reacción de *sinapsis de DNA* de varias etapas entre una doble hélice de DNA y una región homóloga del DNA de cadena sencilla. En el primer paso, la proteína RecA entrecruza la cadena sencilla de DNA y el DNA dúplex con independencia de la secuencia. A continuación, el DNA de cadena sencilla "busca" el dúplex por homología de secuencias. Todavía no se entiende completamente cómo ocurre la búsqueda y el reconocimiento eventual, pero debe implicar la formación de pares de bases transitorios entre la cadena sencilla y las bases que giran desde el dúplex de DNA (véase Figura 5–49). Una vez que la secuencia homóloga ha sido localizada, sucede una invasión de cadena: la cadena sencilla desplaza una de las cadenas del dúplex mientras forma los pares de bases convencionales con la otra cadena del dúplex. El resultado es un **heterodúplex** –una región de DNA de doble hélice formada por el apareamiento de dos cadenas de DNA que inicialmente formaban parte de moléculas de DNA diferentes (véase Figura 5–56).

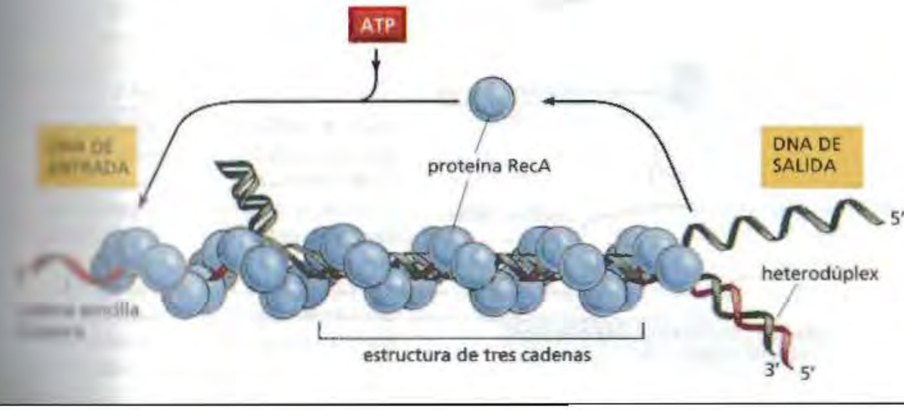


Figura 5–56 Sinapsis del DNA catalizada por la proteína RecA. Experimentos *in vitro* muestran la formación de varios tipos de complejos entre una cadena sencilla de DNA (*rojo*) cubierta por la proteína RecA (*azul*) y una hélice doble de DNA (*verde*). Primero se forma un complejo de bases no apareadas, que se convierte en una "molécula de unión" cuando encuentra una región de secuencia homóloga. Este complejo es dinámico y genera un heterodúplex de DNA (una cadena *verde* y la otra cadena *roja*) más una cadena sencilla desplazada de la hélice original (*verde*). Así, en la figura de este diagrama, migra hacia la izquierda, enrollando el "DNA de entrada" mientras se produce el "DNA de salida". (Adaptado de S.C. West, *Annu. Rev. Biochem.* 61:603-640, 1992. Con la autorización de Annual Reviews.)

La búsqueda de homología y la invasión de un dúplex de DNA por una cadena sencilla son las reacciones críticas que inician la recombinación homóloga. Éstas también requieren de proteínas del tipo RecA y proteínas de unión a cadena sencilla (diversas proteínas con funciones especializadas). Por ejemplo, la proteína Rad52 desplaza las proteínas de unión a cadena sencilla y permite la unión de moléculas Rad51; además promueve la adición de cadenas sencillas complementarias (**Figura 5–57**).

La corta región de heterodúplex que se ha formado donde la cadena sencilla invasora se ha apareado con su cadena complementaria en el dúplex de DNA, frecuentemente es alargada por un proceso llamado migración de cadenas, como se explicará a continuación.

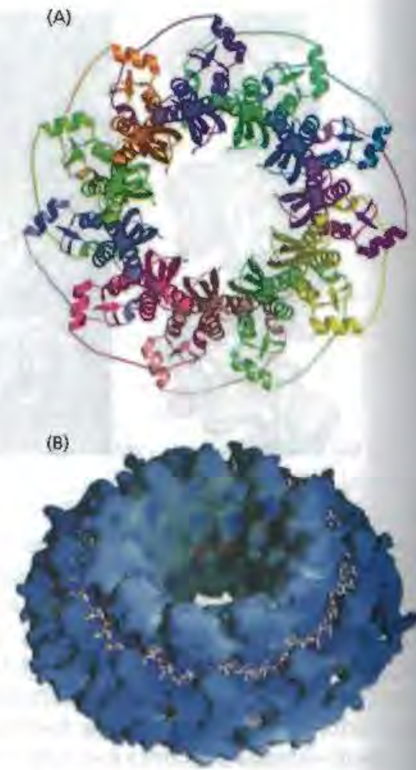


Figura 5–57 Estructura de una porción de la proteína Rad52. (A) Esta estructura en forma de donut está formada por 11 subunidades. (B) El DNA de cadena sencilla ha sido modelado dentro del surco profundo que hay a lo largo de la superficie de la proteína. Las bases del DNA están expuestas, una configuración que se ha propuesto para mediar el ensamblaje de dos cadenas sencillas complementarias. (A partir de M.R. Singleton et al., *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 99:13492-13497, 2002. Con la autorización de National Academy of Sciences.)

La migración de cadenas puede alargar las regiones de heterodúplex o dejar el DNA de nueva síntesis como DNA de cadena sencilla

Una vez se ha producido la reacción de invasión, el punto de intercambio de las cadenas (el "punto de bifurcación") se puede desplazar mediante un proceso llamado *migración de cadenas* (**Figura 5–58**). En esta reacción, una región no apareada de una de las cadenas sencillas de DNA desplaza a otra cadena sencilla apareada, de forma que el punto de bifurcación se desplazará sin que varíe el número total de pares de bases del DNA. A pesar de que la migración de cadenas puede producirse de forma espontánea, lo hace de forma igual en ambas direcciones, de manera que no progresa demasiado (Figura 5–58A). Sin embargo, unas DNA helicasas especializadas catalizan la migración en un solo sentido del punto de bifurcación y rápidamente producen una región heterodúplex que puede tener una longitud de varios miles de pares de bases (Figura 5–58B).

En una reacción relacionada con ésta, la síntesis de DNA catalizada por la DNA polimerasa puede conducir la migración del punto de bifurcación en un solo sentido, a través del cual el DNA de nueva síntesis es desplazado como cadena sencilla y mimetiza la forma en la que la RNA polimerasa libera el RNA recién sintetizado. Parece que esta forma de síntesis de DNA se utiliza en diversos procesos de recombinación homóloga, incluidos los de reparación de roturas en la doble cadena del DNA que describimos a continuación.

La recombinación homóloga puede reparar de forma perfecta roturas en la doble cadena del DNA

Al principio de este capítulo, se trataron los graves problemas que pueden causar las roturas en la doble cadena del DNA y cómo las células reparan estas roturas por dos vías diferentes. La unión de extremos no homólogos (véase Figura 5–51) se lleva a cabo sin un

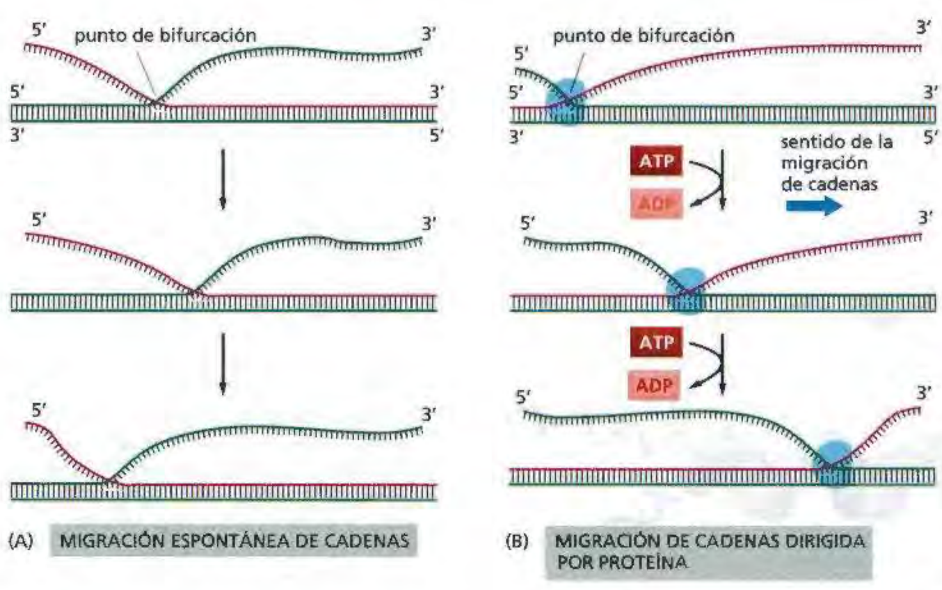


Figura 5–58 Dos tipos de migración de cadenas de DNA observados en experimentos *in vitro*. (A) La migración espontánea de cadenas es un proceso de desplazamiento al azar hacia atrás y hacia adelante y, por consiguiente, progresa muy poco a distancias largas. (B) La migración de cadenas dirigida por proteína requiere energía y desplaza el punto de bifurcación a una velocidad uniforme y en un solo sentido.

patrón y da lugar a una mutación en el punto en el que los dos dúplex se unen. También puede, de forma inadvertida, unir segmentos pertenecientes a dos cromosomas dando lugar a translocaciones cromosómicas, muchas de las cuales tienen serias consecuencias para la célula. A diferencia de este proceso, la recombinación homóloga puede reparar las roturas en la doble cadena de forma precisa, sin la pérdida o la alteración de los nucleótidos en el punto de reparación (**Figura 5–59**). En muchas células, la reparación de roturas en la doble cadena por recombinación sucede únicamente después de que la célula haya replicado su DNA, cuando un dúplex de DNA hijo puede ser utilizado como patrón para reparar el otro.

La recombinación homóloga también se puede utilizar para reparar muchos otros tipos de alteraciones del DNA, siendo quizá el mecanismo de reparación de DNA más versátil del que dispone la célula. La naturaleza "multiuso" de la reparación por recombinación [illegible] explica por qué se han conservado en casi todas las células de la Tierra tanto el mecanismo como las proteínas que lo llevan a cabo.

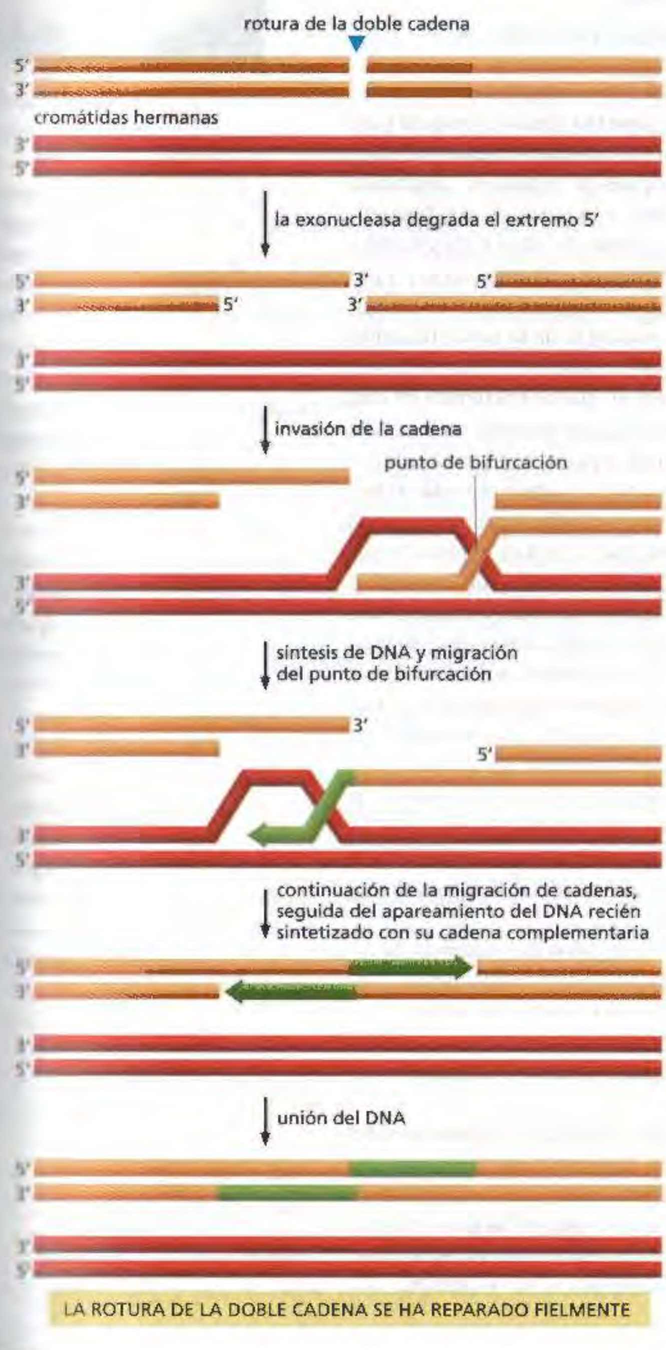


Figura 5–59 Mecanismo de reparación de roturas de la doble cadena por recombinación homóloga. Éste es el método más utilizado para la reparación de las roturas en la doble cadena que aparecen poco después de la replicación del DNA, cuando las cromátidas hermanas todavía están unidas. La reacción utiliza muchas de las proteínas que aparecen en la Figura 5–53 y sigue los mismos pasos intermedios básicos. En general, la recombinación homóloga puede considerarse como una serie flexible de reacciones, en la que la vía exacta difiere de una reacción a otra. Por ejemplo, la longitud del "parche" puede variar de forma considerable según la extensión del procesamiento 5', de la migración de cadenas y de la síntesis de nuevo DNA. (Véase M. McVey, J. LaRocque, M.D. Adams, y J. Sekelsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:15694-15699, 2004.)

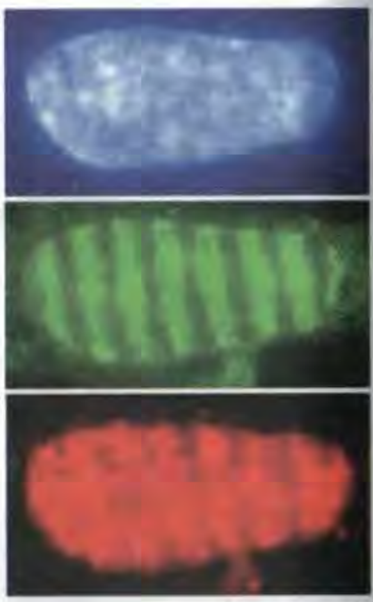


Figura 5–60 Experimento que demuestra la rápida localización de las proteínas de reparación de las roturas de la doble cadena del DNA. Se irradiaron fibroblastos humanos con rayos X para producir roturas en la doble cadena del DNA. Antes de que las radiaciones golpeen las células, éstas son pasadas a través de una rejilla microscópica con barras absorbentes de rayos X separadas por 1 µm de distancia. Esta técnica produce un patrón a rayas en el daño del DNA y permite la comparación del dañado con el no dañado en un mismo núcleo. (A) DNA total en el núcleo de un fibroblasto teñido con DAPI. (B) Sitios de nueva síntesis de DNA en el mismo núcleo indicados por la incorporación de BudR (un análogo de la timina) y la posterior tinción con anticuerpos específicos contra BudR marcados con FITC. (C) Localización del complejo Mre11 en el DNA dañado visualizado por anticuerpos contra la subunidad Mre11 marcados con rojo Texas. Se ha propuesto que el complejo Mre11 reconoce las roturas de la doble cadena en la célula y entonces moviliza proteínas adicionales para reparar las roturas mediante recombinación homóloga (véase Figura 5–59). (A), (B) y (C) han sido procesadas durante 30 minutos después de ser irradiadas con rayos X. (Extraído de B.E. Nelms et al., *Science* 280:590-592, 1998. Con la autorización de AAAS.)

Las células regulan estrechamente la utilización de la recombinación homóloga en la reparación del DNA

A pesar de que la recombinación homóloga soluciona el problema de reparar de forma fiel las roturas de doble cadena y otros tipos de daño del DNA, presenta algunos peligros para la célula, de manera que debe estar finamente regulada. Por ejemplo, la secuencia de DNA en un cromosoma homólogo puede quedar no funcional después de "repararse" utilizando el otro cromosoma homólogo como patrón. La *pérdida de heterocigosidad* es, con frecuencia, un paso crítico en la formación de cánceres (tal como se describe en el Capítulo 20) y las células tienen unos mecanismos para minimizarlo que todavía se conocen poco. A pesar de que es extraño en las células normales, la pérdida de heterocigosidad puede ser observada como un desafortunado efecto secundario de la versatilidad de la recombinación homóloga.

Otro tipo de control sobre la reparación por recombinación, que se encuentra en casi todas las células eucariotas, previene la reparación basada en la recombinación en ausencia de daño en el DNA. Normalmente, las enzimas que catalizan la reparación por recombinación se sintetizan en grandes cantidades en los eucariotas y están dispersas por todo el núcleo. En respuesta al daño en el DNA, estas proteínas convergen rápidamente en los sitios dañados y forman "fábricas de reparación" en las que parece que se juntan y reparan muchas lesiones del DNA (**Figura 5–60**). Esta rápida movilización de proteínas de reparación hacia lugares de daño en el DNA está estrechamente controlada por la célula y requiere una serie de proteínas adicionales. Dos de ellas, las proteínas *Brca1* y *Brca2*, fueron descubiertas porque algunas mutaciones en sus genes aumentan en gran medida la frecuencia de cáncer de mama. Mientras que la eliminación de una proteína esencial para la recombinación homóloga (como la proteína Rad51 humana) conduciría a la muerte celular, una alteración en una de estas proteínas accesorias equivaldría a una reparación deficiente. La acumulación de daño en el DNA que se deriva de ello puede, en una pequeña proporción de células, dar lugar a un cáncer. Brca2 se une a la proteína Rad51 y evita su polimerización sobre el DNA manteniéndola en la forma inactiva. Se cree que Brca2 colabora en el transporte rápido de la proteína Rad51 a los lugares de daño y, una vez están en el sitio adecuado, la libera en su forma activa.

En el Capítulo 20 veremos que en humanos, tanto un exceso como una carencia de recombinación homóloga pueden conducir a cáncer, en el primer caso por una pérdida de heterocigosidad y, en el segundo, por un aumento en la tasa de mutación causado por una reparación ineficiente. Durante la evolución un delicado equilibrio mantiene este proceso en jaque en el DNA no dañado, mientras que permite una actuación rápida y eficiente en las lesiones del DNA en cuanto aparecen.

Las bacterias también regulan su recombinación y otras enzimas de reparación del DNA, pero esto sucede en gran parte mediante el control de sus niveles intracelulares. En respuesta a un daño severo en el DNA, *E. coli* incrementa la transcripción de muchas enzimas de reparación como parte de la llamada *respuesta SOS*. Esta respuesta incluye enzimas de reparación por eliminación de nucleótidos, polimerasas propensas a cometer errores que pueden utilizar DNA dañado como patrón y proteínas que median la recombinación homóloga.

Estudios en bacterias mutantes, deficientes en partes de la respuesta SOS, demuestran que las proteínas recién sintetizadas tienen dos funciones. La primera, como era de esperar, es que la inducción de estas enzimas de reparación adicionales aumenta la probabilidad de supervivencia de la célula después de que el DNA haya sido dañado. La segunda de las funciones consiste en que muchas de las proteínas inducidas transitoriamente aumentan la tasa de mutación mediante un aumento en el número de errores al copiar las secuencias de DNA. Los errores son causados por la producción de DNA polimerasas de baja fidelidad, que son capaces de utilizar DNA dañado como patrón para la síntesis de nuevo DNA. Mientras esta reparación de DNA propensa a errores puede ser dañina para las células bacterianas, se cree que es ventajoso a largo plazo porque produce un abanico de variabilidad genética en la población bacteriana que incrementa la probabilidad de que aparezca una célula mutante mejor adaptada para la supervivencia en el entorno alterado.

Las uniones tipo Holliday a menudo se forman durante las recombinaciones homólogas

La recombinación homóloga se puede ver como un grupo de reacciones relacionadas que utilizan la invasión de cadena sencilla, la migración de cadenas y la síntesis de DNA limitada para intercambiar DNA entre dos dobles hélices de secuencias de nucleótidos similares. Una vez analizado su papel en la reparación precisa del DNA dañado, se describió la recombinación homóloga como una herramienta que permite generar moléculas de DNA con una secuencia nueva. Durante este proceso a menudo se forma un DNA intermediario especial que contiene cuatro cadenas de DNA compartidas entre dos hélices de DNA. En esta estructura intermediaria, conocida como **unión de Holliday**, o *intercambio cruzado de cadenas* (entrecruzamiento), dos cadenas de DNA se intercambian entre las dos dobles hélices. La unión de Holliday puede adoptar varias conformaciones. Un conjunto especial de proteínas de recombinación se adhiere y estabiliza el isómero abierto y simétrico (**Figura 5–61**). Utilizando la energía de la hidrólisis del ATP para coordinar la migración de las dos cadenas, estas proteínas pueden desplazar rápidamente a lo largo de las dos hélices el punto en el que las dos hélices de DNA se juntan (**Figura 5–62**).

Las estructuras de cuatro cadenas de DNA formadas por recombinación homóloga sólo se observan de forma transitoria en las células. Así, para regenerar dos hélices de DNA separadas y concluir el proceso de recombinación, las dos cadenas entrecruzadas deben cortarse en un proceso conocido con el nombre de *resolución*. En las bacterias, en las que se conoce mejor este proceso, una endonucleasa especializada (llamada RuvC) corta la unión de Holliday y deja huecos en el DNA que pueden ser sellados fácilmente por una DNA ligasa. Sin embargo, durante los procesos meióticos que producen las células germinales en los eucariotas (espermatozoides y óvulos en los animales), los mecanismos de resolución parecen ser mucho más complicados.

Como veremos en el Capítulo 21, la recombinación homóloga extensiva sucede como parte integral del proceso en el que los cromosomas son repartidos en las células germinales durante la meiosis. Ambos, el *entrecruzamiento de cromosomas* y la *conversión génica*, se producen como consecuencia de estos fenómenos de recombinación y tienen como resultado cromosomas híbridos que contienen información genética de los homólogos materno y paterno (**Figura 5–63**A).

A continuación se constatará que en la meiosis, tanto el entrecruzamiento como la conversión génica son generados por un mecanismo de recombinación homóloga que, en el fondo, es similar al utilizado para la reparación de roturas de doble cadena.

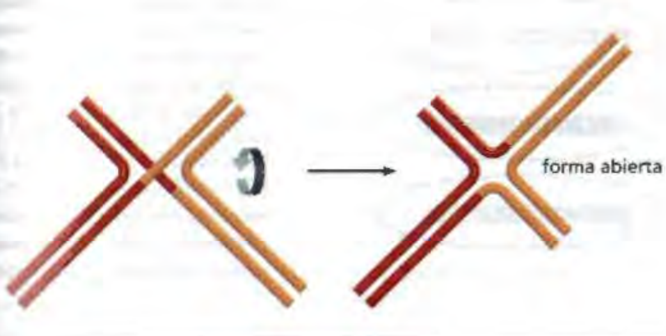


Figura 5–61 Una unión de Holliday. La estructura que se forma inicialmente se dibuja por lo general con dos cadenas (interiores) que se cruzan y dos cadenas (exteriores) que no se cruzan. La isomerización de una unión de Holliday produce una estructura abierta y simétrica <CTAG>. Esta es la forma a la que se unen las proteínas RuvA y RuvB (véase Figura 5–62). La unión de Holliday recibe su nombre en honor al investigador que propuso por primera vez su formación.



Figura 5–62 Doble migración de cadenas en la unión de Holliday catalizada enzimáticamente. En *E. coli*, a la forma abierta de la unión se unen un tetrámero de proteína RuvA (*verde*) y dos hexámeros de proteína RuvB (*gris claro*). La proteína RuvB, la cual se parece a la helicasa hexamérica utilizada en la replicación del DNA (Figura 5–15), utiliza la energía de la hidrólisis del ATP para desplazar rápidamente el punto de entrecruzamiento a lo largo de las hélices de DNA apareadas, extendiendo la región del heterodúplex tal como se muestra. (Imagen cortesía de P. Artymiuk; modificado a partir de S.C. West, *Cell* 94:699-701, 1998. Con la autorización de Elsevier.)

La recombinación meiótica empieza con una rotura programada de la doble cadena

En la meiosis, la recombinación homóloga empieza con un golpe audaz: una proteína especializada (llamada Spo11 en levadura) rompe las dos cadenas de la doble hélice de DNA en uno de los cromosomas que se recombinarán. Como en el caso de una topoisomerasa, la reacción de Spo11 con el DNA deja la proteína unida de forma covalente al DNA roto (véase Figura 5–22). Entonces, una nucleasa especializada procesa con rapidez los extremos unidos a Spo11, quitando la proteína y dejando los extremos 3' protuberantes. En este punto tienen lugar una serie de invasiones y migraciones de cadena que frecuentemente generan un intermediario, que consiste en dos uniones de Holliday muy cercanas, a menudo denominadas unión doble de Holliday (**Figura 5–64**).

Aunque algunas de las proteínas que se utilizan en la reparación de roturas de la doble cadena también participan en la meiosis, éstas son dirigidas por varias proteínas específicas de meiosis de manera que realizan sus funciones de forma algo diferente dando lugar a los diferentes intermediarios de DNA que se forman (comparar Figura 5–59 con Figura 5–64). Otra diferencia importante es que, en la meiosis, la recombinación sucede sobre todo entre cromosomas homólogos paternos y maternos en vez de entre los cromosomas idénticos de un dúplex que se acaban de replicar y que se aparean por una rotura en la doble cadena.

Existen dos maneras de resolver la unión doble de Holliday, que se muestran en la Figura 5–64. En la resolución más sencilla conceptualmente hablando (la que no tiene "entrecruzamiento"), se corta el par original de cadenas entrecruzadas en las dos uniones de Holliday, lo que provoca que las dos hélices originales se separen la una de la otra de forma

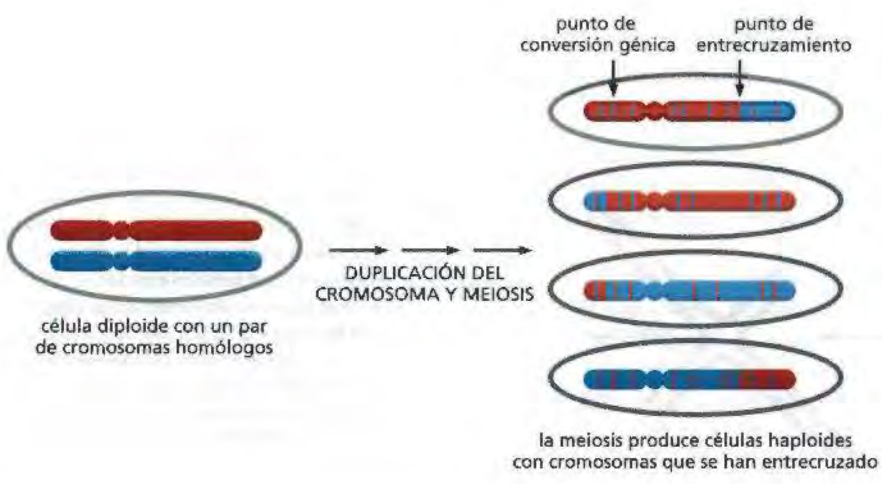


Figura 5–63 Durante la meiosis se produce entrecruzamiento de cromosomas. La meiosis es el proceso mediante el cual una célula diploide da lugar a cuatro células germinales haploides, tal y como se describe detalladamente en el Capítulo 21. La meiosis produce células germinales en las que la información genética paterna y materna (*rojo* y *azul*, respectivamente) ha sido mezclada mediante entrecruzamientos cromosómicos. Además se producen muchas pequeñas regiones de conversión génica, como se indica.

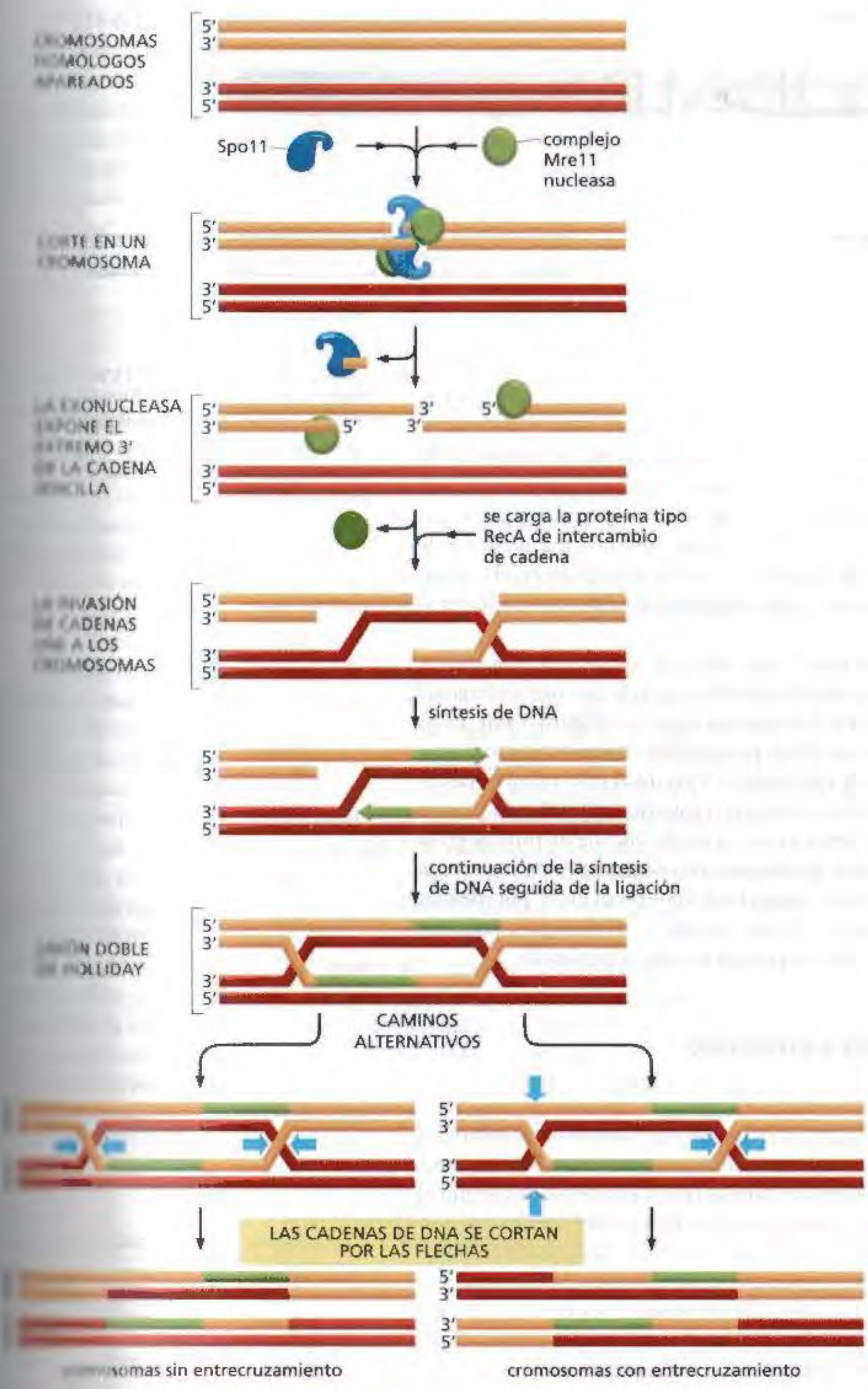


Figura 5–64 La recombinación homóloga en la meiosis genera entrecruzamientos. Cuando la proteína específica de meiosis Spo11 y el complejo Mre11 rompen el dúplex de DNA y procesan los extremos, la recombinación homóloga tiene lugar a través de una unión doble de Holliday. Muchos de los pasos que dan lugar a los entrecruzamientos de los cromosomas en la meiosis, se parecen a los utilizados para reparar las roturas en la doble cadena (Figura 5–59). Sin embargo, en la meiosis, el proceso está estrechamente ligado a otros sucesos meióticos y está dirigido por proteínas, como Spo11, que sólo se produce en células meióticas.

intacta excepto en la región situada entre las dos uniones (véase la Figura 5–64, izquierda; en esa región cada hélice contiene una pequeña región heterodúplex adyacente a la región de homodúplex producida por la síntesis de DNA). Si, por el contrario, la unión doble de Holliday se resuelve de forma opuesta (una cadena queda anclada en el par de cadenas entrecruzadas original y la otra en las cadenas que no se entrecruzan), el resultado final es mucho más profundo. En este tipo de resolución (entrecruzada), las porciones de cada cromosoma en a ambos lados de la unión de Holliday quedan intercambiadas, dando lugar a dos cromosomas que se han entrecruzado (véase la Figura 5–64, derecha).

De todas las roturas de doble cadena mediadas por Spo11, son relativamente pocas las que resultan entrecruzadas. La mayoría (p. ej. un 90% en humanos) se resuelven sin entrecruzamiento. No entendemos muy bien cómo se elige entre una opción y la otra, pero parece ser que sucede al principio del proceso de recombinación, antes de que se formen las

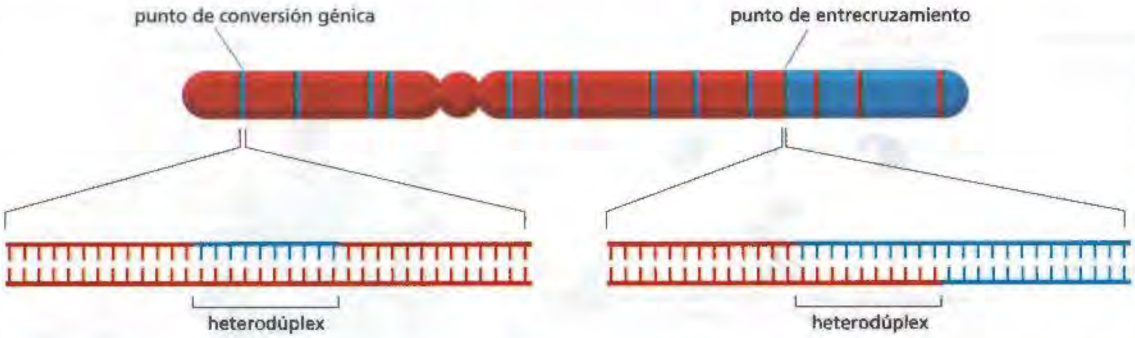


Figura 5–65 Heterodúplex formados durante la meiosis. Un heterodúplex de DNA está presente en los puntos de recombinación que se resuelven con o sin entrecruzamiento.

uniones de Holliday. Los escasos entrecruzamientos que se producen se distribuyen a lo largo de los cromosomas de manera que la presencia de uno de ellos en una posición determinada inhibe el entrecruzamiento en una región vecina. El mecanismo de *control de la regulación del entrecruzamiento*, pese a ser fascinante, todavía no se comprende del todo, pero seguramente asegura la distribución uniforme de los puntos de entrecruzamiento a lo largo de los cromosomas. En muchos organismos, durante cada meiosis ocurren alrededor de dos entrecruzamientos por cromosoma, uno en cada brazo. Tal y como expone en el Capítulo 21, estos entrecruzamientos tienen un papel mecánico importante en la correcta segregación de los cromosomas durante la meiosis.

Tanto si un proceso de recombinación meiótica se resuelve con o sin entrecruzamiento, la maquinaria de recombinación deja una *región de heterodúplex* en la que una cadena del homólogo paterno se aparea con una cadena del homólogo materno (**Figura 5–65**). Estas regiones de heterodúplex pueden tolerar un porcentaje pequeño de errores de apareamiento y a menudo se prolongan miles de pares de nucleótidos. Debido al gran número de recombinaciones que se resuelven sin entrecruzamiento en la meiosis, se producen puntos dispersos en las células germinales en los que secuencias cortas de DNA de un homólogo se han unido al otro homólogo. En todos los casos, señalizan sitios potenciales de *conversión génica*, es decir, sitios en los que los cuatro cromosomas haploides producidos por meiosis contienen tres copias de una secuencia corta de DNA de uno de los homólogos y sólo una copia del otro homólogo (véase Figura 5–63), como explicaremos a continuación.

La recombinación homóloga genera a menudo una conversión génica

Según una ley fundamental de la genética en organismos que se reproducen sexualmente, la contribución genética de cada uno de los padres al hijo es idéntica: se hereda un juego completo de genes nucleares del padre y otro de la madre. Subyacente a esta ley se encuentra el reparto en extremo preciso de los cromosomas entre las células germinales (óvulos y espermatozoides) que tiene lugar durante la meiosis. Así, cuando una célula diploide entra en meiosis produciendo cuatro células germinales haploides (véase Capítulo 21), exactamente la mitad de los genes distribuidos en estas cuatro células deben proceder de la madre (los genes que la célula diploide heredó de la madre) y, la otra mitad, del padre (los genes que la célula diploide heredó del padre). En algunos organismos (p. ej. los hongos), es posible recuperar y analizar cada uno de los cuatro gametos haploides producidos por meiosis a partir de una misma célula. Algunos estudios en estos organismos han mostrado que se pueden encontrar casos poco frecuentes en los que el reparto de los genes transgrede las reglas genéticas estándar. Por ejemplo, a veces la meiosis produce tres copias de la versión materna de un gen y una sola copia del alelo paterno (véase Figura 5–63). Las versiones alternativas de un mismo gen se denominan **alelos**, y la divergencia de su distribución esperada durante la meiosis se conoce como **conversión génica**. Estudios genéticos muestran que normalmente la conversión génica afecta a pequeñas zonas de DNA y que en muchos casos sólo se intercambia una parte de un gen.

En una célula, existen distintas vías que pueden dar lugar a la conversión génica. La primera es la síntesis del DNA que acompaña a los primeros pasos de la recombinación homóloga y que producirá regiones de la doble unión de Holliday en las que están presentes tres copias de la secuencia de uno de los homólogos (véanse las cadenas *verdes* de la parte inferior de la Figura 5–64); estas regiones producirán sitios de conversión génica una vez que la

unión de Holliday se resuelva. Además, si las dos cadenas que forman la región heterodúplex no tienen secuencias idénticas de nucleótidos, se producirán errores de apareamiento. Éstos pueden ser corregidos por el sistema celular de reparación de errores de apareamiento descrito anteriormente (véase Figura 5–20). Sin embargo, cuando se utiliza durante la recombinación, este sistema de corrección de errores no hace distinciones entre las cadenas paterna y materna de manera que elije aleatoriamente la cadena a reparar. Como consecuencia de esta reparación, un alelo se "perderá" y el otro se duplicará (**Figura 5–66**), dando lugar a una "conversión" neta de un alelo en el otro. Así, la conversión génica se puede contemplar como una simple consecuencia del mecanismo de recombinación homóloga y de reparación del DNA.

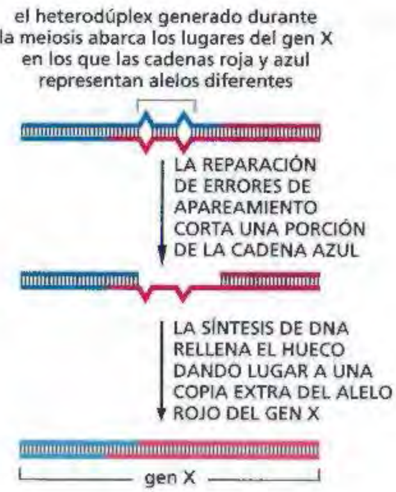


Figura 5–66 Conversión génica causada por la corrección de los errores de apareamiento. En este proceso se forman uniones heterodúplex de DNA en el lugar de la recombinación homóloga entre los cromosomas materno y paterno. Si las secuencias materna y paterna son un poco distintas, la región heterodúplex incluirá algunas bases mal apareadas, que deberán ser corregidas por la maquinaria de corrección de errores de apareamiento (véase Figura 5–20). Esta reparación puede eliminar nucleótidos tanto de la cadena materna como de la paterna. La consecuencia de esta reparación de errores de apareamiento es la conversión génica, detectada como una desviación de la segregación de copias iguales de los alelos materno y paterno que tiene lugar por lo general en la meiosis.

La corrección de errores de apareamiento evita la recombinación promiscua entre dos secuencias de DNA mal apareadas

La recombinación homóloga se basa en que dos cadenas de DNA de secuencia complementaria (o casi complementaria), que inicialmente proceden de dúplex de DNA diferentes, se emparejan. Pero, ¿qué controla el grado de precisión que debe tener el apareamiento? Esto es especialmente importante en los casos de recombinación que llevan a entrecruzamientos. Por ejemplo, el genoma humano contiene varios conjuntos de secuencias de DNA relacionadas y, si estuviese permitido un entrecruzamiento entre todas ellas, tendría consecuencias desastrosas en la célula.

A pesar de que no entendemos por completo cómo las células previenen los entrecruzamientos inapropiados, sabemos que algunos componentes de los propios sistemas de corrección de errores que eliminan los errores de replicación (véase la Figura 5–20) y que son responsables de algunos tipos de conversión génica (véase Figura 5–66), también interrumpen los procesos de recombinación génica entre secuencias de DNA que se emparejan de forma imperfecta. Se cree que el sistema de corrección de errores normalmente reconoce las bases mal apareadas de un intercambio de cadenas inicial y, si se producen malos apareamientos, impide los pasos posteriores (particularmente la migración de las cadenas) necesarios para que se forme el entrecruzamiento. Parece que este mecanismo de corrección de errores de recombinación evita recombinaciones promiscuas que, en caso de prosperar, desestabilizarían el genoma humano (**Figura 5–67**). Aunque de forma controvertida, también se ha propuesto que la comprobación de errores de apareamiento en la recombinación ayuda a preservar la especiación, sobre todo entre las bacterias, mediante el bloqueo del intercambio genético entre especies cercanas. Por ejemplo, los genomas de *E. coli* y *Salmonella typhimurium* tienen el 80% de sus secuencias nucleotídicas idénticas, de manera que este sistema bloquea la recombinación entre sus genomas.

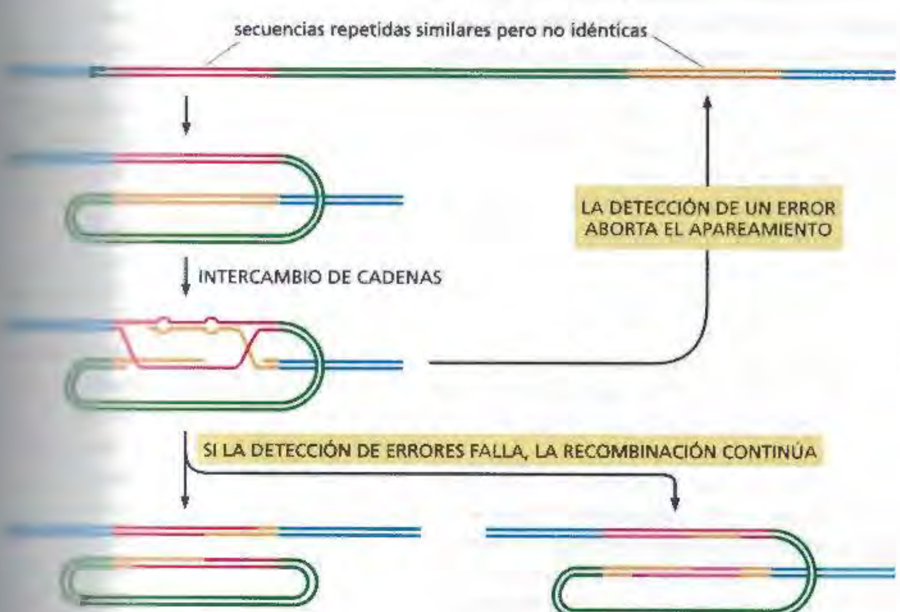


Figura 5–67 Mecanismo que impide que la recombinación general desestabilice un genoma que contiene secuencias repetidas. Los componentes del sistema de corrección de errores descrito en la Figura 5–20 tienen la función adicional de reconocer los apareamientos erróneos y prevenir la recombinación inapropiada. Si se permitiera su progreso, este tipo de recombinación produciría deleciones (*izquierda*) o conversión génica (*derecha*) y se perdería la información de una de las secuencias repetidas originales.

Resumen

La recombinación homóloga (también llamada recombinación general) da lugar a la transferencia de información genética entre dos segmentos dúplex de DNA de secuencia nucleotídica similar. Este proceso es esencial para la reparación sin errores del daño cromosómico en todas las células y también es el responsable del entrecruzamiento de cromosomas que tiene lugar durante la meiosis. Los fenómenos de recombinación están dirigidos por un conjunto especializado de proteínas. A pesar de que pueden ocurrir en cualquier parte de la molécula de DNA, siempre requieren interacciones de apareamiento en regiones extensas entre las cadenas complementarias de los dos dúplex de DNA que interaccionan.

En la meiosis, la recombinación homóloga se inicia con la rotura de la doble cadena llevada a cabo de forma intencionada en cada cromosoma. Estas roturas son transformadas en extremos 3' los cuales, mediante una reacción catalizada por la familia de proteínas RecA, invaden la cadena homóloga en la pareja de dúplex. La migración de cadenas acompañada de la síntesis limitada de DNA conduce a la formación de estructuras de cuatro cadenas conocidas con el nombre de uniones de Holliday. Cada reacción de recombinación termina cuando se resuelven estos intermediarios de la recombinación. El resultado puede ser o bien dos cromosomas que se han entrecruzado (es decir, cromosomas en los que el DNA a cada lado del punto de bifurcación procede de dos homólogos diferentes) o bien dos cromosomas que no se han entrecruzado. En el último caso, los dos cromosomas resultantes son idénticos a los dos homólogos originales, excepto por la cantidad de cambios de secuencia relativamente menores en el punto de recombinación. Con excepción de la meiosis, las reacciones de recombinación homóloga que reparan con precisión las roturas de la doble cadena, casi nunca producen productos de entrecruzamiento.

TRANSPOSICIÓN Y RECOMBINACIÓN CONSERVATIVA ESPECÍFICA DE LUGAR

Se ha explicado que, mediante la recombinación homóloga, la reorganización que ocurre entre segmentos de DNA puede dar lugar a un intercambio de secuencias entre cromosomas. Sin embargo, el orden de los genes por lo general no cambia después de la recombinación homóloga puesto que para que el proceso tenga lugar las secuencias que se recombinan deben ser muy similares. En esta sección, describiremos dos formas muy diferentes de recombinación: la **transposición** (también llamada *recombinación transposicional*) y la **recombinación conservativa específica de lugar** (que no requiere la existencia de regiones de DNA homólogas extensas). Estos dos tipos de recombinaciones pueden alterar el orden de los genes en los cromosomas y causar algunos tipos de mutaciones poco corrientes que añaden nueva información a los genomas.

La transposición y la recombinación conservativa específica de lugar están dedicadas a la movilización de una amplia variedad de segmentos especializados de DNA, llamados en su conjunto *elementos genéticos móviles*, de una posición del genoma a otra. Estos elementos pueden tener tamaños que van desde unos cuantos centenares hasta decenas de miles de pares de nucleótidos y cada uno de ellos lleva normalmente un solo juego de genes. A menudo, uno de esos juegos de genes codifica una enzima especializada que cataliza el desplazamiento sólo de ese elemento, haciendo posible así este tipo de recombinación.

Casi todas las células tienen elementos genéticos móviles (informalmente llamados "genes saltarines"). Como se explicó en el Capítulo 4, a lo largo de la escala de la evolución, han tenido un efecto profundo en el modelado de los genomas modernos. Por ejemplo, aproximadamente la mitad del genoma humano se puede trazar con estos elementos (véase Figura 4–17). Con el tiempo, las mutaciones aleatorias han alterado las secuencias de nucleótidos de estos elementos y, como resultado de ello, sólo unas cuantas de las muchas copias de estos elementos en nuestro DNA todavía son activas y capaces de desplazarse. El resto son fósiles moleculares cuya existencia proporciona notables indicios sobre nuestra propia historia evolutiva.

Los elementos genéticos móviles, a menudo considerados como parásitos moleculares (también denominados "DNA egoísta"), persisten porque la célula no puede deshacerse de ellos; de hecho pueden haber estado a punto de invadir nuestro propio genoma. Sin embargo, los elementos móviles de DNA pueden aportar beneficios a la célula. Por ejemplo, los genes que transportan a veces son ventajosos, como en el caso de la resistencia a antibióticos en las bacterias tratado más adelante. El desplazamiento de estos elementos genéticos móviles

sición produce muchas variantes genéticas de las cuales depende la evolución, porque, además de moverse, a veces también reordenan las secuencias vecinas del genoma huésped. Así, a menudo las mutaciones espontáneas observadas en *Drosophila*, en humanos y en otros organismos se deben al movimiento de estos elementos genéticos móviles. La inmensa mayoría de estas mutaciones será deletérea para el organismo, pero algunas de ellas darán lugar a una mejora adaptativa y tenderán a propagarse por la población. Es casi seguro que gran parte de la variabilidad que muestra la vida a nuestro alrededor procede originalmente del desplazamiento de los elementos genéticos móviles.

En esta sección, introduciremos los elementos genéticos móviles y describiremos el mecanismo que les permite desplazarse por el genoma. Veremos que algunos de estos elementos se mueven mediante mecanismos de transposición y otros lo hacen mediante la recombinación conservativa específica de lugar. Empezaremos con la transposición, ya que se conocen muchos más ejemplos de este tipo de desplazamiento.

Los elementos genéticos móviles se pueden insertar en cualquier secuencia de DNA mediante transposición

Los elementos móviles que se desplazan mediante la transposición se llaman **transposones** o **elementos transponibles**. En la transposición, normalmente una enzima específica codificada por el propio transposón y que normalmente recibe el nombre de *transposasa*, actúa sobre una secuencia específica del DNA presente en cada extremo del transposón y causa su inserción en un nuevo lugar en el DNA diana. Muchos transposones sólo son ligeramente selectivos para elegir su diana, de manera que se pueden insertar en muchos sitios del genoma. En particular, no existe ningún requerimiento general de homología entre los extremos del elemento y el lugar de inserción. La mayoría de transposones se desplazan muy raramente. En las bacterias, en las que es posible medir la frecuencia de forma precisa, los transposones se suelen desplazar una vez cada 10^5 divisiones celulares. En muchos casos, la transposición parece ser un proceso estocástico poco frecuente, aunque a menudo ligado al paso de la horquilla de replicación.

Basándonos en su estructura y en el mecanismo de transposición, los transposones se pueden agrupar en tres grandes clases: *transposones sólo de DNA*, *retrotransposones semejantes a retrovirales* y *retrotransposones no retrovirales*. Trataremos cada clase a continuación. Como referencia, las diferencias entre las tres clases se encuentran resumidas en la Tabla 5-3.

Los transposones sólo de DNA se desplazan mediante mecanismos de corte y unión y mecanismos replicativos

Los transposones sólo de DNA predominan en las bacterias y son responsables en gran medida de la propagación de la resistencia a antibióticos en cepas bacterianas. Cuando en la década de 1950, se inició la administración de algunos antibióticos como la penicilina y la estreptomicina, muchas bacterias que provocaban enfermedades humanas eran susceptibles a ellos. Cincuenta años más tarde, la situación ha cambiado drásticamente, de forma que antibióticos como la penicilina (y sus derivados más modernos) ya no son efectivos en muchas cepas bacterianas modernas, incluyendo las que provocan la gonorrea y la neumonía bacteriana. La diseminación de la resistencia a antibióticos se debe sobre todo a genes que codifican diversas enzimas, que inactivan los antibióticos, situadas en los transposones (Figura 5-68). Aunque estos elementos móviles se pueden transponer sólo en las células que los tienen, también se pueden desplazar de una célula a otra mediante otros mecanismos denominados como la transferencia horizontal de genes (Figura 1-23). Cuando un transposón se ha introducido en una nueva célula, se puede insertar a sí mismo en el genoma y ser fielmente transmitido a su progenie a través del proceso normal de replicación del DNA y de división celular.

Los **transposones sólo de DNA**, llamados así porque sólo existen como DNA durante su desplazamiento, se pueden recolocar desde el sitio dador hasta el receptor ya sea por *transposición de cortar y pegar* o por *transposición replicativa*. Se describirá en primer lugar el mecanismo de cortar y pegar porque conceptualmente es más sencillo. El proceso empieza cuando cada una de las secuencias cortas especiales de DNA, que marcan los dos extremos del elemento, se une a la transposasa. Las dos moléculas de transposasa se juntan y forman

Tabla 5–3 Las tres clases principales de elementos transponibles

DESCRIPCIÓN DE LA CLASE Y ESTRUCTURA	ENZIMAS ESPECIALIZADAS NECESARIAS PARA EL DESPLAZAMIENTO	FORMA DE MOVIMIENTO	EJEMPLOS
Transposones de DNA			
 repeticiones invertidas cortas en cada extremo	transposasa	se desplaza como DNA, mediante "cortar y pegar" o después de una replicación	Elemento P (*Drosophila*) Ac-Ds (maíz) Tn3 y Tn10 (*E. coli*) Tam3 (boca de dragón)
Retrotransposones retrovirales			
 repeticiones terminales largas (LTR) directamente en los extremos	transcriptasa inversa y integrasa	se desplaza en forma de intermediario de RNA producido por el promotor en LTR	Copia (*Drosophila*) Ty1 (levadura) THE1 (humano) Bs1 (maíz)
Retrotransposones no retrovirales			
 Poli A en el extremo 3' del transcrito de RNA; el extremo 5' por lo general está truncado	transcriptasa inversa y endonucleasa	se desplaza en forma de intermediario de RNA que normalmente es producido por un promotor vecino	Elemento F (*Drosophila*) L1 (humano) Cin4 (maíz)

Estos elementos tienen una longitud de entre 1000 y unos 12.000 pares de nucleótidos; cada familia contiene muchos miembros, pero aquí solamente se muestran algunos de ellos. Además de los elementos transponibles, existen ciertos virus que pueden desplazarse dentro y fuera de los cromosomas de las células huésped. Estos virus están relacionados con las dos primeras clases de transposones.

un "transposoma" multimérico que produce un lazo de DNA, yuxtaponiendo los dos extremos del elemento (**Figura 5–69**). Entonces, la transposasa introduce un corte en la base del lazo y quita por completo el elemento del cromosoma original, formando un intermediario central en el proceso de transposición (**Figura 5–70**). Para completar el desplazamiento del DNA, la transposasa cataliza un ataque directo de los dos extremos de DNA del elemento sobre una molécula de DNA diana; este proceso rompe dos enlaces fosfodiéster en dicha molécula y genera dos enlaces nuevos a medida que va uniendo el elemento al DNA diana. Como esta reacción de unión de DNA empieza y acaba con el mismo número de enlaces fosfodiéster, puede suceder sin ninguna entrada adicional de energía. En el próximo capítulo veremos que este mismo tipo de reorganización de enlaces fosfodiéster (llamada *transesterificación*) subyace a otro proceso fundamental de la biología molecular: la maduración del RNA por corte y empalme.

Debido a que los cortes en las dos cadenas diana de DNA no están alineados (*puntas de flecha rojas* en la Figura 5–69), la molécula de DNA producida inicialmente tiene dos pequeños huecos de cadena sencilla, uno en cada extremo del transposón insertado. Una DNA polimerasa y una DNA ligasa de la célula huésped rellenan, sellan estos huecos y completan el proceso de recombinación. Esto produce una duplicación corta de la secuencia de DNA diana en el lugar de inserción; estas secuencias repetidas flanqueantes, cuya longitud es diferente para transposones diferentes, actúan como registro del proceso previo de recombinación transcripcional.

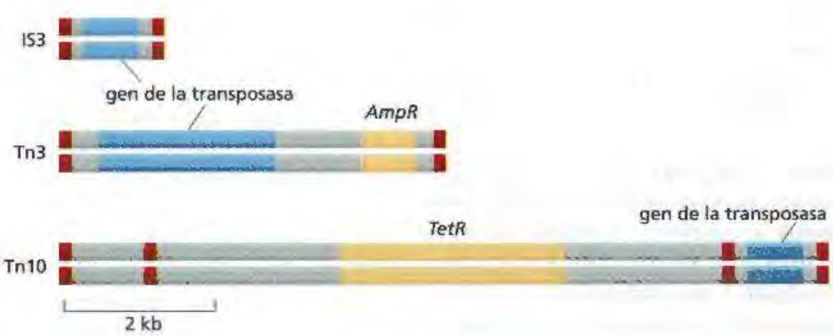


Figura 5–68 Tres de los muchos tipos de transposones de DNA que se pueden encontrar en bacterias. Cada uno de estos elementos móviles de DNA contiene un gen que codifica una *transposasa*, una enzima que dirige al menos algunas de las reacciones de corte y unión del DNA necesarias para que el elemento se desplace. Además, cada transposón también lleva consigo unas secuencias cortas de DNA (indicadas en *rojo*) que solamente son reconocidas por la transposasa que codifica el elemento y que son necesarias para su desplazamiento. Asimismo, dos de los tres elementos móviles que se muestran llevan genes que codifican enzimas que inactivan los antibióticos ampicilina (*AmpR*) y tetraciclina (*TetR*). Parece que el elemento transponible Tn10, que se muestra en el diagrama inferior, ha evolucionado a partir de su inserción al azar de dos elementos móviles más cortos en cada extremo del gen de resistencia a tetraciclina; el uso tan amplio de la tetraciclina como antibiótico ha seleccionado la diseminación de este transposón entre poblaciones de bacterias.

Cuando se separa un transposón de DNA de su localización original, deja tras de sí un "agujero" en el cromosoma. Esta lesión puede ser reparada completamente mediante la reparación por recombinación homóloga de roturas en la doble hélice (véase Figura 5–59), con la condición de que el cromosoma que se acaba de replicar y la copia idéntica de la secuencia dañada del huésped estén asequibles. De forma alternativa, en los organismos diploides el cromosoma dañado se puede reparar por recombinación utilizando el cromosoma homólogo. En este caso, el transposón no será restaurado, pero en el punto de reparación se puede producir pérdida de la heterocigosidad. Como tercera posibilidad, una reacción de unión de extremos no homólogos puede sellar la rotura. En este caso, a menudo la secuencia de DNA que originalmente flanqueaba al transposón queda alterada y se produce una mutación en el lugar del cromosoma donde se encontraba el transposón (véase Figura 5–52).

Hay que destacar que este mismo mecanismo, que se utiliza para quitar los transposones de cortar y pegar el DNA, también actúa en el desarrollo del sistema inmune de los vertebrados, catalizando las reorganizaciones del DNA que producen la variabilidad de los anticuerpos y de los receptores de las células T. Conocido como *recombinación V(D)J*, este proceso será tratado en el Capítulo 25. La recombinación V(D)J, observada sólo en los vertebrados, es una novedad evolutiva relativamente reciente, pero parece que ha evolucionado a partir de los transposones de corte y unión, mucho más antiguos.

Algunos transposones de DNA se desplazan utilizando el mecanismo llamado *transposición replicativa*. En este caso, el DNA del transposón es replicado durante la transposición: una copia permanece en el sitio original y la otra se inserta en una nueva posición del cromosoma. Este mecanismo, aunque es más complejo, está muy relacionado con el mecanismo de "cortar y pegar" que hemos descrito. De hecho, algunos transposones se desplazan usando uno u otro mecanismo.

Algunos virus utilizan mecanismos de transposición para desplazarse a cromosomas de la célula huésped

Ciertos virus pueden considerarse como elementos genéticos móviles, ya que para integrar su genoma en el de su célula huésped utilizan mecanismos de transposición. Sin embargo, a diferencia de los transposones, estos virus codifican proteínas para empaquetar su información genética en partículas virales que pueden infectar otras células. Muchos de los virus que se insertan en cromosomas de la célula huésped lo hacen utilizando uno de los dos primeros mecanismos indicados en la Tabla 5–3. De hecho, la mayor parte de lo que conocemos de estos mecanismos se ha obtenido del estudio de los virus que los utilizan.

Un virus que infecta una bacteria se denomina **bacteriófago**. El *bacteriófago Mu* no solamente utiliza la transposición basada en DNA para integrar su genoma al cromosoma de la célula huésped, sino que también utiliza procesos de transposición replicativa para la

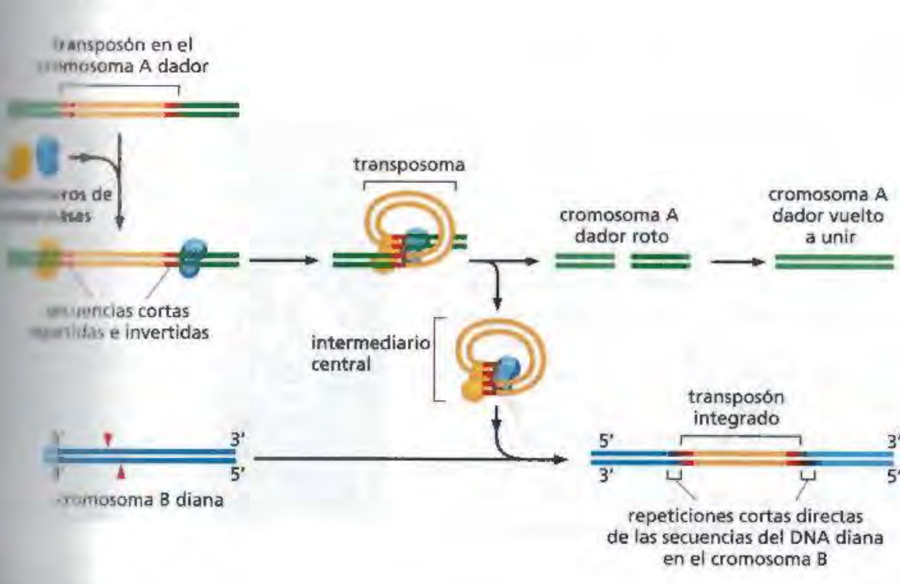


Figura 5–69 Transposición mediante el procedimiento de "cortar y pegar". Los transposones de DNA pueden reconocerse en los cromosomas por las "secuencias de DNA invertidas repetidas" (*rojo*) presentes en sus extremos. Estas secuencias pueden llegar a tener tan sólo 20 nucleótidos, es todo lo que necesita el DNA que se encuentra entre ellos para transponerse mediante la transposasa particular asociada con el elemento. El desplazamiento de corte y unión de un elemento transponible de DNA desde un sitio del cromosoma a otro empieza cuando la transposasa une las dos secuencias de DNA invertidas, formando un lazo de DNA. La inserción en el cromosoma diana, catalizada por la transposasa, se produce en un lugar al azar mediante la formación de roturas escalonadas en dicho cromosoma diana (*puntas de flecha rojas*). Después de la transposición, los huecos en la cadena sencilla generados por la rotura escalonada, se reparan con una DNA polimerasa y una ligasa (*púrpura*). Como resultado de ello, el lugar de inserción queda marcado por una repetición directa de la secuencia de DNA diana, tal como se indica. A pesar de que la rotura en el cromosoma dador (*verde*) se repara, a menudo este proceso altera la secuencia de DNA, dando lugar a una mutación en el lugar original del elemento transponible escindido (no mostrada).

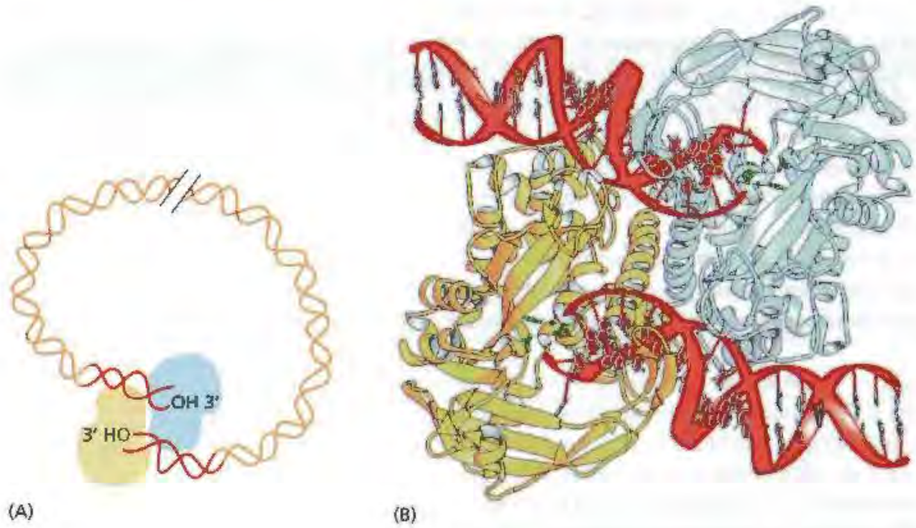


Figura 5–70 Estructura del intermediario central formado por una transposasa que corta y pega. (A) Esquema de la estructura completa. (B) Estructura detallada de una transposasa que abraza los dos extremos de DNA; los grupos 3'-OH están listos para actuar sobre un cromosoma diana. Uno de los dominios de la transposasa reconoce la secuencia de DNA en el extremo del transposón mientras que otro dominio diferente lleva a cabo el proceso de rotura y ensamblaje (B, a partir de D.R. Davies et al., *Science* 289:77-85, 2000. Con la autorización de AAAS.)

replicación de su genoma. La transposición también desempeña un papel clave en el ciclo vital de muchos otros virus. Los más destacables son los **retrovirus**, entre los cuales se encuentra el virus humano del sida o virus HIV. Fuera de la célula, los retrovirus están formados por un genoma de cadena sencilla de RNA encerrado en una cápside de proteína junto con una enzima codificada por el virus denominada **transcriptasa inversa**. Durante el proceso de infección, el RNA vírico entra en la célula y con su información se sintetiza una molécula de DNA de doble cadena precisamente mediante la acción de esta enzima, que es capaz de polimerizar DNA a partir de un patrón tanto de RNA como de DNA (**Figura 5–71** y **Figura 5–72**). El término *retrovirus* hace referencia a la habilidad de estos virus para revertir el flujo habitual de la información genética, que normalmente va del DNA al RNA (véase Figura 1–5).

Cuando la transcriptasa inversa ha producido la molécula de doble cadena de DNA, unas secuencias específicas cercanas a los dos extremos de la doble cadena se unen mediante la acción de una transposasa llamada *integrasa*, codificada por el virus. Esta integrasa genera extremos 3'-OH activos en el DNA vírico, que pueden atacar de forma directa una molécula de DNA diana mediante un mecanismo similar al de corte y pega utilizado por los transposones de DNA (**Figura 5–73**). De hecho, análisis detallados de la estructura tridimensional de las transposasas bacterianas y la integrasa HIV han revelado similitudes muy remarcables en estas enzimas, a pesar de que sus secuencias de aminoácidos han divergido considerablemente.

Los retrotransposones retrovirales se parecen a los retrovirus, pero no tienen proteína de cubierta

Existe una gran familia de transposones llamados **retrotransposones retrovirales** (véase Tabla 5–3) que son capaces de desplazarse por sí mismos dentro y fuera de los cromosomas, mediante un mecanismo idéntico al que utilizan los retrovirus. Estos elementos están presentes en organismos tan distintos como las levaduras, las moscas y los mamíferos. Aunque estos retrotransposones, a diferencia de los virus, no tienen la habilidad intrínseca de abandonar la célula residente, sí que pasan a todas las células descendientes mediante los procesos normales de replicación del DNA y división celular. La primera etapa de su transposición es la transcripción de todo el transposón, produciendo una copia de RNA del elemento que suele tener una longitud de varios miles de nucleótidos. Este transcrito, que la célula huésped traduce como un RNA mensajero, codifica una enzima transcriptasa inversa. Esta enzima hace una copia de la molécula de RNA a DNA de doble cadena a través de un intermediario híbrido RNA/DNA que imita los primeros estadios del proceso de infección por un retrovirus (véase Figura 5–71). La analogía continúa, ya que la molécula lineal de DNA de doble cadena se integra al azar en el cromosoma mediante una enzima integrasa también codificada por el elemento (véase la Figura 5–73).

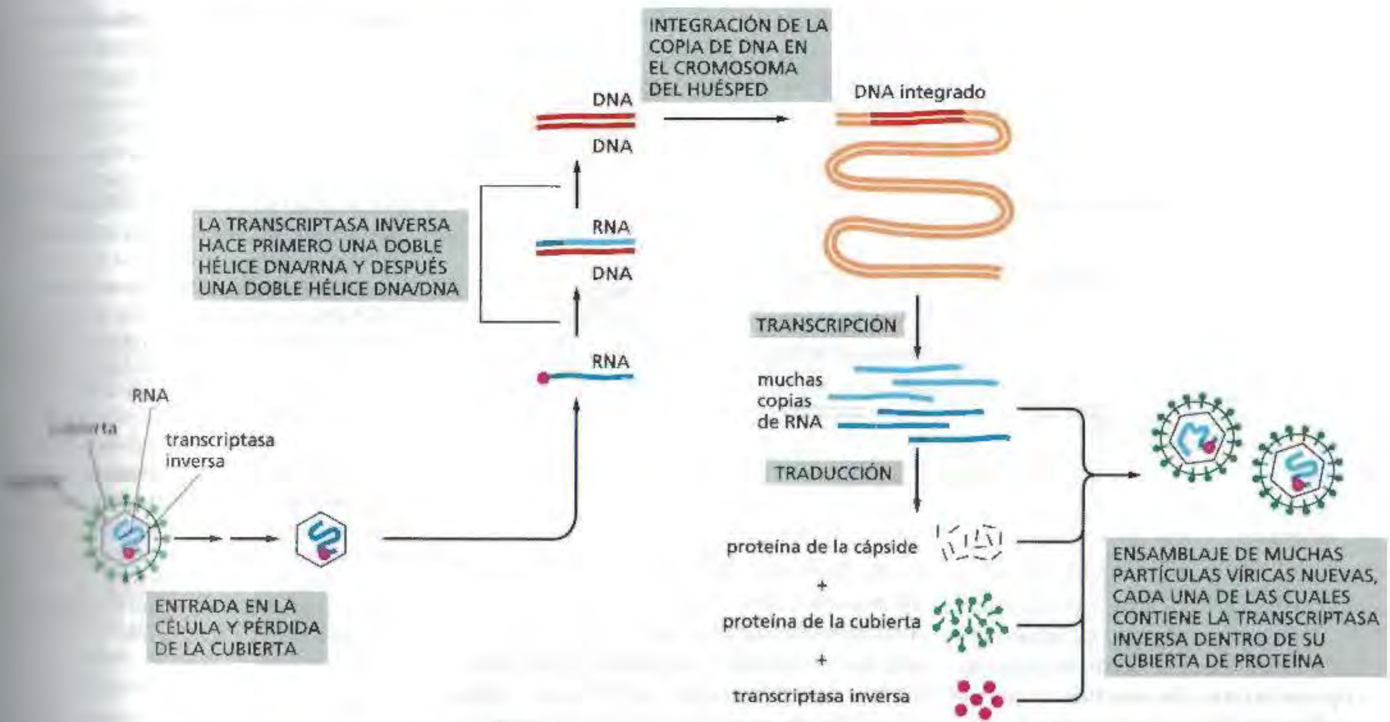


Figura 5–71 **Ciclo "vital" de un retrovirus.** El genoma del retrovirus está formado por una molécula de RNA de unos 8500 nucleótidos; normalmente, en cada partícula vírica están empaquetadas dos de estas moléculas. La enzima transcriptasa inversa hace primero una copia de DNA de la molécula de RNA vírica y después sintetiza una segunda cadena de DNA, con lo cual se genera una copia de DNA de dos cadenas del genoma de RNA. La integración de este DNA de doble hélice en el cromosoma huésped está catalizada por una enzima integrasa codificada por el virus (véase Figura 5–73). Esta integración es necesaria para la síntesis de las nuevas moléculas de RNA vírico mediante la RNA polimerasa de la célula huésped, que es la enzima que transcribe el DNA a RNA (véase el Capítulo 6).

Una gran proporción del genoma humano está compuesto de retrotransposones no retrovirales

Una fracción significativa de muchos cromosomas de los vertebrados está constituida por secuencias de DNA repetitivas. En los cromosomas humanos estas repeticiones son mayoritariamente versiones mutadas y truncadas de **retrotransposones no retrovirales**, el tercer gran tipo de transposones (véase Tabla 5–3). A pesar de que muchos de estos transposones son inactivos, unos pocos aún mantienen la capacidad de desplazarse. Se han identificado los desplazamientos relativamente recientes del llamado *elemento L1* (algunas veces también llamado LINE: ***long interspersed nuclear element***), algunos de los cuales dan lugar a enferme-

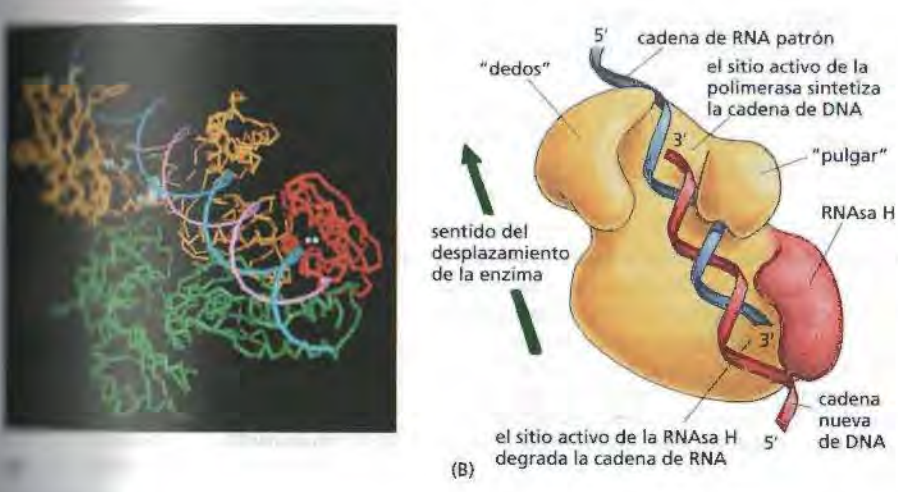


Figura 5–72 **Transcriptasa inversa.** (A) Estructura tridimensional de la enzima del virus HIV (virus humano del sida) determinada por cristalografía de rayos X. (B) Modelo que muestra la actividad de la enzima sobre un RNA patrón. Nótese que el dominio de la polimerasa (*amarillo* en B) tiene un dominio (*rojo*) RNAsa H (H de "híbrido") unido covalentemente que degrada la cadena de RNA de la hélice de RNA/DNA. Esta actividad ayuda a la polimerasa a convertir la hélice híbrida inicial en una doble hélice de DNA. (A, cortesía de Tom Steitz; B, adaptado a partir de L.A. Kohlstaedt et al., *Science* 256: 1783-1790, 1992. Con la autorización de AAAS.)

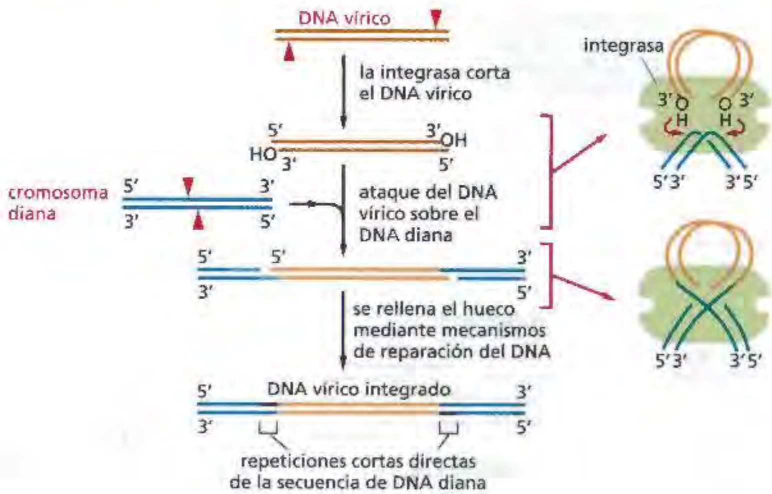


Figura 5–73 Transposición mediante un retrovirus (como el HIV) o mediante un retrotransposón no retroviral. El proceso empieza con la producción de una molécula de DNA de doble cadena (*naranja*) por la retrotranscriptasa inversa (véase Figura 5–71). En una etapa inicial, la enzima integrasa forma un lazo de DNA y corta una cadena a cada extremo de la secuencia de DNA vírica, exponiendo así los nuevos grupos 3'-OH. A continuación, cada uno de estos extremos 3'-OH ataca un enlace fosfodiéster en una posición al azar de las cadenas opuestas en el cromosoma diana (*puntas de flecha rojas* sobre DNA de *color azul*). De este modo, la secuencia de DNA vírica es insertada en el cromosoma diana, dejando unos pequeños huecos a cada lado que son rellenados mediante los procesos de reparación de DNA. Debido a que se rellenan los huecos, este mecanismo (como la transposición por corte y unión) deja repeticiones cortas de la secuencia de DNA diana (*negro*) a cada lado del segmento de DNA integrado.

dades humanas; por ejemplo, la inserción de *L1* en el gen que codifica el Factor VIII, proteína de coagulación de la sangre, produce un tipo de hemofilia (véase la Figura 6–25).

Los *retrotransposones no retrovirales* se encuentran en muchos organismos y se desplazan a través de diferentes mecanismos que requieren un complejo de endonucleasa y transcriptasa inversa. En este mecanismo, el RNA y la transcriptasa inversa tienen un papel mucho más directo en el proceso de la recombinación que en el caso de los retrotransposones de tipo retroviral descritos anteriormente, tal como se ilustra en la **Figura 5–74**.

El estudio de la secuencia del genoma humano ha desvelado que la mayoría de los retrotransposones no retrovirales –por ejemplo, la gran cantidad de copias del elemento *Alu*, un miembro de la familia SINE (*short interspersed nuclear element*) –han perdido los genes de la endonucleasa o de la retrotranscriptasa inversa. Aun así, han conseguido amplificarse con éxito hasta convertirse en el constituyente más importante del genoma humano, probablemente utilizando enzimas codificadas por otros transposones.

Parece que los elementos *L1* y *Alu* se han multiplicado en el genoma humano de forma bastante reciente (**Figura 5–75**), ya que secuencias muy parecidas a *L1* y *Alu* de ratón tienen un emplazamiento muy distinto en los cromosomas respecto a los cromosomas humanos (véase Figura 4–80). Junto con los LINE y los SINE, estos transposones constituyen alrededor del 40% del genoma humano (véase Figura 4–17).

En distintos organismos predominan distintos elementos transponibles

Hemos descrito distintos tipos de elementos transponibles: (1) transposones de DNA, cuyo desplazamiento se basa en cortes y uniones del DNA; (2) retrotransposones retrovirales, que también se desplazan mediante procesos de corte y unión de DNA, pero en los que el RNA tiene un papel clave como patrón generando el sustrato de la recombinación del DNA, y (3) retrotransposones no retrovirales, en los que se necesita una copia de RNA del elemento para que pueda integrarse en el DNA diana, el cual actúa directamente como patrón para la transcripción inversa a DNA utilizando el propio DNA diana como cebador.

Curiosamente, en distintos organismos predominan distintos tipos de transposones. Por ejemplo, la inmensa mayoría de los transposones bacterianos son transposones de DNA, mientras que sólo unos cuantos de ellos están relacionados con retrotransposones no retro-

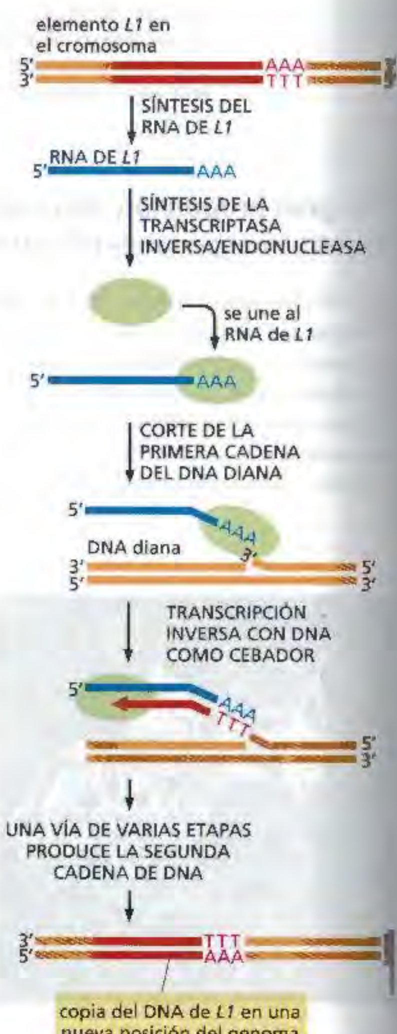


Figura 5–74 Transposición mediada por un retrotransposón no retroviral. El elemento *L1* (*rojo*) inicia la transposición cuando una endonucleasa unida a la transcriptasa inversa de *L1* (*verde*) y al RNA de *L1* (*azul*) hace una muesca en el DNA diana en el punto donde tendrá lugar la inserción. Este corte libera un extremo 3'-OH del DNA diana, que es utilizado como cebador en la etapa de transcripción inversa que se muestra. Este hecho genera una copia de DNA de cadena sencilla del elemento que está directamente unido al DNA diana. En las reacciones siguientes, se sigue procesando la copia de DNA de doble cadena, dando lugar a una nueva copia de DNA de doble cadena del elemento *L1* que se ha insertado en el lugar de la muesca inicial.

virales. En levaduras, los elementos móviles mayoritarios observados son retrotransposones no retrovirales. En *Drosophila* se encuentran los tres tipos de transposones. Por último, en humanos, también se encuentran los tres tipos de transposones, pero su historia evolutiva es muy distinta, tal como se describirá a continuación.

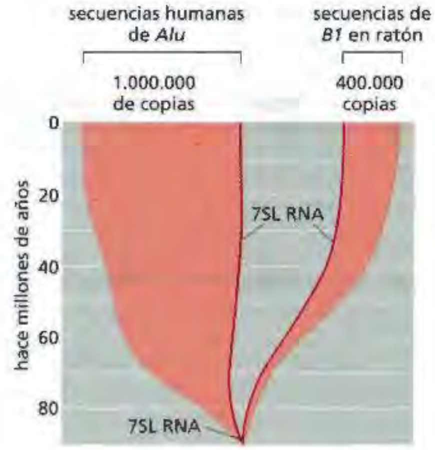


Figura 5–75 Expansión de las secuencias *Alu* y *B1* encontradas en los genomas de humano y de ratón, respectivamente. Se cree que estas dos secuencias de DNA transponibles han evolucionado a partir del gen 7SL RNA que codifica el RNA de SRP (véase Figura 12–39). A partir de sus posiciones en ambos genomas y de la similitud de secuencia de estos elementos altamente repetidos, parece que la principal expansión en cuanto a número de copias ha ocurrido de forma independiente en ratones y en humanos (véase Figura 4–80). (Adaptado a partir de P.L. Deininger y G.R. Daniels, *Trends Genet.* 2:76-80, 1986. Con la autorización de Elsevier; e International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* 409:860-921, 2001. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

La secuenciación del genoma permite conocer aproximadamente cuándo se han desplazado los elementos transponibles

La secuencia de nucleótidos del genoma humano ofrece un "registro fósil" muy rico de la actividad de los transposones a lo largo del tiempo de evolución que abarca. Comparando cuidadosamente las secuencias de nucleótidos de los aproximadamente 3 millones de restos de elementos transponibles presentes en el genoma humano, ha sido posible reconstruir de forma aproximada los desplazamientos de los transposones en los genomas de nuestros ancestros desde hace varios centenares de millones de años. Por ejemplo, parece que los transposones de DNA fueron muy activos antes de la separación de los humanos y los simios del viejo mundo (hace 25-35 millones de años); pero debido a que gradualmente acumularon mutaciones inactivas, desde entonces están latentes en el linaje humano. Del mismo modo, a pesar de que nuestro genoma está lleno de reliquias de transposones retrovirales, ninguno de ellos parece estar activo hoy en día. Se cree que en el genoma humano los transposones retrovirales de una sola familia han sido activos desde la divergencia de los humanos y los chimpancés, aproximadamente hace 6 millones de años. Los retrotransposones no retrovirales también son antiguos, pero al contrario de los otros dos tipos, algunos de ellos todavía se desplazan por nuestro genoma, como ya mencionamos. Por ejemplo, se estima que el desplazamiento *de novo* del elemento *Alu* sucede una vez cada 100-200 nacimientos humanos. El desplazamiento de los retrotransposones no retrovirales es el responsables de una pequeña pero significativa fracción de nuevas mutaciones humanas, quizás 2 de cada mil mutaciones.

La situación en los ratones es significativamente distinta. A pesar de que los genomas de ratón y de humanos contienen, a grandes rasgos, la misma frecuencia de los tres tipos de transposones, los dos tipos de retrotransposones todavía son activos en el genoma de ratón, y son responsables de cerca del 10% de las nuevas mutaciones.

Aunque estamos empezando a comprender la forma en que el desplazamiento de los transposones ha modelado los genomas actuales de los mamíferos, se ha propuesto la implicación de los periodos de actividad de los transposones en los procesos de especiación durante la radiación de los linajes de mamíferos a partir de un ancestro común, un proceso que empezó aproximadamente hace 170 millones de años. En este punto, podemos preguntarnos cuántas de nuestras cualidades humanas características surgieron de la actividad pasada de la gran cantidad de elementos genéticos móviles cuyos restos todavía se encuentran dispersos a lo largo de nuestros cromosomas.

La recombinación conservativa específica de lugar puede reordenar el DNA de forma reversible

Un mecanismo distinto de recombinación, llamado *recombinación conservativa específica de lugar*, media la reordenación de otros tipos de elementos móviles de DNA. En esta vía, se produce un proceso de corte y unión en dos lugares especiales, uno en cada molécula de DNA que participa. Según la posición y la orientación relativa de los dos lugares de recombinación se producirá la integración, la escisión o la inversión del DNA (**Figura 5–76**). La recombinación conservativa específica de lugar la llevan a cabo enzimas especializadas que rompen y unen dos dobles hélices de DNA por secuencias específicas en cada molécula de DNA. El mismo sistema enzimático que une las dos moléculas de DNA también puede, a menudo, separarlas, restaurando de forma precisa la secuencia original de las moléculas de DNA (véase Figura 5–76A).

Algunas características distinguen la recombinación conservativa específica de lugar de la transposición. La primera es que la recombinación conservativa específica de lugar necesita secuencias especializadas de DNA en ambos DNA, el receptor y el dador (de ahí que sea específica de lugar). Estas secuencias contienen lugares de reconocimiento para la recombinasa particular que catalizará la reordenación. Por el contrario, la transposición sólo requiere que el transposón tenga una secuencia especializada. La segunda es que los mecanismos

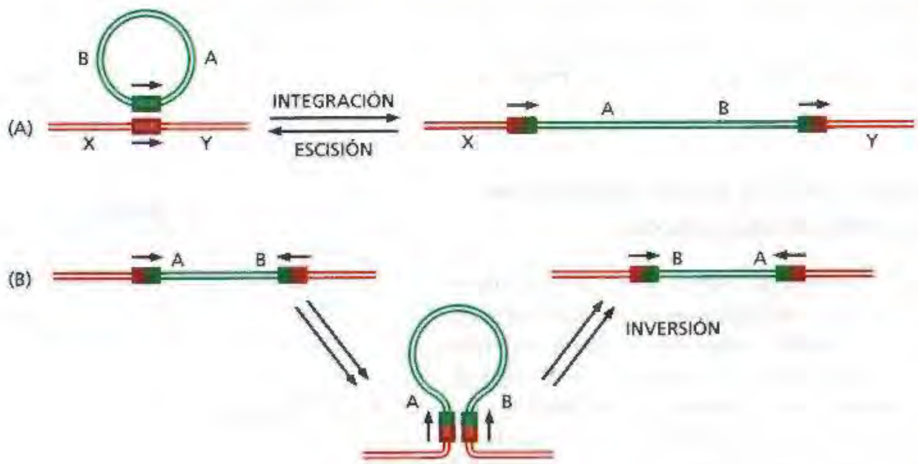


Figura 5–76 **Dos tipos de reordenamientos del DNA producidos por recombinación conservativa específica de lugar.** La única diferencia entre las reacciones en (A) y (B) es la orientación relativa de los dos pequeños lugares del DNA (marcados con *flechas*) en donde tiene lugar la recombinación específica de lugar. (A) Una molécula de DNA circular puede ser incorporada a una segunda molécula de DNA, mediante una reacción de integración. Mediante la reacción inversa (escisión), puede salir y volver a formar el DNA circular original. Muchos virus de bacterias se desplazan dentro y fuera de los cromosomas de sus huéspedes de este modo (véase Figura 5–77). (B) La recombinación conservativa específica de lugar también puede invertir un segmento específico de DNA en un cromosoma. Un ejemplo bien estudiado de inversión de DNA mediante recombinación específica de lugar tiene lugar en la bacteria *Salmonella typhimurium*, un organismo que es la causa principal de intoxicación por alimentos en humanos; la inversión del segmento de DNA cambia el tipo de flagelo que produce la bacteria (véase Figura 7–64).

de reacción son fundamentalmente diferentes. Las recombinasas que catalizan la recombinación conservativa específica de lugar se parecen a las topoisomerasas en que forman uniones covalentes de gran energía y transitorias con el DNA y utilizan esa energía para completar la reordenación del DNA. Así, todos los enlaces fosfato que se rompen durante la recombinación, al final se restauran (de ahí que se llame conservativa). La transposición, en cambio, utiliza la reacción de transesterificación que no se da por la unión covalente de una proteína a un intermediario de DNA. Este proceso deja huecos en el DNA que deben ser reparados por una DNA polimerasa y por una ligasa, las cuales necesitarán una entrada de energía en forma de hidrólisis de nucleótidos.

La recombinación conservativa específica de lugar fue descubierta en el bacteriófago λ

El primer elemento de DNA móvil, en el que se estudió en detalle su bioquímica, fue un virus bacteriano: el *bacteriófago lambda*. Cuando este virus penetra en una célula, dirige la síntesis de una recombinasa codificada por él mismo, la *integrasa lambda*. Esta enzima media la unión covalente del DNA vírico con el cromosoma bacteriano, lo que provoca que el virus entre a formar parte de este cromosoma y así se replique automáticamente como parte del DNA del huésped. El proceso de recombinación empieza cuando varias moléculas de la proteína integrasa se unen fuertemente a una secuencia específica de DNA en el cromosoma circular del bacteriófago, junto con varias proteínas del huésped. Entonces, este complejo DNA-proteína puede unirse a un sitio de unión de la secuencia de DNA del cromosoma bacteriano, permitiendo el encuentro entre los cromosomas de la bacteria y del bacteriófago. A continuación, la integrasa cataliza el proceso de corte y unión necesario que da lugar a la recombinación. En el punto de intercambio se forma una diminuta unión heterodúplex, ya que entre las dos secuencias unidas existe una región corta de secuencia homóloga (**Figura 5–77**).

El mismo tipo de mecanismo de recombinación específica de lugar permite que el DNA del bacteriófago lambda salga de su lugar de integración en el cromosoma de *E. coli* en respuesta a señales específicas y se multiplique rápidamente dentro de la célula bacteriana (**Figura 5–78**). La escisión está catalizada por un complejo formado por la enzima integrasa y por factores del huésped junto con una segunda proteína del bacteriófago, la excisionasa, que está producida por el virus solamente cuando su célula huésped está estresada. En este caso, al bacteriófago le interesa abandonar la célula huésped y multiplicarse de nuevo como partícula vírica.

La recombinación conservativa específica de lugar se utiliza para activar o desactivar genes

Cuando los lugares especiales reconocidos en la recombinación conservativa específica de lugar están orientados de forma inversa, la secuencia de DNA entre ellos es preferentemente invertida en lugar de escindida (véase Figura 5–76). Muchas bacterias utilizan este tipo de inversión de la secuencia de DNA para controlar la expresión génica de genes particulares,

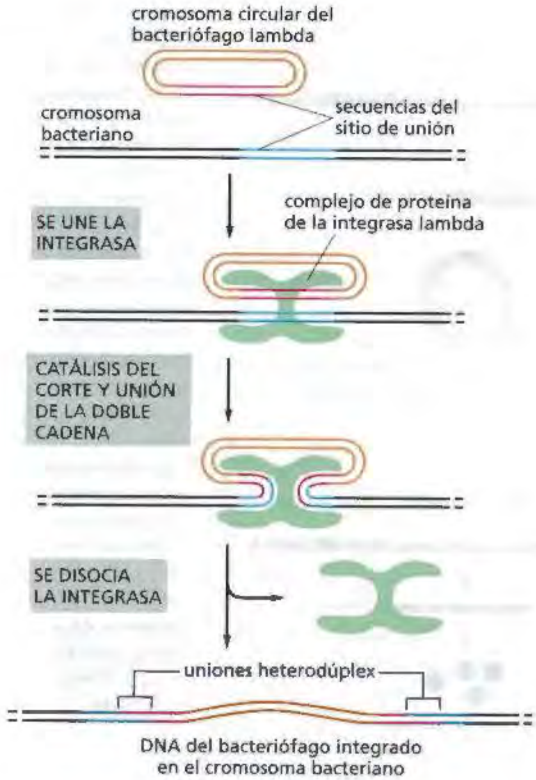


Figura 5–77 Inserción del cromosoma de DNA circular del bacteriófago lambda en el cromosoma bacteriano. En este ejemplo de recombinación conservativa específica de lugar, la enzima integrasa lambda se une a un sitio de unión específico de la secuencia de DNA en cada cromosoma, donde produce cortes que marcan una secuencia corta de DNA homólogo. Entonces la integrasa cambia la pareja de las cadenas, las une y forma una unión heterodúplex que tiene una longitud de siete pares de nucleótidos. Son necesarias un total de cuatro reacciones de corte y unión. Para cada una de ellas, la energía del enlace fosfodiéster que se rompe se almacena transitoriamente en una unión covalente entre el DNA y la enzima, de manera que el sellado de la cadena de DNA tiene lugar sin gasto de ATP ni DNA ligasa.

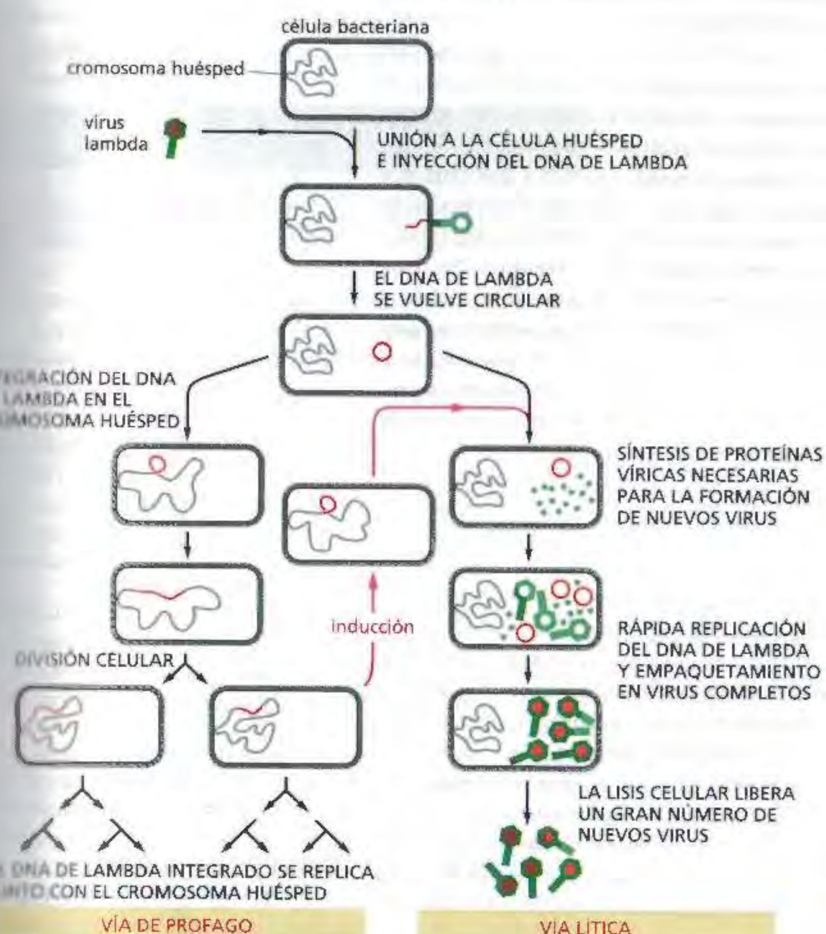


Figura 5–78 Ciclo vital del bacteriófago lambda. El genoma de DNA de doble cadena de lambda contiene 50.000 pares de nucleótidos y codifica unas 50-60 proteínas diferentes. Cuando el DNA de lambda entra en la célula, sus dos extremos se unen formando una molécula de DNA circular. El bacteriófago puede multiplicarse en *E. coli* por una vía lítica, que destruye la célula, o bien puede entrar en un estado latente de profago. Si se produce algún daño sobre una célula que lleva un profago de lambda, se induce a que éste salga de su cromosoma huésped y active su crecimiento lítico (*flechas rojas*). Tanto la entrada del DNA de lambda como su salida del cromosoma bacteriano se llevan a cabo mediante el proceso de recombinación conservativa específica de lugar catalizada por la enzima integrasa lambda (véase Figura 5–77).

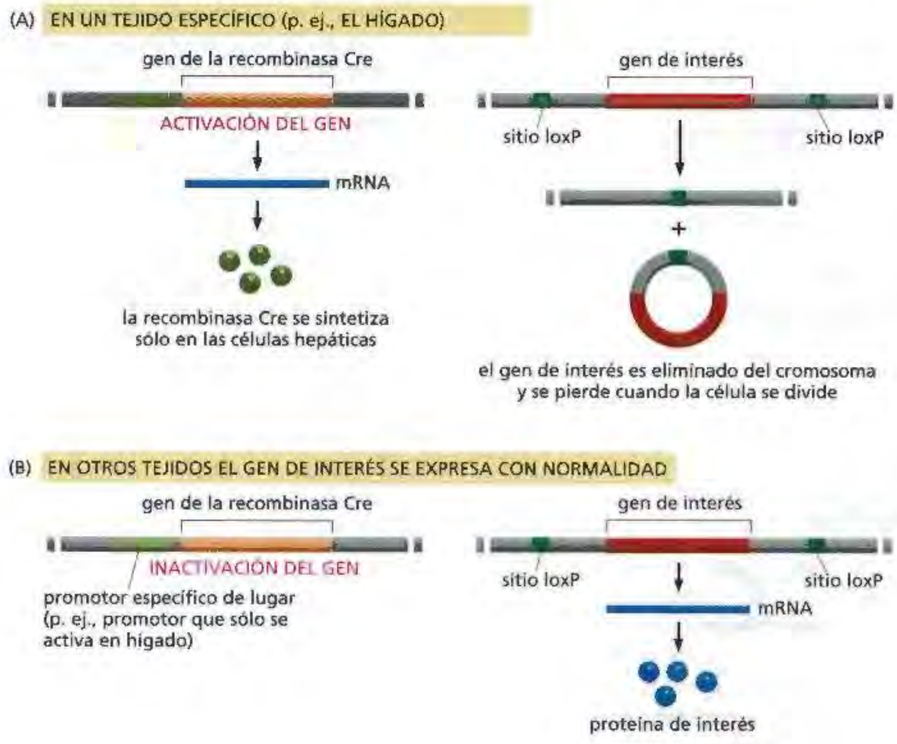


Figura 5–79 Cómo se puede utilizar la enzima de la recombinación conservativa específica de lugar para eliminar genes específicos de determinados tejidos de ratón. Esta técnica requiere la inserción en la línea germinal del animal de dos moléculas de DNA diseñadas especialmente. La primera contiene el gen de la recombinasa (en este caso la recombinasa Cre del bacteriófago P1) bajo control de un promotor específico de tejido, que asegura que la recombinasa sólo se exprese en ese tejido. La segunda molécula de DNA contiene el gen de interés flanqueado por sitios de reconocimiento para la recombinasa (en este caso sitios loxP). El ratón está modificado de tal manera que ésta es la única copia de ese gen; así, si la recombinasa sólo se expresara en el hígado, el gen de interés se eliminaría allí y sólo allí.

Tal como se describe en el Capítulo 7, se conocen muchos promotores específicos de tejido; además, muchos de esos promotores son activos sólo en momentos concretos del desarrollo. Así, es posible estudiar el efecto de la eliminación específica de genes en muchos tiempos diferentes durante el desarrollo de cada tejido.

por ejemplo ensamblando un gen activo a partir de segmentos codificadores separados. Este tipo de control génico tiene la ventaja de que se puede heredar directamente, ya que el nuevo reordenamiento del DNA se transfiere a los cromosomas hijos de forma automática cuando la célula se divide. Veremos ejemplos específicos de este uso de la recombinación conservativa específica de lugar en el Capítulo 7 (véase Figura 7–64).

Las recombinasas conservativas bacterianas específicas de lugar se han convertido en herramientas muy útiles para los biólogos celulares y del desarrollo. Para poder descifrar el papel de determinados genes y proteínas en organismos complejos pluricelulares, se utilizan técnicas de ingeniería genética para producir ratones que tengan un gen que codifique una enzima para la recombinación específica de lugar y una diana de DNA diseñada que contiene los lugares que reconoce dicha enzima. En el momento adecuado, el gen que codifica la enzima puede activarse y reordenar la secuencia del DNA diana. Este reordenamiento se utiliza para eliminar un gen de un tejido en particular de ratón (**Figura 5–79**). Esta técnica es particularmente útil cuando el gen de interés desempeña un papel principal en el desarrollo temprano de muchos tejidos; una deleción completa del gen desde la línea germinal podría provocar la muerte en etapas tempranas de la embriogénesis. Se puede utilizar la misma estrategia para expresar de forma inapropiada cualquier gen específico en un tejido de interés. Con esta herramienta, en principio, se puede determinar la influencia de cualquier proteína en cualquier tejido de un animal intacto.

Resumen

Los genomas de prácticamente todos los organismos contienen elementos genéticos móviles que pueden desplazarse desde una posición en el genoma a otra, mediante procesos de recombinación transposicional o conservativa específica de lugar. En la mayoría de los casos, este desplazamiento se produce al azar y ocurre con frecuencias muy bajas. Los elementos genéticos móviles incluyen los transposones, que se desplazan dentro de una misma célula (y sus descendientes), y todos aquellos virus cuyos genomas pueden integrarse en los genomas de sus células huésped.

Existen tres clases de transposones: transposones de DNA, retrotransposones retrovirales y retrotransposones no retrovirales. Excepto los de la tercera clase, todos los transposones tienen parientes muy cercanos entre los virus. A pesar de que los virus y los elementos transponibles pueden considerarse como parásitos, muchos de los nuevos ordenamientos de las secuencias del DNA que producen sus procesos de recombinación específica de lugar han generado una variabilidad genética crucial para la evolución de las células y los organismos.

PROBLEMAS

¿Qué afirmaciones son ciertas? Explicar por qué sí o por qué no

5-1 No hay dos células del cuerpo que tengan la secuencia nucleotídica idéntica.

5-2 En *E. coli*, en la que la horquilla de replicación viaja a una velocidad de 500 pares de nucleótidos por segundo, el DNA situado por delante de la horquilla tiene que rotar aproximadamente a una velocidad de 3000 revoluciones por minuto.

5-3 Cuando se encuentran dos horquillas de replicación bidireccionales de orígenes adyacentes, la cadena conductora siempre se encuentra con la cadena retrasada.

5-4 Todos los mecanismos de reparación del DNA dependen de la existencia de dos copias de la información genética, una en cada uno de los cromosomas homólogos.

Resolver los siguientes problemas

5-5 Para determinar la reproducibilidad de las mediciones de la frecuencia de mutación, se realiza el siguiente experimento. Se inoculan 10 cultivos, cada uno con una sola bacteria de *E. coli*, y se dejan crecer hasta que cada uno contenga 10^6 células; entonces, se mide el número de células en cada cultivo que tienen una mutación en el gen de interés. Como los resultados del experimento inicial son sorprendentes, se repite el experimento para confirmarlos. Ambos conjuntos de resultados muestran una variabilidad extrema, como se muestra en la **Tabla P5–1**. Asumiendo que la tasa de mutación es constante, ¿por qué hay tanta variación en la frecuencia de células mutantes entre cultivos diferentes?

Tabla P5–1 Frecuencias de células mutantes en varios cultivos (Problema 5–5).

	CULTIVO (células mutantes/10^6 células)									
EXPERIMENTO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	4	0	257	1	2	32	0	0	2	1
2	128	0	1	4	0	0	66	5	0	2

5-6 Las enzimas de reparación del DNA reparan sobre todo errores de apareamiento de bases en la cadena de DNA recién sintetizada, utilizando la cadena de DNA antigua como patrón. Si los errores de apareamiento fuesen reparados sin tener en cuenta qué cadena fue utilizada como patrón, ¿se reducirían los errores de replicación con el sistema de reparación de errores de apareamiento? Un mecanismo de reparación de errores de apareamiento indiscriminado, ¿daría lugar a una tasa de mutación inferior, superior o igual que si no hubiese ningún mecanismo de reparación? Razonar las respuestas.

5-7 Si la DNA polimerasa necesita un cebador perfectamente apareado para poder añadir el siguiente nucleótido, ¿cómo es que se le "escapan" nucleótidos mal apareados que sirven como sustrato a las enzimas de reparación de errores de apareamiento?

5-8 Un laboratorio está estudiando el ciclo "vital" de un virus animal cuyo genoma es un DNA circular de doble cadena. El proyecto consiste en definir la localización del (de los) origen(es) de replicación y determinar si esta localización se da en un sentido o en ambos a partir del origen (replicación unidireccional o bidireccional). Para conseguirlo se han aislado moléculas replicativas, cortándolas con una nucleasa de restricción que corta el genoma vírico en un solo punto y convierte en lineal la molécula de DNA; se han examinado las moléculas resultantes con el microscopio electrónico. Algunas de las moléculas observadas se ilustran en la **Figura P5–1**. (Recordar que es imposible distinguir la orientación de una molécula de DNA de otra en el microscopio electrónico.)

Es necesario presentar las conclusiones al resto del laboratorio mañana mismo. ¿Cómo contestar a las dos preguntas iniciales? ¿Hay un solo origen de replicación o varios? ¿La replicación es unidireccional o bidireccional?

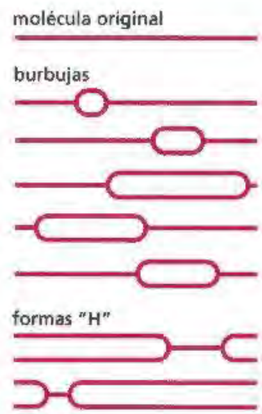


Figura P5–1 Formas paternas y replicativas de un virus animal (Problema 5–8).

5-9 Al comparar la frecuencia de las dieciséis secuencias de dinucleótidos posibles en *E. coli* y en células humanas, no hay diferencias significativas excepto el nucleótido 5'-CG-3'. La frecuencia de los dinucleótidos CG en el genoma humano es significativamente inferior que en *E. coli* y significativamente inferior que el esperado por azar. ¿Por qué los dinucleótidos CG están infrarrepresentados en el genoma humano?

5-10 Parece que las células somáticas acumulan "cicatrices" genómicas como resultado de la reparación poco precisa de las roturas de doble cadena por unión de extremos no homólogos (NHEJ: ***nonhomologous end-joining***). Según la frecuencia de roturas en fibroblastos humanos primarios, a la edad de 70 años, cada célula somática contiene unas 2000 mutaciones inducidas por la unión de extremos no homólogos debido a reparaciones imprecisas. Si esas mutaciones se distribuyeran al azar por todo el genoma, ¿cuántos genes estarían afectados? ¿Es previsible que la función celular estuviese afectada? Explicar por qué. (Asumir que el 2% del genoma, un 1,5% codificante y un 0,5% regulador, contiene información crucial.)

5-11 Dibujar la estructura de la doble unión de Holliday que resultaría de la invasión de cadena por los dos extremos de un dúplex roto a un dúplex homólogo intacto como el que se muestra en la **Figura P5–2**. Indicar el extremo izquierdo de cada cadena de la unión de Holliday 5' o 3' de manera que la relación entre el dúplex paterno y el recombinante sea clara. Indicar cómo se utilizaría la síntesis de DNA para llenar los huecos en cada cadena.

5-12 ¿Por qué la recombinación entre secuencias repetidas similares pero no exactas representa un problema para las células humanas? ¿Cómo nos protege el sistema de reparación de errores de apareamiento de este tipo de recombinaciones?



Figura P5–2 Un dúplex roto con colas de cadena sencilla listas para invadir un dúplex homólogo intacto (Problema 5–11).

BIBLIOGRAFÍA

General

Biological Response to DNA Damage (2000) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65.

Brown TA (2002) Genomes 2, 2.ª ed. New York: Wiley-Liss.

Friedberg EC, Walker GC, Siede W et al (2005) DNA Repair and Mutagenesis. Washington, DC: ASM Press.

Hartwell L, Hood L, Goldberg ML et al (2006) Genetics: from Genes to Genomes. Boston: McGraw Hill.

Stent GS (1971) Molecular Genetics: An Introductory Narrative. San Francisco: WH Freeman.

Watson J, Baker T, Bell S et al (2004) Molecular Biology of the Gene, 5.ª ed. Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

El mantenimiento de las secuencias de DNA

Cooper GM, Brudno M, Stone ES et al (2004) Characterization of evolutionary rates and constraints in three mammalian genomes. *Genome Res* 14:539–548.

Crow JF (2000) The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nature Rev Genet* 1:40–47.

Hedges SB (2002) The origin and evolution of model organisms. *Nature Rev Genet* 3:838–849.

King MC, Wilson AC (1965) Evolution at two levels in humans and chimpanzees. *Science* 188:107–16.

Mecanismos de replicación del DNA

Alberts B (1998) The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell* 92:291–294.

Dillingham MS (2006) Replicative helicases: a staircase with a twist. *Curr Biol* 16:R844–R847.

Indiani C & O'Donnell M (2006) The replication clamp-loading machine at work in the three domains of life. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:751–761.

Kornberg A (1960) Biological synthesis of DNA. *Science* 131:1503–1508.

Li JJ & Kelly TJ (1984) SV40 DNA replication *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6973.

Meselson M & Stahl FW (1958) The replication of DNA in *E. coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 44:671–682.

Modrich P & Lahue R (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* 65:101–133.

Mott ML & Berger JM (2007) DNA replication initiation: mechanisms and regulation in bacteria. *Nature Rev Microbiol* 5:343–354.

O'Donnell M (2006) Replisome architecture and dynamics in *E. coli*. *J Biol Chem* 281:10653–10656.

Okazaki R, Okazaki T, Sakabe K et al. (1968) Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 59:598–605.

Raghuraman MK, Winzeler EA, Collingwood D et al (2001) Replication dynamics of the yeast genome. *Science* 294:115–121.

Rao PN & Johnson RT (1970) Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature* 225:159.

Wang JC (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3:430–440.

Iniciación y terminación de la replicación de DNA en los cromosomas

Chan SR & Blackburn EH (2004) Telomeres and telomerase. *Philos Trans R Soc Lond B Bio Sci* 359:109–121.

Costa S & Blow JJ (2007) The elusive determinants of replication origins. *EMBO Rep* 8:332–334.

Groth A, Rocha W & Almouzni G (2007) Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* 128:721–733.

Machida YJ, Hamlin JL & Dutta A (2005) Right place, right time, and only once: replication initiation in metazoans. *Cell* 123:13–24.

O'Donnell M & Kuriyan J (2005) Clamp loaders and replication initiation. *Curr Opin Struct Biol* 16:35–41.

Robinson NP & Bell SD (2005) Origins of DNA replication in the three domains of life. *FEBS J* 272:3757–3766.

Smogorzewska A & de Lange T (2004) Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem* 73:177–208.

Reparación de DNA

Barnes DE, & Lindahl T (2004) Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet* 38:445–476.

Harrison JC & Haber JE (2006) Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet* 40:209–235.

Heller RC & Marians KJ (2006) Replisome assembly and the direct restart of stalled replication. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:932–43.

Lieber M, Ma Y et al (2003) Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4:712–720.

Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362:709–715.

Prakash S & Prakash L (2002) Translesion DNA synthesis in eukaryotes: a one- or two-polymerase affair. *Genes Dev* 16:1872–1883.

Sancar A, Lindsey-Boltz LA et al. (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 73:39–85.

Svejstrup JQ (2002) Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3:21–29.

Wyman C & Kanaar R (2006) DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet* 40:363–383.

Recombinación homóloga

Adams MD, McVey M & Sekelsky JJ (2003) *Drosophila* BLM in double-strand break repair by synthesis-dependent strand annealing. *Science* 299:265–267.

Cox MM (2001) Historical overview: searching for replication help in all of the rec places. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:8173–8180.

Holliday R (1990) The history of the DNA heteroduplex. *BioEssays* 12:133–142.

Lisby M, Bartow JH et al (2004) Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* 118:699–713.

McEachern MJ & Haber JE (2006) Break-induced replication and recombinational telomere elongation in yeast. *Annu Rev Biochem* 75:111–135.

Michel B, Grompone G et al (2004) Multiple pathways process stalled replication forks. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:12783–12788.

Szostak JW, Orr-Weaver TK, Rothstein RJ et al (1983) The double-strand break repair model for recombination. *Cell* 33:25–35.

West SC (2003) Molecular views of recombination proteins and their control. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4:435–445.

Transposición y recombinación conversativa específica de lugar

Campbell AM (1993) Thirty years ago in genetics: prophage insertion into bacterial chromosomes. *Genetics* 133:433–438.

Comfort NC (2001) From controlling elements to transposons: Barbara McClintock and the Nobel Prize. *Trends Biochem Sci* 26:454–457.

Craig NL (1996) Transposition, in *Escherichia coli* and *Salmonella*, pp 2339–2362. Washington, DC: ASM Press.

Gottesman M (1999) Bacteriophage lambda: the untold story. *J Mol Biol* 293:177–180.

Grindley ND, Whiteson KL & Rice PA (2006) Mechanisms of site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 75:567–605.

Varmus H (1988) Retroviruses. *Science* 240:1427–1435.

Zickler D & Kleckner N (1999) Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet* 33:603–754.

Cómo leen las células el genoma: del DNA a la proteína

6

En este capítulo

DEL DNA AL RNA 331

DEL RNA A LA PROTEÍNA 366

EL MUNDO DE RNA Y EL ORIGEN DE LA VIDA 400

No fue hasta que se descubrió la estructura del DNA, a principios de la década de 1950, cuando se hizo evidente de qué manera estaba codificada la información hereditaria en la secuencia de nucleótidos del DNA. Desde entonces el progreso ha sido espectacular. Cincuenta años después, conocimos la secuencia completa del genoma de muchos organismos, incluyendo los seres humanos y, por consiguiente, conocemos la máxima cantidad de información que se requiere para generar un organismo complejo como nosotros mismos. Los límites de la información hereditaria determinan las características bioquímicas y estructurales de las células y dejan bien establecido que la biología no es infinitamente compleja.

En este capítulo, explicaremos de qué manera descodifican y utilizan las células la información de sus genomas. Hemos aprendido mucho sobre las instrucciones genéticas escritas en un alfabeto de tan sólo cuatro "letras" –los cuatro nucleótidos diferentes del DNA– y cómo estas instrucciones dirigen la formación de una bacteria, una mosca o un ser humano. Sin embargo, todavía queda mucho por descubrir sobre cómo la información almacenada en el genoma de un organismo puede originar incluso la bacteria más sencilla con 500 genes, y mucho menos cómo dirige el desarrollo de un organismo humano, con sus aproximadamente 25.000 genes. Todavía quedan muchas áreas oscuras, retos fascinantes que esperan a la próxima generación de biólogos y biólogas celulares.

Los problemas a los que se enfrentan las células para descodificar sus genomas se pueden apreciar si consideramos una pequeña parte del genoma de la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* (**Figura 6–1**). Una parte importante de la información codificada en el DNA tanto de este como de otros genomas, especifica el orden lineal –la secuencia– de los aminoácidos de cada proteína que fabrica el organismo. Como se describe en el Capítulo 3, la secuencia de aminoácidos, a su vez, dirige el plegamiento de cada proteína dando lugar a una molécula con una forma y unas propiedades químicas características. Cuando una célula fabrica una determinada proteína, tiene que descodificar de forma adecuada la región correspondiente del genoma. Pero el DNA del genoma también codifica información que especifica en qué momento de la vida del organismo y en qué células se expresará cada gen en forma de su correspondiente proteína. Dado que las proteínas son los principales componentes de las células, la descodificación del genoma no sólo determina el tamaño, la forma, las propiedades bioquímicas y el comportamiento de las células, sino también las características distintivas de cada especie de la Tierra.

En principio, se podría pensar que la información presente en los genomas debería estar dispuesta de una manera ordenada, parecida a la de un diccionario o a la de un listín de teléfonos. Aunque los genomas de algunas bacterias parecen bastante bien organizados, los genomas de la mayoría de organismos pluricelulares, como el de la *Drosophila* de nuestro ejemplo, están sorprendentemente desordenados. Las pequeñas fracciones de DNA codificador (es decir, el DNA que codifica proteínas) están separadas entre sí por enormes bloques de DNA sin significado aparente. Algunos fragmentos del genoma contienen muchos genes, mientras que otros están casi desprovistos de ellos. Las proteínas que realizan funciones muy relacionadas en la célula suelen tener sus genes localizados en cromosomas diferentes, mientras que los genes adyacentes cudifican proteínas que tienen muy poco que ver unas con otras. Descodificar los genomas no es tarea fácil. Incluso con la ayuda de potentes ordenadores, a los investigadores les sigue resultando muy difícil localizar de forma precisa el inicio y el final de los genes, en las secuencias de DNA de los genomas complejos, y todavía más difícil predecir cuándo se expresará cada gen en la vida del organismo. Aunque se conoce la secuencia del genoma humano, probablemente necesitaremos toda una década para identificar cada gen y determinar la secuencia de aminoácidos precisa de la proteína que codifica.


CLAVE:
contenido % en GC
25
65
elementos transponibles
13 o más
1 a 12
ninguno
genes conocidos y predichos identificados en la hebra superior del DNA
genes conocidos y predichos identificados en la hebra inferior del DNA
la longitud de la barra indica el número de cDNA correspondientes identificados en las bases de datos
100.000 pares de nucleótidos
código de colores de la similitud de secuencia de los genes identificados
MNL
NL
MN
N
ML
L
M
sin similitudes en MNL
M = mamíferos
N = *C. elegans*
L = *S. cerevisiae*

Figura 6–1 ***(página anterior)*** **Descripción esquemática de una fracción del cromosoma 2 del genoma de la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*.** Esta figura representa aproximadamente el 3% del total del genoma de *Drosophila*, dispuesto en seis segmentos contiguos. Como se resume en la clave, las representaciones simbólicas son las siguientes: *líneas negras verticales* de varios grosores: localización de elementos transponibles, las barras más gruesas indican grupos de estos elementos; *rectángulos coloreados*: genes (tanto conocidos como predichos) codificados por una de las hebras del DNA (rectángulos *por encima* de la línea horizontal) y genes codificados por la otra hebra (rectángulos *por debajo* de la línea horizontal). La longitud de cada rectángulo que representa un gen incluye tanto sus exones (DNA que codifica la proteína) como sus intrones (DNA no codificador) (véase la Figura 4–15); su altura es proporcional al número de cDNA conocidos que coinciden con ese gen. (Como se describe en el Capítulo 8, los cDNA son las copias de DNA de las moléculas de mRNA, y las bases de datos contienen grandes colecciones de secuencias de nucleótidos de estos cDNA; cuanto mayor sea el número de coincidencias, mayor es el grado de fiabilidad de que el gen predicho realmente se transcriba a RNA y constituya, por tanto, un auténtico gen.) El color del rectángulo de cada gen indica si se conoce algún gen muy parecido en otros organismos. Por ejemplo, MNL significa que el gen tiene correspondencia con genes de mamíferos, del gusano nematodo *Caenorhabditis elegans* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. MN indica que el gen tiene correspondencia con genes de mamíferos y del nematodo, pero no con genes de la levadura. Las barras *arco iris* indican el contenido en porcentaje de pares de bases G-C; a lo largo de muchos genomas diferentes, este porcentaje muestra una variación regional sorprendente, cuyo origen y significado es impreciso. (De M.D. Adams et al., *Science* 287:2185-2195, 2000. Con la autorización de AAAS.)

A pesar de esta complejidad inherente, las células de nuestro organismo realizan esta labor miles de veces por segundo.

El DNA del genoma no dirige directamente la síntesis de proteínas, sino que utiliza el RNA como intermediario. Cuando la célula necesita una proteína determinada, la secuencia de nucleótidos de la región apropiada de la inmensa molécula de DNA del cromosoma se copia primero a RNA (proceso llamado *transcripción*). Son estas copias de RNA de segmentos del DNA las que se utilizan como moldes para dirigir la síntesis de las proteínas (proceso llamado *traducción*). Por tanto, el flujo de información genética en las células va del DNA al RNA y de éste, a las proteínas (**Figura 6–2**). Todas las células, desde las bacterias a los seres humanos, expresan su información genética de esta manera –un principio tan fundamental que se ha denominado el *dogma central* de la biología molecular.

A pesar de la universalidad de este dogma, existen importantes variaciones en el mecanismo por el que la información fluye desde el DNA a las proteínas. Entre estas variaciones, una de las principales es que, en las células eucariotas, los transcritos de RNA sufren una serie de procesamientos en el núcleo, incluyendo su *maduración* o *ayuste*, antes de que se les permita salir del núcleo y ser traducidos a proteínas. Estas etapas del procesamiento pueden cambiar aspectos críticos del "significado" de una molécula de RNA y, por tanto, resultan cruciales para entender de qué manera las células eucariotas leen sus genomas. Finalmente, aunque en este capítulo nos vamos a centrar en la producción de las proteínas codificadas por el genoma, también veremos que el producto final de muchos genes es la molécula de RNA. Como en el caso de las proteínas, muchas de estas moléculas de RNA se pliegan formando estructuras tridimensionales precisas, que desempeñan papeles estructurales, catalíticos y reguladores dentro de la célula.

Empezaremos este capítulo con el primer paso en la descodificación del genoma: el proceso de la transcripción, por el cual se forma una molécula de RNA a partir del DNA de un gen. Seguiremos, a continuación, el destino de esta molécula de RNA a través de la célula, acabando cuando se haya formado una proteína correctamente plegada. Al final del capítulo, se considerará cómo ha surgido el actual esquema de almacenamiento, transcripción y traducción de la información, muy complejo, a partir de los sistemas mucho más sencillos que se dieron en las primeras etapas de la evolución de la célula.

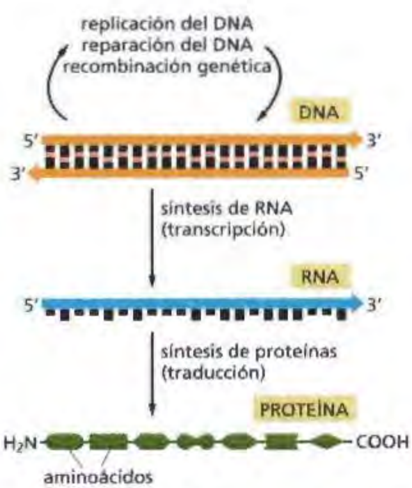


Figura 6–2 El camino desde el DNA hasta la proteína. El flujo de la información genética, desde el DNA al RNA (transcripción) y desde el RNA a las proteínas (traducción), tiene lugar en todas las células.

DEL DNA AL RNA

La transcripción y la traducción son los mecanismos por los que las células leen, o expresan, las instrucciones genéticas de sus genes. Se pueden obtener muchas copias idénticas de RNA a partir del mismo gen y cada molécula de RNA puede dirigir la síntesis de muchas moléculas de la misma proteína, por lo que las células pueden sintetizar grandes cantidades de proteína cuando las necesiten de manera rápida. Pero cada gen puede ser transcrito y traducido con una eficiencia diferente, permitiendo a la célula fabricar ingentes cantidades de algunas proteínas determinadas y cantidades minúsculas de otras (**Figura 6–3**). Además, como se describirá en el próximo capítulo, una célula puede cambiar (o regular) la expresión de cada uno de sus genes según sus necesidades del momento –y la manera más habitual es controlando la producción de sus RNA.

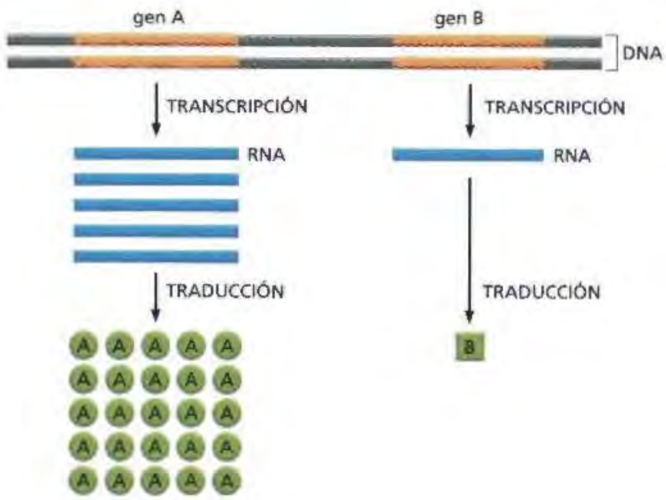


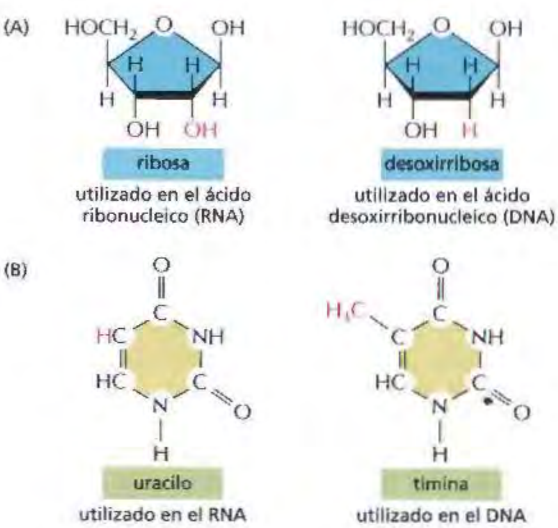
Figura 6–3 Los genes se pueden expresar con diferentes eficiencias. En este ejemplo, el gen A se transcribe y se traduce de forma mucho más eficiente que el gen B. Por esta razón, la cantidad de la proteína A de la célula será muy superior que la de la proteína B.

Fragmentos de la secuencia de DNA se transcriben a RNA

El primer paso que da una célula para leer la parte que necesita de las instrucciones genéticas es copiar un determinado fragmento de su secuencia de nucleótidos de DNA –un gen– a una secuencia de nucleótidos de RNA. La información del RNA, aunque esté copiada en una forma química diferente, continúa estando escrita esencialmente con el mismo lenguaje que la del DNA: el lenguaje de una secuencia de nucleótidos. De aquí el nombre que recibe de **transcripción**.

Como el DNA, el RNA es un polímero lineal de cuatro tipos diferentes de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster (**Figura 6–4**). Desde el punto de vista químico se diferencia del DNA en dos aspectos: (1) los nucleótidos del RNA son *ribonucleótidos* –es decir, contienen el azúcar ribosa (de ahí el nombre de ácido *ribo*nucleico) en vez de desoxirribosa; (2) como el DNA, el RNA contiene las bases adenina (A), guanina (G) y citosina (C), pero en lugar de la timina (T) del DNA, contiene la base uracilo (U). El U, al igual que la T, se aparea mediante puentes de hidrógeno con la A (**Figura 6–5**), por lo que las propiedades del apareamiento de bases complementarias descritas para el DNA en los Capítulos 4 y 5 también se aplican al RNA (en el RNA, la G se aparea con la C y la A se aparea con la U). También se encuentran otros tipos de apareamiento en el RNA; por ejemplo, la G se aparea a veces con la U.

A pesar de que estas diferencias químicas son pequeñas, el DNA y el RNA se diferencian enormemente en su estructura global. Mientras que el DNA siempre aparece en las células como una doble hélice, el RNA es de cadena sencilla. Una cadena de RNA se puede plegar, por tanto, y adoptar formas particulares de la misma manera que las cadenas polipeptídicas



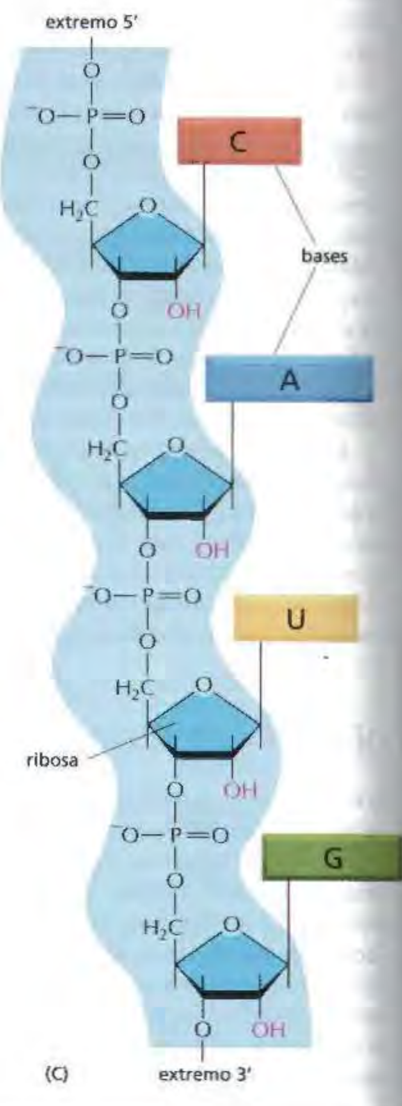


Figura 6–4 Estructura química del RNA. (A) El azúcar del RNA es la ribosa, que se diferencia de la desoxirribosa, el azúcar del DNA, por la presencia de un grupo –OH adicional. (B) El RNA contiene la base uracilo, que se diferencia de la timina, la base equivalente del DNA, por la ausencia de un grupo $-CH_3$. (C) Pequeño fragmento de RNA. El enlace fosfodiéster que une los nucleótidos del RNA es el mismo que se da en el DNA.

se pueden plegar hasta alcanzar la forma final de una proteína (**Figura 6–6**). Como veremos más adelante en este mismo capítulo, la capacidad de plegarse formando complejas formas tridimensionales, permite que algunas moléculas de RNA desarrollen funciones estructurales y catalíticas concretas.

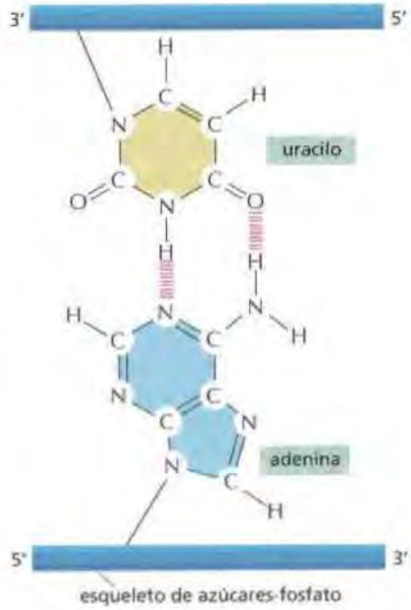


Figura 6–5 El uracilo forma pares de bases con la adenina. La ausencia de un grupo metilo en el U no tiene efecto sobre el apareamiento de bases; por tanto, el par de bases U-A se asemeja al par de bases T-A (véase la Figura 4–4).

La transcripción genera un RNA complementario a una hebra del DNA

El RNA de una célula se obtiene mediante transcripción del DNA, un proceso que tiene algunas similitudes con el proceso de la replicación del DNA descrito en el Capítulo 5. La transcripción se inicia con la apertura y el desenrollamiento de una pequeña zona de la doble hélice de DNA, que deja al descubierto las bases de cada una de las dos hebras del DNA. Una de ellas actúa como molde para la síntesis de una molécula de RNA. Como en la replicación del DNA, la secuencia de nucleótidos de la cadena de RNA depende de la complementariedad de bases entre los nucleótidos que se van incorporando y el molde del DNA. Cuando se produce un apareamiento correcto, el ribonucleótido recién incorporado se une covalentemente a la cadena de RNA que se está sintetizando, mediante una reacción catalizada por enzimas. La cadena de RNA originada durante la transcripción –el *transcrito*– se va elongando nucleótido a nucleótido, y tiene una secuencia que es exactamente complementaria a la de la hebra de DNA utilizada como molde (**Figura 6–7**).

La transcripción, sin embargo, difiere de la replicación del DNA en varios aspectos importantes. Al contrario de lo que pasa con la nueva hebra de DNA formada, la cadena de RNA no permanece unida por enlaces de hidrógeno a la hebra molde de DNA. Justo por detrás de la región en la que se van incorporando los nuevos ribonucleótidos, la cadena de RNA se va separando del DNA y la doble hélice se vuelve a formar. De esta manera, las moléculas de RNA generadas en la transcripción son liberadas del molde de DNA en forma de cadenas de una sola hebra. Además, dado que sólo se copia una pequeña región del DNA, las moléculas de RNA son mucho más cortas que las de DNA. Una molécula de DNA de un cromosoma humano puede tener hasta 250 millones de pares de bases de longitud, mientras que la mayoría de los RNA no tiene más de unos cuantos miles de nucleótidos y muchos de ellos son incluso mucho menores.

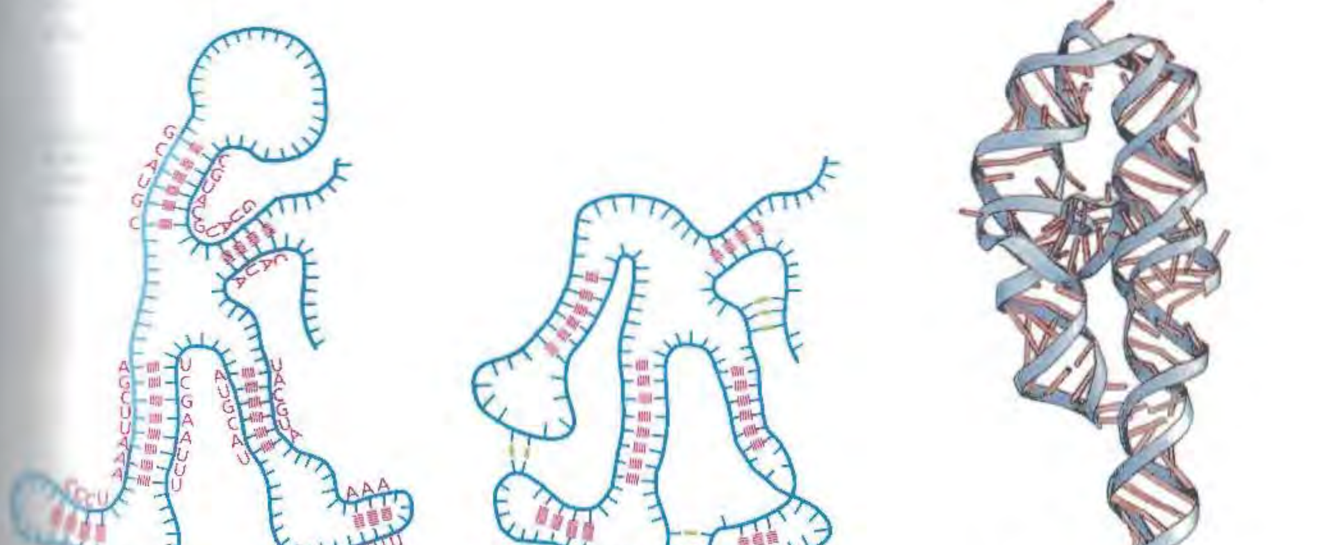


Figura 6–6 El RNA puede plegarse adoptando estructuras específicas. El RNA es, mayoritariamente, una molécula de hebra sencilla, pero a menudo contiene pequeños segmentos de nucleótidos que pueden formar pares de bases convencionales con secuencias complementarias de la misma molécula. Estas interacciones, junto con otras interacciones adicionales "no convencionales" entre bases, permiten que una molécula de RNA se pliegue formando una estructura tridimensional que está determinada por su secuencia de nucleótidos. <AATC> (A) Esquema de una estructura de RNA plegada, mostrando sólo apareamientos de bases convencionales. (B) Estructura con interacciones entre bases convencionales (*rojo*) y no convencionales (*verde*). (C) Estructura de una molécula real de RNA, parte de un intrón de grupo I (véase la Figura 6–36). Cada par de bases convencional está indicado por un "peldaño" de la doble hélice. Las bases con otras configuraciones están indicadas por peldaños rotos.

Las enzimas que llevan a cabo la transcripción reciben el nombre de **RNA polimerasas**. Como pasa con la DNA polimerasa que cataliza la replicación del DNA (descrita en el Capítulo 5), las RNA polimerasas catalizan la formación de los enlaces fosfodiéster que unen a los nucleótidos formando una cadena lineal. La RNA polimerasa se desplaza, paso a paso, a lo largo del DNA, desenrollando la hélice de DNA un poco por delante del centro activo de polimerización y expone una nueva región de la hebra molde para el apareamiento complementario de bases. De esta manera, la cadena naciente de RNA va creciendo nucleótido a nucleótido en el sentido 5' a 3' (**Figura 6–8**). Los sustratos son nucleósidos trifosfato (ATP, CTP, UTP y GTP). Como en el caso de la replicación del DNA, la hidrólisis de los enlaces de alta energía suministra la energía necesaria para impulsar la reacción (véase la Figura 5–4).

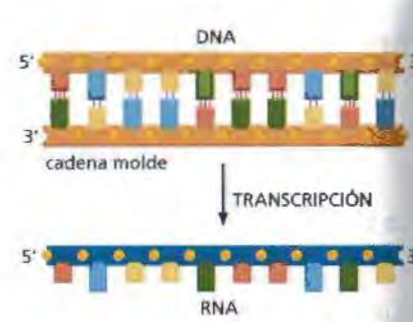


Figura 6–7 La transcripción del DNA genera una molécula de RNA de cadena sencilla, complementaria a la de una de las cadenas del DNA.

La liberación casi inmediata de la cadena de RNA del molde de DNA a medida que va siendo sintetizada, supone que se pueden hacer muchas copias de RNA a partir del mismo gen en un tiempo relativamente corto, ya que se puede empezar la síntesis de una molécula de RNA antes de que haya acabado la síntesis de la molécula anterior (**Figura 6–9**). Cuando las molécnlas de RNA polimerasa se suceden con una elevada frecuencia, cada una de ellas desplazándose a unos 20 nucleótidos por segundo (la velocidad en eucariotas), se pueden obtener más de mil transcritos de un mismo gen en solamente una hora.

Aunque la RNA polimerasa cataliza esencialmente la misma reacción química que la DNA polimerasa, existen algunas diferencias muy relevantes entre las actividades de ambas enzimas. En primer lugar, y la diferencia más obvia, la RNA polimerasa cataliza la unión de ribonucleótidos, no de desoxirribonucleótidos. Segundo, y a diferencia de las DNA polimerasas implicadas en la replicación del DNA, las RNA polimerasas pueden iniciar una cadena de RNA sin ningún cebador. Esta diferencia puede darse porque la transcripción no tiene por qué ser tan exacta como la replicación (véase la Tabla 5–1, p. 271). Al contrario que el DNA, el RNA no almacena de forma permanente la información genética en las células. Las RNA polimerasas cometen aproximadamente un error cada 10^4 nucleótidos incorporados al RNA (mientras que la tasa de error de la DNA polimerasa es de alrededor de uno cada 10^7 nucleótidos) y las consecuencias de un error en la transcripción del RNA son mucho menos relevantes que las de la replicación del DNA.

Aunque las RNA polimerasas no son tan exactas como las DNA polimerasas que replican el DNA, también presentan un cierto mecanismo de corrección de lectura. Si se incorpora un ribonucleótido incorrecto a la cadena de RNA, la polimerasa puede retroceder y su centro activo lleva a cabo una reacción de escisión que recuerda la reacción inversa a la poli-

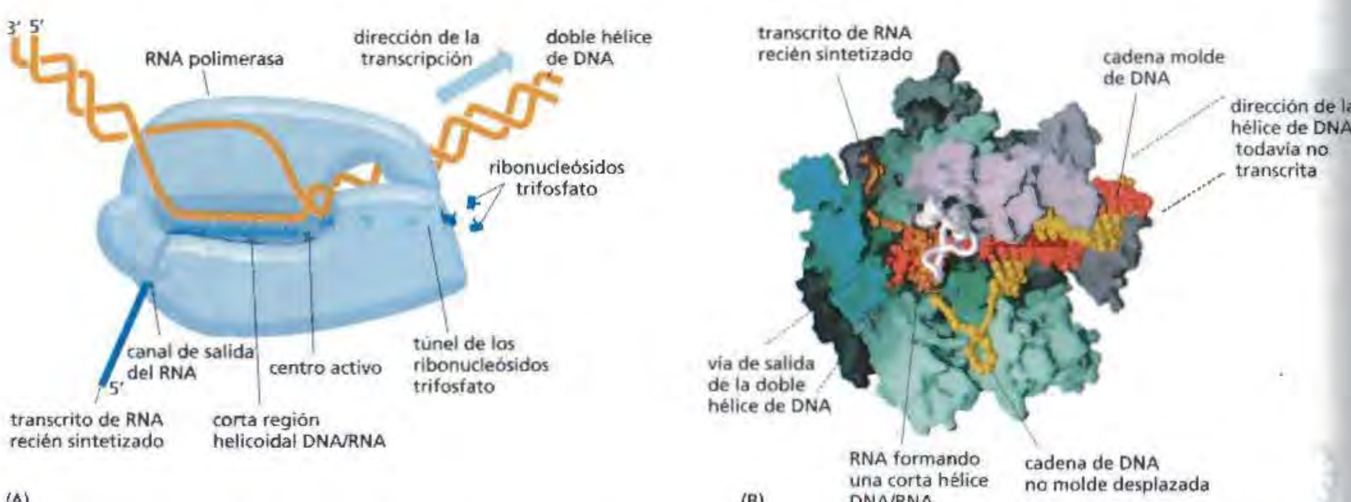


Figura 6–8 La enzima RNA polimerasa transcribe el DNA. (A) La RNA polimerasa (*azul claro*) se desplaza paso a paso a lo largo del DNA y desenrolla la hélice de DNA en su centro activo. A medida que avanza, la polimerasa va añadiendo nucleótidos (representado con *forma de pequeñas "T"*), uno a uno, a la cadena de RNA en el centro activo de polimerización, utilizando como molde una de las hebras desenrolladas del DNA. Por lo tanto, el transcrito de RNA es una copia complementaria de una de las dos cadenas del DNA. Por tanto se forma una corta región helicoidal DNA/RNA (de aproximadamente nueve pares de nucleótidos de longitud); el resultado es que existe una "ventana" formada por una hélice DNA/RNA que se desplaza a lo largo del DNA acompañando a la polimerasa. Los nucleótidos que se incorporan lo hacen en forma de ribonucleótidos trifosfato (ATP, UTP, CTP y GTP) y la energía almacenada en sus enlaces fosfato-fosfato aporta la fuerza impulsora de la reacción de polimerización (véase la Figura 5–4). (B) La estructura de la RNA polimerasa bacteriana ha sido determinada mediante cristalografía de rayos X. Esta RNA polimerasa está formada por cuatro subunidades diferentes, indicadas por diferentes colores. La cadena de DNA utilizada como molde es *roja*, la cadena que no actúa de molde es *amarilla*. (A, adaptado de una figura amablemente cedida por Robert Landick; B, cortesía de Seth Darst.)

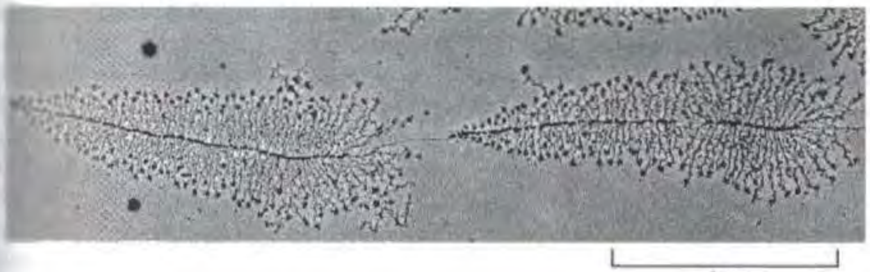


Figura 6–9 Transcripción de dos genes vista al microscopio electrónico. La electromicrografía muestra muchas moléculas de RNA polimerasa transcribiendo simultáneamente dos genes adyacentes. Las moléculas de RNA polimerasa se observan como una serie de puntos a lo largo del DNA con los transcritos recién sintetizados (en forma de delgados filamentos) unidos a ellas. Las moléculas de RNA (RNA ribosómicos) mostradas en este ejemplo no se transcribirán a proteína sino que se utilizarán directamente como componentes de los ribosomas, las máquinas en las que tiene lugar la traducción. Se cree que las partículas que se observan en el extremo 5′ (el extremo libre) de cada transcrito de rRNA reflejan el inicio del ensamblaje de los ribosomas. Por las longitudes de los transcritos recién sintetizados, se puede deducir que las moléculas de RNA polimerasa están transcribiendo de izquierda a derecha. (Cortesía de Ulrich Scheer.)

polimerización, excepto porque utiliza agua en lugar de pirofosfato y se libera un nucleósido monofosfato.

Dado que tanto las DNA como las RNA polimerasas llevan a cabo polimerizaciones de nucleótidos dependientes de patrón, podría esperarse que ambos tipos de enzimas pudieran estar relacionadas desde un punto de vista estructural. Sin embargo, estudios de cristalografía de rayos X revelan que excepto por el hecho de contener un ion Mg^{2+} crítico en el lugar catalítico, prácticamente no están relacionadas entre ellas; de hecho parece que las enzimas que polimerizan nucleótidos de forma dependiente de un patrón aparecieron dos veces de forma independiente al inicio de la evolución de las células. Un linaje lleva a las DNA polimerasas modernas, a las transcriptasas reversas descritas en el Capítulo 5 y a algunas subunidades de las RNA polimerasas de virus. El otro linaje forma todas las RNA polimerasas celulares modernas (**Figura 6–10**), de las que tratamos en este capítulo.

Las células fabrican varios tipos de RNA

La mayoría de los genes contenidos en el DNA de una célula especifican la secuencia de aminoácidos de las proteínas; las moléculas de RNA copiadas a partir de estos genes (que son las responsables, en último término, de la síntesis de proteínas) reciben el nombre de moléculas de **RNA mensajero (mRNA)**. Sin embargo, en una pequeña proporción de genes, el producto final es el propio RNA. El análisis detallado de la secuencia completa del DNA de la levadura *S. cerevisiae* ha desvelado la existencia de más de 750 genes (aproximadamente, algo más del 10% del número total de genes de la levadura) que fabrican RNA como producto final. Estos RNA, al igual que las proteínas, actúan como componentes enzimáticos y estructurales en

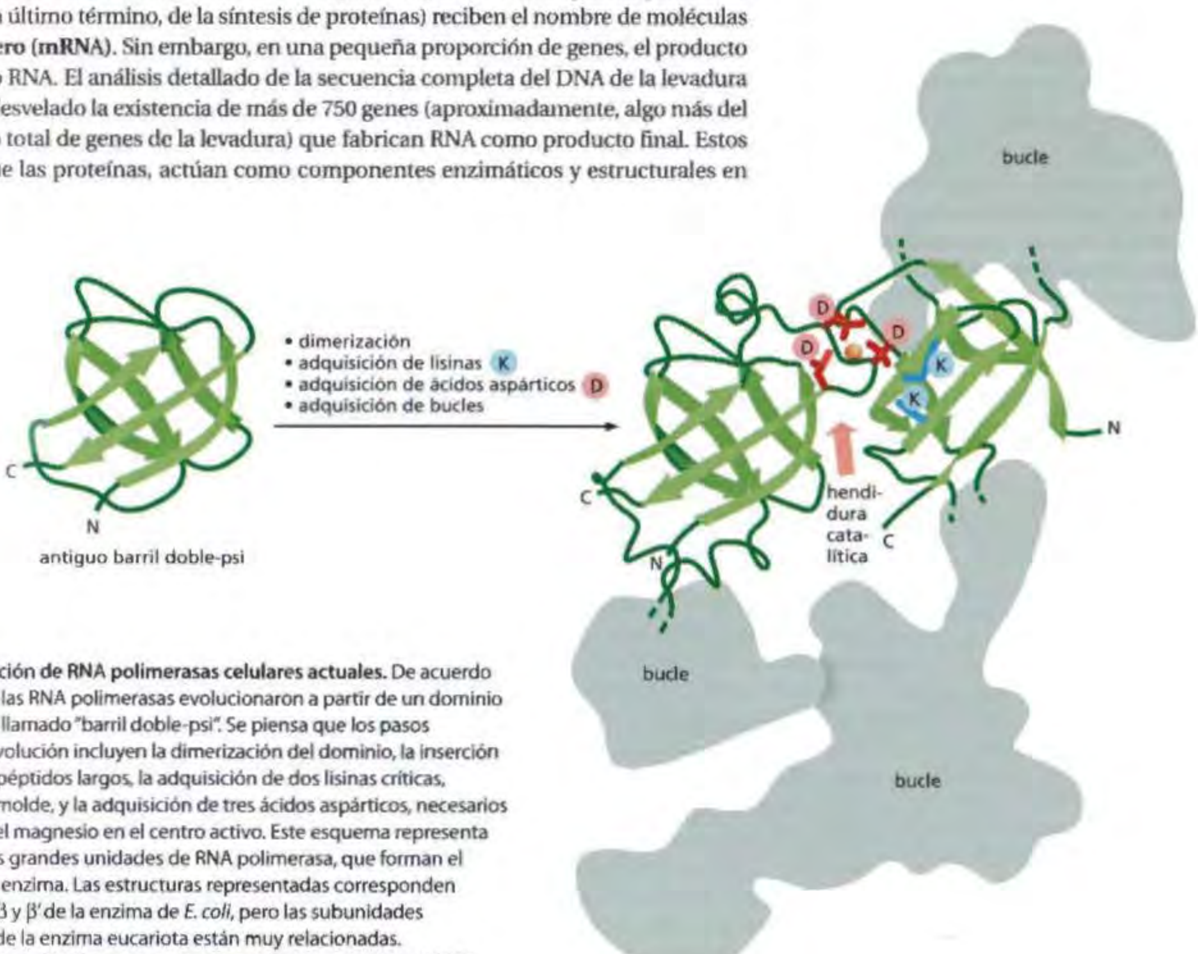


Figura 6–10 Evolución de RNA polimerasas celulares actuales. De acuerdo con esta hipótesis, las RNA polimerasas evolucionaron a partir de un dominio proteico ancestral, llamado "barril doble-psi". Se piensa que los pasos iniciales en esta evolución incluyen la dimerización del dominio, la inserción de "bucles" de polipéptidos largos, la adquisición de dos lisinas críticas, necesarias para el molde, y la adquisición de tres ácidos aspárticos, necesarios como quelantes del magnesio en el centro activo. Este esquema representa la evolución de dos grandes unidades de RNA polimerasa, que forman el centro activo de la enzima. Las estructuras representadas corresponden a las subunidades β y β′ de la enzima de *E. coli*, pero las subunidades correspondientes de la enzima eucariota están muy relacionadas. (Adaptado de L.M. Iyer, E.V. Koonin y L. Aravind, *BMC Struct. Biol.* 3:1, 2003.)

una gran variedad de procesos de la célula. En el Capítulo 5 aparecía uno de estos RNA, el molde utilizado por la enzima telomerasa. Aunque muchas de las funciones de estos RNA no codificantes todavía constituyen un misterio, veremos a lo largo de este capítulo que los *RNA pequeños nucleares* (*snRNA*: ***s**mall **n**uclear **RNA***) dirigen la maduración del pre-mRNA formando el mRNA, que las moléculas de *RNA ribosómico* (*rRNA*) forman el núcleo de los ribosomas y que los *RNA de transferencia* (*tRNA*) son los adaptadores que seleccionan los aminoácidos y los retienen en el lugar adecuado del ribosoma para que se puedan incorporar a las proteínas. Finalmente, se explicará en el Capítulo 7 que las moléculas de *microRNA (miRNA)* y que las moléculas de *RNA pequeñas de interferencia* (*siRNA*) actúan como reguladoras clave de la expresión génica en eucariotas (**Tabla 6–1**).

Cada segmento de DNA que se puede transcribir recibe el nombre de *unidad de transcripción*. En las células eucariotas, una unidad de transcripción suele llevar la información de un solo gen y, por tanto, codifica una única molécula de RNA o una única molécula de proteína (o un grupo de proteínas relacionadas, si el RNA transcrito inicial puede sufrir más de un tipo de maduración dando lugar a diferentes mRNA). En bacterias, se da con cierta frecuencia la transcripción conjunta de un grupo de genes adyacentes como una sola unidad; la molécula de mRNA resultante es portadora de la información de varias proteínas distintas.

Considerado globalmente, el RNA constituye un porcentaje muy bajo del peso seco de una célula. La mayoría del RNA de una célula es rRNA; el mRNA apenas representa un 3-5% del total de RNA de una célula de mamífero típica. La población de mRNA está constituida por decenas de miles de especies diferentes y en cada célula, de promedio, tan sólo hay unas 10-15 moléculas de cada especie de mRNA.

En el DNA hay señales codificadas que le indican a la RNA polimerasa dónde empezar y dónde acabar

Para transcribir de forma correcta un gen, la RNA polimerasa debe poder reconocer en qué punto del genoma comienza el gen y dónde acaba. El mecanismo por el que las RNA polimerasas llevan a cabo esta tarea difiere un poco entre bacterias y eucariotas. Dado que el proceso en bacterias es más sencillo, lo estudiaremos primero.

El inicio de la transcripción es un paso especialmente importante en la transcripción génica, ya que es el punto de regulación principal que utiliza la célula para seleccionar qué proteínas se expresan y a qué velocidad. La RNA polimerasa bacteriana es un complejo formado por muchas subunidades que sintetiza RNA utilizando un patrón de DNA como guía. Una de las subunidades, llamada el *factor sigma* (σ), se asocia con el núcleo de la enzima y le ayuda en la lectura de las señales que hay en el DNA y que indican dónde debe empezar la transcripción (**Figura 6–11**). En conjunto, el factor sigma y el núcleo de la enzima constitu-

Tabla 6–1 Tipos principales de RNA que fabrican las células

TIPO DE RNA	FUNCIÓN
mRNA	RNA mensajeros, codifican proteínas
rRNA	RNA ribosómicos, forman la estructura básica de los ribosomas y catalizan la síntesis de proteínas
tRNA	RNA de transferencia, cruciales en la síntesis de proteínas como adaptadores entre el mRNA y los aminoácidos
snRNA	RNA nucleares pequeños, participan en varios procesos nucleares, incluyendo la maduración (ayuste) del pre-mRNA
snoRNA	RNA pequeños nucleolares, participan en el procesamiento y modificación química de los rRNA
scaRNA	RNA Cajal pequeños, participan en la modificación de snoRNA y snRNA
miRNA	microRNA, generalmente regulan la expresión génica bloqueando la traducción de mRNA selectivos
siRNA	RNA de interferencia pequeños, anulan la expresión de un gen mediante degradación directa de mRNA selectivos y el establecimiento de estructuras compactas de cromatina
Otros RNA no codificadores	participan en diversos procesos celulares, como la síntesis de los telómeros, la inactivación del cromosoma X y el transporte de proteínas al ER

constituyen la **holoenzima de la RNA polimerasa**. Este complejo se adhiere débilmente al DNA bacteriano cuando colisionan con él y por lo general una molécula de la holoenzima de RNA polimerasa se desliza con rapidez a lo largo de la molécula de DNA hasta que vuelve a disociarse. Sin embargo, cuando la holoenzima de polimerasa se desliza a lo largo de una región de la doble hélice de DNA llamada **promotor**, una secuencia especial de nucleótidos que indica el punto de inicio para la síntesis de RNA, la polimerasa se une a este DNA con una fuerza mucho mayor. La holoenzima de polimerasa, mediante su factor σ, reconoce la secuencia promotor de DNA y establece contactos específicos con la parte de las bases nitrogenadas que quedan expuestas hacia el exterior de la hélice (*paso 1* de la Figura 6–11).

Cuando la holoenzima de RNA polimerasa se ha unido fuertemente al promotor del DNA, separa la doble hélice exponiendo un pequeño tramo de nucleótidos de cada hebra (*paso 2* de la Figura 6–11). Al contrario de lo que ocurría en la reacción de la helicasa de DNA (véase la Figura 5–14), esta apertura limitada de la hélice no requiere la energía de la hidrólisis de ATP. En su lugar, la polimerasa y el DNA sufren una serie de cambios estructurales reversibles que los sitúan en un estado energético más favorable que el de la unión inicial. Con el DNA desenrollado, una de las dos hebras expuestas actúa como molde para el apareamiento complementario de bases con los ribonucleótidos que se van incorporando, dos de los cuales han sido unidos por la polimerasa para iniciar la cadena de RNA (*paso 3* de la Figura 6–11). Una vez se han incorporado al RNA los diez primeros nucleótidos (un proceso relativamente ineficiente, durante el cual la polimerasa sintetiza y descarta varios oligómeros de RNA), el núcleo de la enzima rompe sus interacciones con el promotor de DNA, debilitando sus interacciones con el factor sigma σ, y se desplaza por el DNA sintetizando RNA (*pasos 4 y 5* de la Figura 6–11). La elongación de la cadena continúa (a una velocidad aproximada de 50 nucleótidos/segundo en el caso de las RNA polimerasas bacterianas) hasta que la enzima encuentra una segunda señal en el DNA, el **terminador** (descrita más adelante), donde la polimerasa se detiene y libera tanto la cadena de RNA recién sintetizada como el molde de DNA (*paso 7* de la Figura 6–11). Una vez el núcleo de la polimerasa se ha liberado en el terminador, vuelve a asociarse con una molécula libre de factor σ y forma una holoenzima que volverá a iniciar el proceso de transcripción.

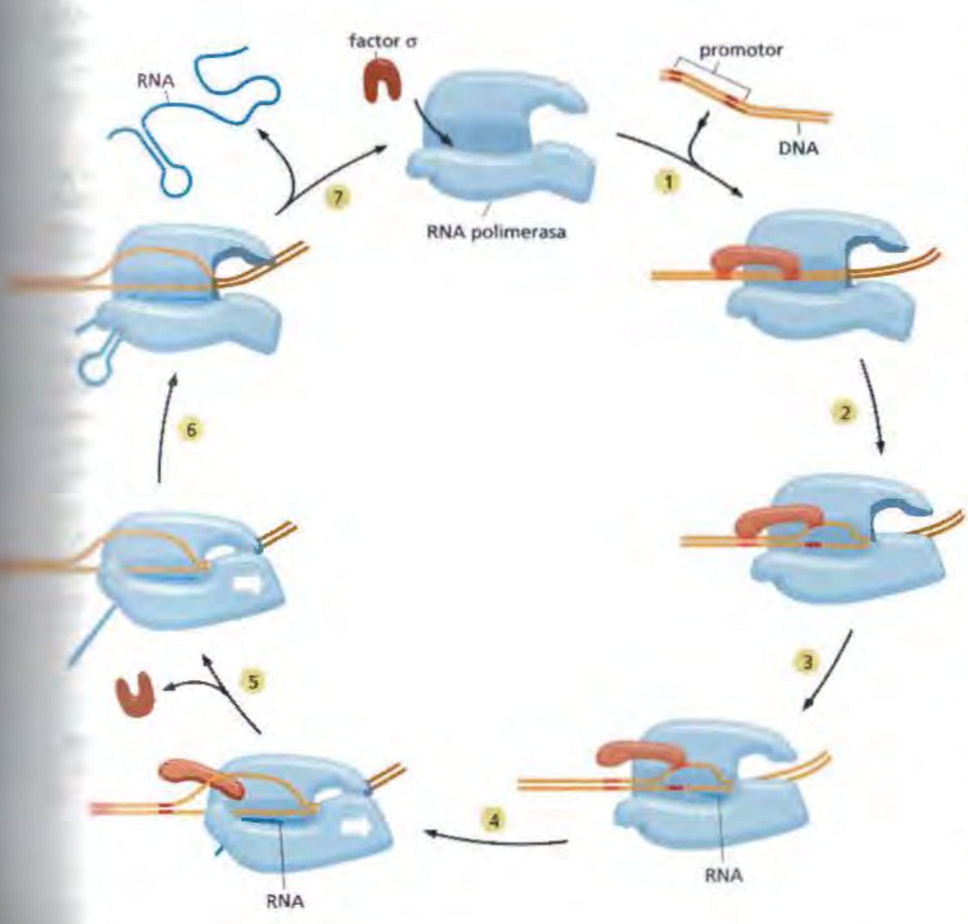


Figura 6–11 Ciclo de transcripción de la RNA polimerasa bacteriana. En el paso 1, se ensambla la holoenzima de la RNA polimerasa (el núcleo de la polimerasa más el factor σ) y localiza un promotor (véase la Figura 6–12). La polimerasa desenrolla el DNA en la posición en la que debe empezar la transcripción (paso 2) e inicia la transcripción (paso 3). Esta síntesis inicial de RNA (a veces llamada "inicio abortivo") es relativamente ineficiente. Sin embargo, cuando la RNA polimerasa ha conseguido polimerizar unos 10 nucleótidos de RNA, rompe su interacción con el promotor y relaja y finalmente rompe su interacción con el factor σ. La polimerasa está ahora lista para realizar la elongación del RNA (paso 4), desplazándose hacia la derecha del DNA en este esquema. Durante la elongación (paso 5) la transcripción es muy rápida, ya que la polimerasa sólo se desprende del molde de DNA y libera la molécula recién sintetizada de RNA cuando se encuentra con una señal de finalización (pasos 6 y 7). Las señales de finalización están codificadas en el DNA, y muchas de ellas actúan formando una estructura en el RNA que desestabiliza la unión de la polimerasa con el RNA (paso 7). En bacterias, todas las moléculas de RNA son sintetizadas por un solo tipo de RNA polimerasa y el ciclo descrito en esta figura tiene validez tanto para la producción de los mRNA como de los RNA estructurales y catalíticos. (Adaptado de una figura cortesía de Robert Landick.)

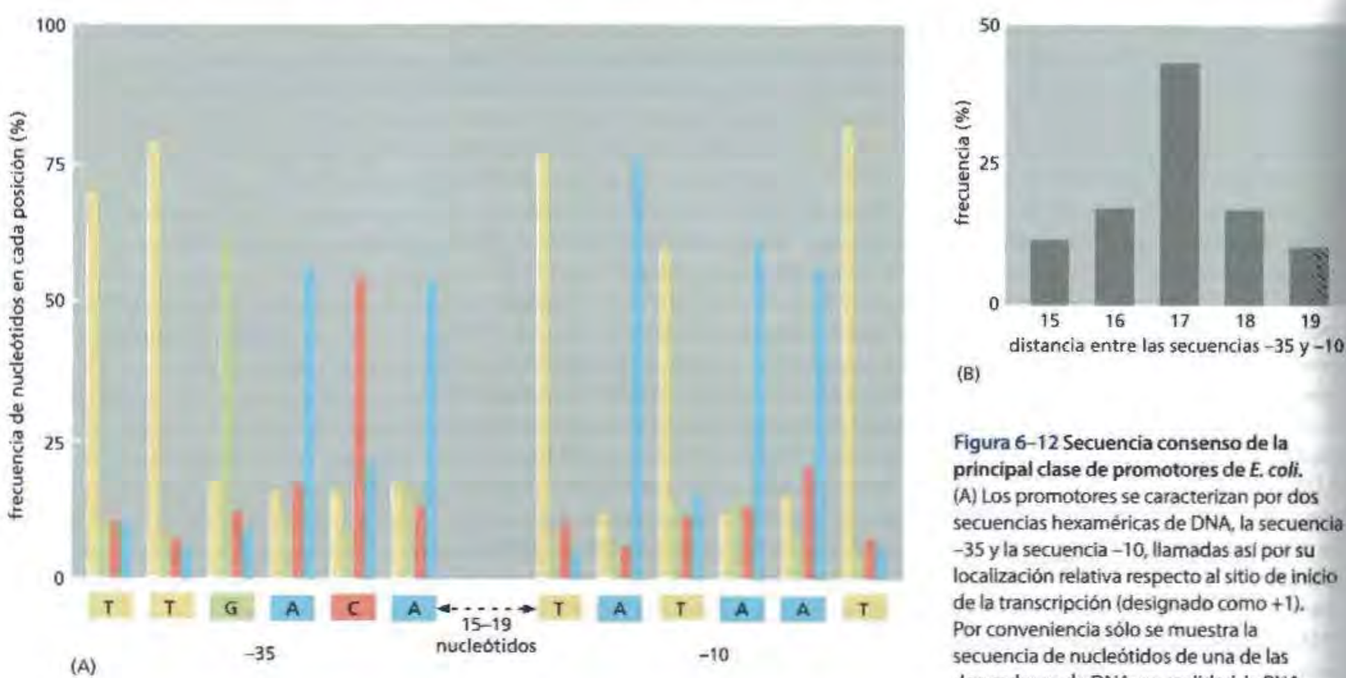


Figura 6–12 Secuencia consenso de la principal clase de promotores de *E. coli*. (A) Los promotores se caracterizan por dos secuencias hexaméricas de DNA, la secuencia –35 y la secuencia –10, llamadas así por su localización relativa respecto al sitio de inicio de la transcripción (designado como +1). Por conveniencia sólo se muestra la secuencia de nucleótidos de una de las dos cadenas de DNA; en realidad, la RNA polimerasa reconoce el promotor como un DNA de doble cadena. Sobre la base de la comparación de 300 promotores, se dan las frecuencias de los cuatro nucleótidos en cada posición de los hexámeros –35 y –10. La secuencia consenso, que se muestra *debajo* de la gráfica, refleja el nucleótido más común en cada posición entre los promotores analizados. La secuencia de nucleótidos situada entre los hexámeros –35 y –10 no presenta ninguna similitud significativa entre los diferentes promotores. (B) Distribución del espaciamiento entre los hexámeros –35 y –10 de los promotores de *E. coli*.

La información de estas dos gráficas es válida para los promotores de *E. coli* que son reconocidos por la RNA polimerasa y el factor σ principal (denominado σ^{70}). Como veremos en el próximo capítulo, las bacterias también contienen otros factores σ minoritarios, cada uno de los cuales reconoce una secuencia promotora diferente. Algunos de los promotores reconocidos por la RNA polimerasa y σ^{70}, particularmente potentes, tienen una secuencia adicional, localizada por delante del hexámero –35 (a la *izquierda*, en la figura), reconocida por otra subunidad de la RNA polimerasa.

El proceso de la iniciación de la transcripción es complejo y requiere que la holoenzima de RNA polimerasa sufra una serie de cambios de conformación. Podemos apreciar estos cambios como de apertura y de posicionamiento del DNA sobre el lugar activo, seguidos de un fortalecimiento progresivo de la unión de la polimerasa al DNA y al RNA, que asegura que no se disociará antes de haber acabado de transcribir el gen. Si una RNA polimerasa se disocia de forma prematura, no puede continuar la síntesis sino que debe volver a empezar de nuevo desde el promotor.

¿De qué manera las señales de terminación consiguen detener la elongación realizada por la polimerasa? En la mayoría de genes bacterianos, la señal de terminación consiste en una serie de pares de nucleótidos A-T precedidos por un secuencia de DNA doblemente simétrica que, una vez transcrita a RNA, se pliega en forma de "horquilla" mediante apareamiento de bases de tipo Watson-Crick (véase la Figura 6–11). Mientras la polimerasa transcribe a lo largo del terminador, la formación de la horquilla puede ayudar a "estirar" el transcrito de RNA del lugar activo. El híbrido DNA-RNA del lugar activo, que se mantiene unido a los terminadores predominantemente por pares de bases U-A (que son menos estables que los pares G-C, ya que forman dos enlaces de hidrógeno en lugar de tres), no es lo bastante fuerte como para mantener el RNA en su lugar, por lo que se disocia y provoca la separación de la RNA polimerasa del DNA (*paso* 7 de la Figura 6–11). Por lo tanto, en algunos aspectos, la terminación de la transcripción parece implicar una reversión de las transiciones estructurales que habían tenido lugar durante el inicio. El proceso de la terminación también es un ejemplo de un tema habitual en este capítulo: el plegamiento del RNA formando estructuras específicas afecta muchas etapas de la descodificación del genoma.

Las señales de inicio y final de la transcripción tienen secuencias de nucleótidos heterogéneas

Como acabamos de ver, los procesos de inicio y terminación de la transcripción implican una serie de complicadas transiciones estructurales en las moléculas de proteína, DNA y RNA que intervienen. A menudo, las señales codificadas en el DNA que especifican estas transiciones son difíciles de reconocer por los investigadores. De hecho, la comparación de muchos promotores bacterianos diferentes revela un sorprendente grado de variabilidad. Sin embargo, todas ellas contienen secuencias relacionadas, que reflejan de forma parcial los aspectos del DNA que son reconocidos directamente por el factor σ. Por lo general a estas características comunes se las conoce como *secuencia consenso* (**Figura 6–12**). Una **secuencia de nucleótidos consenso** se deduce de la comparación de muchas secuencias que tienen la misma función básica y se escoge el nucleótido que más se repite en cada posición. Por lo

tanto, son como un resumen o "promedio" de un gran número de secuencias individuales de nucleótidos.

Las secuencias de DNA de los promotores bacterianos difieren en aspectos que determinan su fuerza (es decir, el número de procesos de iniciación por unidad de tiempo del promotor). Los procesos evolutivos han ido modificando cada promotor de forma que la transcripción se inicie tan a menudo como sea necesario, generando así un amplio espectro de promotores. Los promotores de los genes que codifican las proteínas más abundantes son mucho más fuertes que los que están asociados a genes que codifican proteínas menos frecuentes; son sus secuencias de nucleótidos las responsables de estas diferencias.

Como los promotores bacterianos, los terminadores de transcripción también presentan un amplio rango de secuencias cuya característica común más importante consiste en la capacidad de formar una estructura de RNA en horquilla sencilla. Dado que un número casi ilimitado de secuencias de nucleótido tienen esta capacidad potencial, las secuencias de terminación son incluso más heterogéneas que las secuencias de promotores.

Se ha tratado en detalle los promotores y terminadores bacterianos, para ilustrar un punto importante en el análisis de las secuencias del genoma. Aunque sabemos muchas cosas sobre los promotores y los terminadores bacterianos y podemos generar secuencias consenso que resumen sus características más relevantes, la variación que presentan en sus secuencias de nucleótidos dificulta su localización definitiva simplemente mediante un análisis de la secuencia de nucleótidos del genoma. Resulta incluso más difícil localizar secuencias análogas en los genomas eucariotas, debido en parte al exceso de DNA que contienen. A menudo, hace falta disponer de información adicional, en parte procedente de la experimentación directa, para localizar e interpretar con precisión estas cortas señales de DNA contenidas en el genoma.

Dado que el DNA es de doble hebra, en principio a partir de cualquier gen se podrían transcribir dos moléculas de RNA diferentes, utilizando cualquiera de las dos hebras de DNA como molde. Sin embargo, un gen típico tiene un solo promotor y, como las secuencias de nucleótidos de los promotores son asimétricas (véase Figura 6–12), la polimerasa sólo se puede unir en una orientación. La polimerasa sintetiza RNA en el sentido 5' a 3' por lo que únicamente podrá transcribir una de las hebras de DNA por gen (**Figura 6–13**). Las secuencias de los genes revelan que la hebra de DNA que se utiliza como molde para la síntesis de RNA varía de un gen a otro dependiendo de la localización y de la orientación del promotor (**Figura 6–14**).

Una vez considerada la transcripción en bacterias, vamos a tratar ahora la situación en las células eucariotas, en las que la síntesis de RNA es mucho más elaborada.

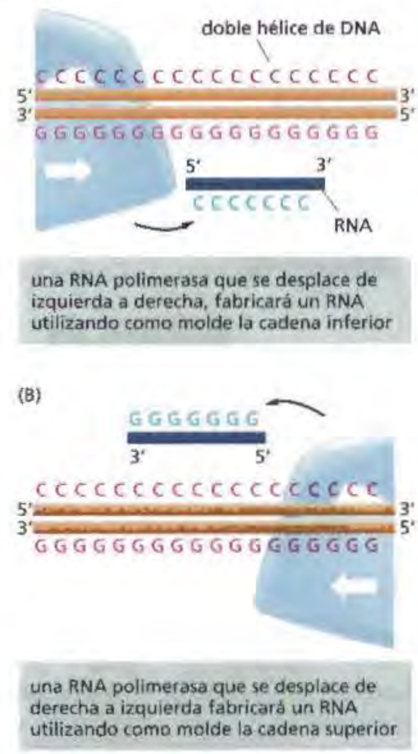


Figura 6–13 Importancia de la orientación de la RNA polimerasa. La cadena de DNA que actúa de molde debe ser leída en dirección 3' a 5'. Así, el sentido del desplazamiento de la RNA polimerasa determina cuál de las dos cadenas de DNA actuará de molde para la síntesis de RNA, como se muestra en (A) y (B). El sentido de la polimerasa, a su vez, está determinado por la orientación de la secuencia del promotor, el lugar en el que la RNA polimerasa inicia la transcripción.

En las células eucariotas, el inicio de la transcripción requiere muchas proteínas

Al contrario que en las bacterias, que contienen un único tipo de RNA polimerasa, los núcleos de las células eucariotas contienen tres: la *RNA polimerasa I*, la *RNA polimerasa II* y la *RNA polimerasa III*. Las tres polimerasas son estructuralmente semejantes entre sí (y a la enzima bacteriana) y comparten subunidades comunes pero transcriben diferentes tipos de genes (**Tabla 6–2**). Las RNA polimerasas I y III transcriben genes que codifican RNA de transferencia, RNA ribosómicos y varios RNA. La RNA polimerasa II transcribe la mayoría de los genes, incluyendo los que codifican proteínas. En este capítulo nos centraremos en esta enzima.

Aunque la RNA polimerasa II eucariota tiene muchas similitudes estructurales con la RNA polimerasa bacteriana (**Figura 6–15**) también existen varias diferencias importantes en la forma en la que funcionan una y otra. Dos de estas diferencias nos afectan en especial.

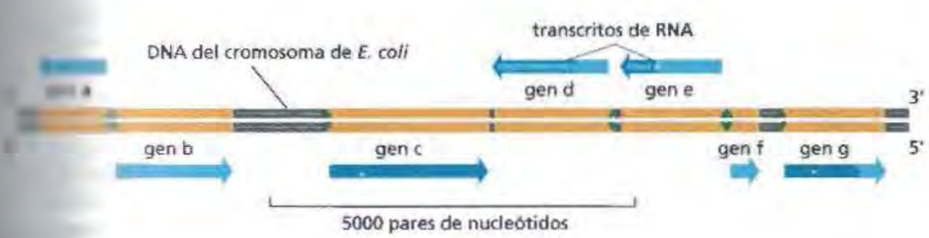


Figura 6–14 Sentidos de transcripción de un fragmento de cromosoma bacteriano. Algunos genes se transcriben utilizando como molde una de las dos cadenas de DNA, mientras que otros utilizan la cadena contraria. El sentido de la transcripción está determinado por el promotor en el que empieza cada gen (*puntas de flecha verdes*). En esta figura se presenta aproximadamente un 0,2% (9000 pares de bases) del cromosoma de *E. coli*. Los genes transcritos de *izquierda* a *derecha* utilizan la cadena inferior de DNA como molde; los que se transcriben de *derecha* a *izquierda* utilizan la cadena superior de molde.

Tabla 6–2 Las tres RNA polimerasas de las células eucariotas

TIPO DE POLIMERASA	GENES TRANSCRITOS
RNA polimerasa I	genes de los rRNA 5.8S, 18S y 28S
RNA polimerasa II	todos los genes codificadores de proteínas, más los genes de snoRNA, miRNA, siRNA y algunos genes de snRNA
RNA polimerasa III	genes de los tRNA, rRNA 5S, algunos genes de snRNA y los genes de otros RNA pequeños

Los rRNA se nombran de acuerdo con sus valores "S", que hacen referencia a su velocidad de sedimentación en una ultracentrifugadora. Un valor elevado de S corresponde a un rRNA grande.

1. Mientras que la RNA polimerasa bacteriana solamente necesita una proteína adicional (el factor σ) para que se inicie la transcripción *in vitro*, las RNA polimerasa eucariotas requieren muchas otras proteínas adicionales llamadas en conjunto los *factores generales de transcripción*.
2. En las células eucariotas, el inicio de la transcripción debe resolver el problema que supone el empaquetamiento del DNA en nucleosomas y en formas de cromatina de orden superior, aspectos ausentes en los cromosomas bacterianos.

La RNA polimerasa II necesita los factores generales de transcripción

Los **factores generales de transcripción** facilitan la colocación correcta de la RNA polimerasa de los eucariotas sobre el promotor, ayudan a separar las dos hebras de DNA para permitir el inicio de la transcripción y liberan la RNA polimerasa del promotor para que pueda elongar la cadena de RNA, cuando ya se ha iniciado la transcripción. <CTAT> Estas proteínas reciben el calificativo de "generales" porque son necesarias en casi todos los promotores utilizados por la RNA polimerasa II; consisten en un grupo de proteínas que interactúan unas con otras, designadas como *TFII (transcription factor for polymerase **II**:* factores de transcripción de la polimerasa II), y se identifican de forma arbitraria como TFIIB, TFIID, etc. En un sentido amplio, los factores generales de transcripción eucariotas llevan a cabo funciones equivalentes a las del factor σ en bacterias. De hecho, porciones de TFIIF tienen la misma estructura tridimensional que las zonas equivalentes de σ.

La **Figura 6–16** ilustra el ensamblaje de los factores de transcripción sobre un promotor utilizado por la RNA polimerasa II y en la **Tabla 6–3** se resumen sus actividades. El proceso de ensamblaje se inicia con la unión del factor general de transcripción TFIID a una corta secuencia de la doble hélice de DNA compuesta principalmente por nucleótidos A y T. Por esta razón, esta secuencia se conoce como la secuencia TATA, o **caja TATA**, y la subunidad del TFIID que la reconoce se llama TBP (de proteína de unión a la TATA: *TATA-**binding protein***). La caja TATA está localizada unos 25 nucleótidos por delante del punto de inicio de la transcripción. No es la única secuencia del DNA que señala el inicio de la transcripción (**Figura 6–17**), pero en la mayoría de los promotores de la polimerasa II es la más importan-

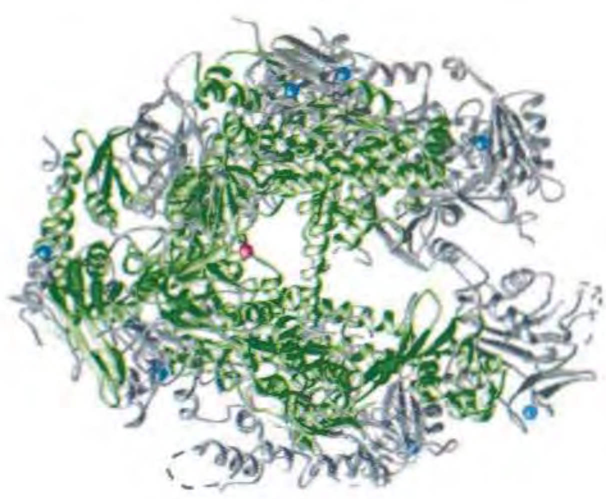
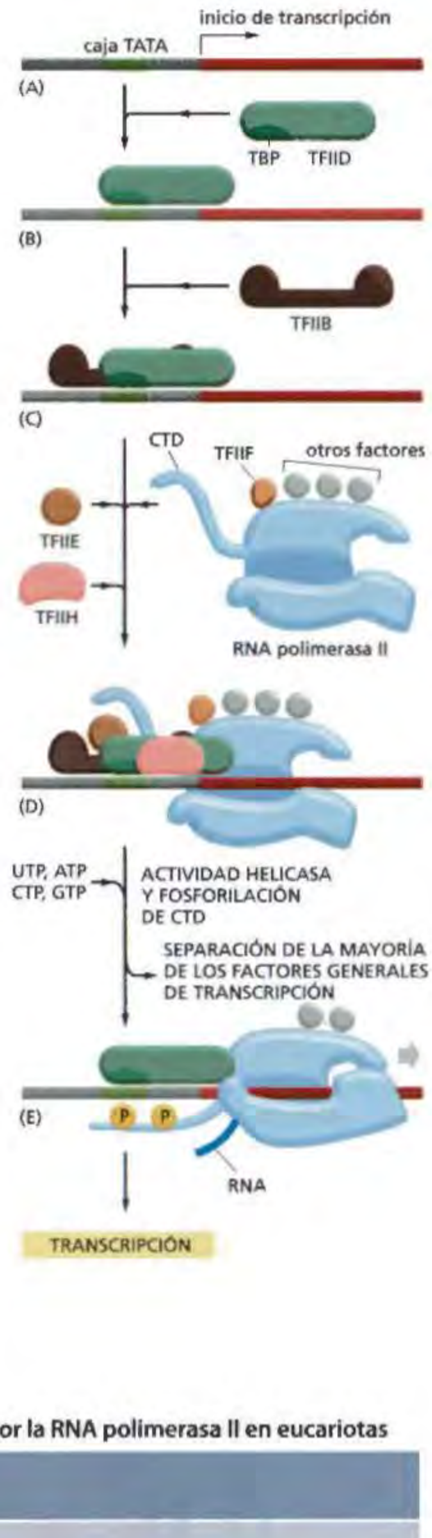


Figura 6–15 Semejanza estructural entre una RNA polimerasa bacteriana y una RNA polimerasa II de eucariota. Las regiones de ambas RNA polimerasas que presentan estructuras similares se representan en *verde*. La polimerasa de eucariota es mayor que la enzima bacteriana (12 subunidades en lugar de 5) y algunas de las regiones adicionales se presentan en *gris*. Las esferas *azules* representan átomos de Zn que actúan como componentes estructurales de las polimerasas y la esfera *roja* representa el átomo de Mg del centro activo, donde tiene lugar la polimerización. Las RNA polimerasas de las células actuales (bacterias, arqueas y eucariotas) son muy parecidas entre sí, lo cual indica que las características básicas de la enzima se definieron antes de que se iniciara la divergencia de las tres ramas principales de la vida. (Cortesía de P. Cramer y R. Kornberg.)

Figura 6–16 Inicio de la transcripción de un gen eucariota por parte de la RNA polimerasa II. Para comenzar la transcripción, la RNA polimerasa requiere varios factores generales de transcripción. (A) El promotor contiene una secuencia de DNA llamada la caja TATA, localizada a unos 25 nucleótidos de distancia del sitio de inicio de la transcripción. (B) La RNA polimerasa, mediante las subunidades TBP, TFIID reconoce y se une a la caja TATA, lo que permite la unión adyacente del TFIIB. (C). Por conveniencia, no se representa la distorsión de la molécula de DNA causada por la unión del TFIID (véase la Figura 6–18). (D) Los demás factores generales de transcripción, así como la propia RNA polimerasa, se unen al promotor. (E) El TFIIH, mediante la energía del ATP, abre la doble hélice de DNA en el sitio de inicio de la transcripción, dejando expuesta la cadena molde. El TFIIH también fosforila la RNA polimerasa II, cambiando su conformación de manera que la polimerasa se libera de los factores generales y puede empezar la fase de elongación de la transcripción. Tal y como aparece representado, el sitio de fosforilación es una larga cola polipeptídica C-terminal, también llamado dominio C-terminal (CTD: *C-terminal domain*), que se extiende por fuera de la molécula de la polimerasa. El esquema de ensamblaje mostrado en esta figura se ha deducido a partir de experimentos realizados *in vitro* y el orden exacto en el que los factores generales de transcripción se unen al promotor, *in vivo*, puede variar de un gen a otro. Los factores generales de transcripción se han conservado mucho a lo largo de la evolución; algunos de ellos pueden ser sustituidos experimentalmente en células humanas por los correspondientes factores de las levaduras.



[illegible] unión del TFIID causa una gran distorsión en el DNA de la caja TATA (**Figura 6–18**). Se [illegible] que esta distorsión actúa como huella física, para la localización de un promotor activo [illegible] medio de un genoma enorme, y aproxima las secuencias de DNA de ambos lados de la [illegible]sión para que se puedan dar los siguientes pasos del ensamblaje de proteínas. Sólo en-[illegible], se pueden ensamblar otros factores y la RNA polimerasa II formando el *complejo de [illegible] de transcripción* completo (véase la Figura 6–16). De entre los factores generales de [illegible]ipción, el más complicado es TFIIH: consta de 9 subunidades, es casi tan grande co-[illegible] la RNA polimerasa II y, como veremos enseguida, lleva a cabo varias etapas enzimáticas [illegible]rias para el inicio de la transcripción.

[illegible] vez se ha formado el complejo de inicio de transcripción sobre el DNA promotor, la [illegible] polimerasa II tiene que poder acceder a la hebra molde en el punto de inicio de la trans-[illegible]ción. TFIIH, que contiene una DNA helicasa como una de sus subunidades, hace posible [illegible] paso hidrolizando ATP y desenrollando el DNA para exponer la hebra patrón. A conti-[illegible], la RNA polimerasa II al igual que la polimerasa bacteriana, permanece sobre el pro-[illegible], sintetizando pequeñas cadenas de RNA hasta que sufre una serie de cambios [illegible]macionales que le permite separarse del promotor y entrar en la fase de elongación de [illegible]cripción. Un paso clave en esta transición es la adición de grupos fosfato a la "cola" de [illegible] polimerasa (conocida como el CTD o dominio C-terminal). En humanos, el CTD [illegible] en 52 secuencias repetidas en tándem de siete aminoácidos cada una, que cuelgan [illegible]tructura central de la RNA polimerasa. Durante la iniciación de la transcripción, la se-[illegible]alizada en la quinta posición de la secuencia repetida (Ser5) es fosforilada por TFIIH, [illegible]tiene una proteína quinasa en otra de sus subunidades (véase la Figura 6–16D). En-[illegible], la polimerasa puede desprenderse del complejo de factores generales de transcrip-[illegible]. Durante el proceso sufre una serie de cambios conformacionales que refuerzan su

[illegible] 6–3 Factores generales de transcripción necesarios en el inicio de la transcripción por la RNA polimerasa II en eucariotas

[illegible]	NÚMERO DE SUBUNIDADES	PAPEL EN EL INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN
[illegible]		
[illegible]d TBP	1	reconoce la caja TATA
[illegible]d TAF	~11	reconoce otras secuencias de DNA cercanas al punto de inicio de la transcripción; regula la unión de DNA con TBP
[illegible]	1	reconoce elementos BRE en los promotores; coloca con precisión la RNA polimerasa en el lugar de inicio de la transcripción
[illegible]	3	estabiliza la interacción de la RNA polimerasa con TBP y TFIIB; ayuda en la atracción de TFIIE y TFIIH
[illegible]	2	atrae y regula TFIIH
[illegible]	9	desenrolla el DNA en el punto de inicio de la transcripción, fosforila la Ser5 CTD de la RNA polimerasa; libera la RNA polimerasa del promotor

[illegible] formada por TBP y ~11 subunidades adicionales llamadas TAF (*TBP-associated factors*); CTD, dominio C-terminal (*C-terminal domain*).



elemento	secuencia consenso	factor general de transcripción
BRE	G/C G/C G/A C G C C	TFIIB
TATA	T A T A A/T A A/T	TBP
INR	C/T C/T A N T/A C/T C/T	TFIID
DPE	A/G G A/T C G T G	TFIID

Figura 6–17 Secuencias consenso halladas en la proximidad de los puntos de inicio de la RNA polimerasa II de eucariotas. Se indica el nombre dado a cada secuencia consenso (*primera columna*) y el factor general de transcripción que la reconoce (*última columna*). N indica cualquier nucleótido y dos nucleótidos separados por una barra indica la misma probabilidad de cada nucleótido en esa posición. En realidad, cada secuencia consenso es una representación abreviada de un histograma semejante al de la Figura 6–12.

En la mayoría de puntos de inicio de transcripción de la RNA polimerasa II, sólo hay dos o tres de estas cuatro secuencias. Por ejemplo, algunos de los promotores utilizados por la RNA polimerasa II contienen una secuencia TATA, pero los que carecen de ella suelen tener una secuencia INR "fuerte". Aunque la mayoría de las secuencias de DNA que influyen en el inicio de la transcripción están localizadas "por delante" del sitio de inicio de transcripción, algunas, como la secuencia DPE de la figura, se localizan en la región transcrita.

interacción con el DNA y adquiere nuevas proteínas que le permiten transcribir largas secuencias de DNA, que en ocasiones duran muchas horas, sin disociarse del DNA.

Cuando la polimerasa II ha iniciado la elongación del transcrito de RNA, la mayoría de los factores generales de transcripción se liberan del DNA y quedan disponibles para iniciar otra ronda de transcripción con una nueva molécula de RNA polimerasa. Como expondremos dentro de poco, la fosforilación de la cola de la RNA polimerasa II permite que los componentes de la maquinaria de procesamiento del RNA se unan a la polimerasa y estén en posición idónea para modificar el RNA que está siendo transcrito a medida que emerge de la polimerasa.

La polimerasa II también requiere proteínas activadoras, mediadoras y modificadoras de la cromatina

Estudios del comportamiento de la RNA polimerasa II y de sus factores generales de transcripción sobre moldes de DNA purificado permitieron establecer el modelo de la iniciación de la transcripción descrito. Sin embargo, como indicamos en el Capítulo 4, el DNA de las células eucariotas está empaquetado en nucleosomas que, a su vez, están organizados en estructuras de cromatina de orden superior. Como consecuencia de ello, el inicio de la transcripción de una célula eucariota es más complejo y requiere todavía más proteínas que en los estudios sobre DNA purificado. En primer lugar, unas proteínas reguladoras de la expresión génica, llamadas *activadores transcripcionales*, se deben unir a sus secuencias específicas del DNA atrayendo a la RNA polimerasa II hacia el punto de inicio de la transcripción

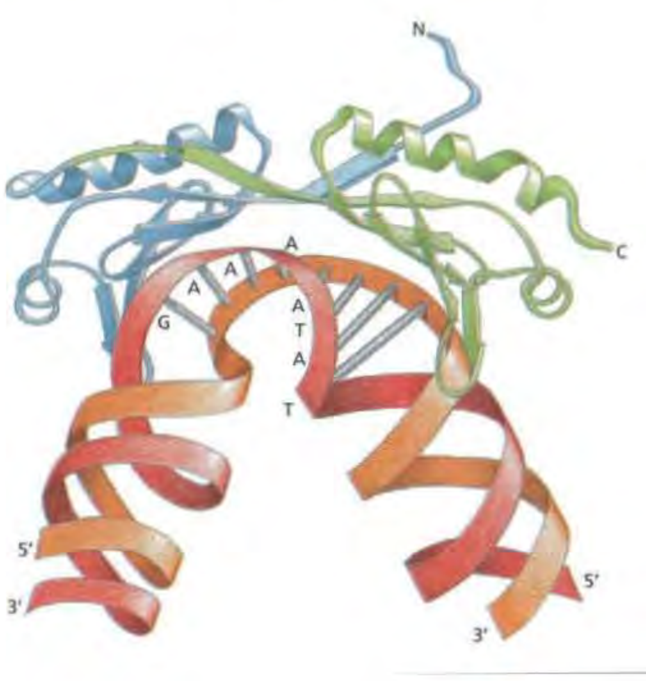


Figura 6–18 Estructura tridimensional de la TBP (proteína de unión a la TATA) unida al DNA. La TBP es la subunidad del factor general de transcripción TFIID responsable de reconocer y unirse a la caja TATA del DNA (*rojo*). La peculiar curvatura del DNA causada por la TBP –dos rizos en la doble hélice que están separados por DNA parcialmente desenrollado– puede actuar como señal para atraer a los demás factores generales de transcripción. La TBP está formada por una sola cadena polipeptídica plegada en dos dominios muy semejantes (*verde* y *azul*). (Adaptado de J.L. Kim et al., *Nature* 365:520-527, 1993. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

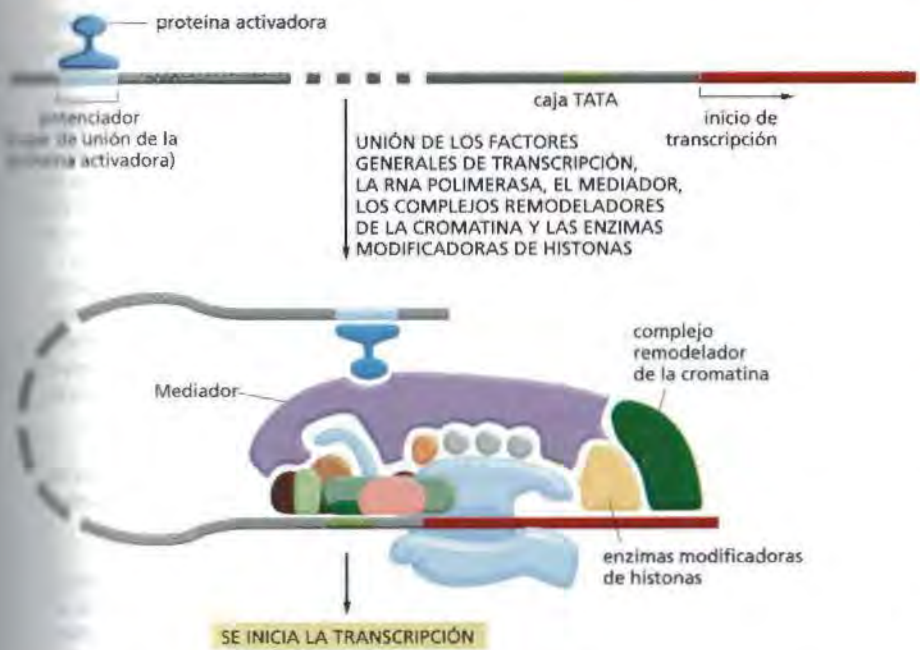


Figura 6–19 Inicio de la transcripción por la RNA polimerasa II en una célula eucariota. El inicio de la transcripción *in vivo* requiere la presencia de diversas proteínas activadoras de la transcripción. Como se describe en el Capítulo 7, estas proteínas se unen a unas cortas secuencias específicas del DNA. Aunque sólo se muestra una de ellas, un gen eucariota típico puede tener muchas proteínas activadoras y todas juntas determinan su velocidad y patrón de transcripción. Actuando a veces a una distancia de varios miles de pares de bases (representado por la molécula interrumpida de DNA), estas proteínas reguladoras de la expresión génica ayudan a ensamblar sobre el promotor la RNA polimerasa, los factores generales de transcripción y el Mediador. Además, los activadores atraen a los complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP y las histonas acetilasas.

Como se describe en el Capítulo 4, el estado "de reposo" de la cromatina es probable que sea el filamento de 30 nm (véase la Figura 4–22), por lo que la transcripción se iniciaría sobre esta forma de DNA. Para simplificar, no se muestra en la figura.

Figura 6–19). En el Capítulo 7 se analizará con más detalle el papel de estos activadores, ya que constituyen una de las principales maneras mediante las cuales las células regulan la expresión de sus genes. Por el momento, destacaremos que su presencia sobre el DNA es necesaria para iniciar la transcripción en una célula eucariota. En segundo lugar, el inicio de la transcripción eucariota *in vivo* requiere la presencia de un complejo proteico conocido como *Mediador*, que permite que las proteínas activadoras se comuniquen correctamente con la polimerasa II y con los factores generales de transcripción. Por último, el inicio de la transcripción en la célula eucariota suele requerir el reclutamiento local de enzimas modificadoras de la cromatina, incluyendo complejos remodeladores de la cromatina y enzimas que modifican las histonas. Como se describió en el Capítulo 4, ambos tipos de enzimas pueden permitir un mayor acceso al DNA presente en la cromatina y, al hacerlo, facilitan el ensamblaje de la maquinaria de inicio de la transcripción sobre el DNA. En el capítulo 7 volveremos a tratar el papel de estas enzimas en la iniciación de la transcripción.

Como se ilustra en la Figura 6–19, en el punto de inicio de la transcripción se han de ensamblar muchas proteínas (más de 100 subunidades individuales) para que comience la transcripción en una célula eucariota. Probablemente el orden del ensamblaje de estas proteínas no parece seguir ninguna pauta preestablecida, sino que el orden difiere de un gen a otro. De hecho, algunos de estos complejos proteicos interactúan unos con otros antes de unirse al DNA y ser reclutados conjuntamente sobre el DNA en forma de subensamblajes preformados. Para iniciar la transcripción, la RNA polimerasa II debe ser liberada de este gran complejo de proteínas lo cual, además de las etapas descritas en la Figura 6–16, requiere a menudo la proteolisis *in situ* de la proteína activadora. Volveremos sobre algunos de estos puntos en el Capítulo 7, en el que explicaremos de qué manera las células eucariotas regulan el proceso del inicio de la transcripción.

La elongación de la transcripción produce una tensión superhelicoidal en el DNA

Una vez iniciada la transcripción, la RNA polimerasa no se desplaza con suavidad a lo largo de la molécula de DNA, sino que lo hace de forma espasmódica, avanzando muy despacio en algunas secuencias y transcribiendo otras muy rápidamente. Durante la elongación, las RNA polimerasas tanto bacterianas como eucariotas se asocian a una serie de *factores de elongación*, proteínas que disminuyen la probabilidad de que la RNA polimerasa se disocie antes de alcanzar el final del gen. Estos factores se asocian con la RNA polimerasa poco después de la iniciación y ayudan a las polimerasas a avanzar a través de la gran variedad de secuencias de DNA que se encuentran en los genes. A medida que se desplazan a lo largo de la secuencia molde de DNA, las RNA polimerasas eucariotas también tienen que interactuar

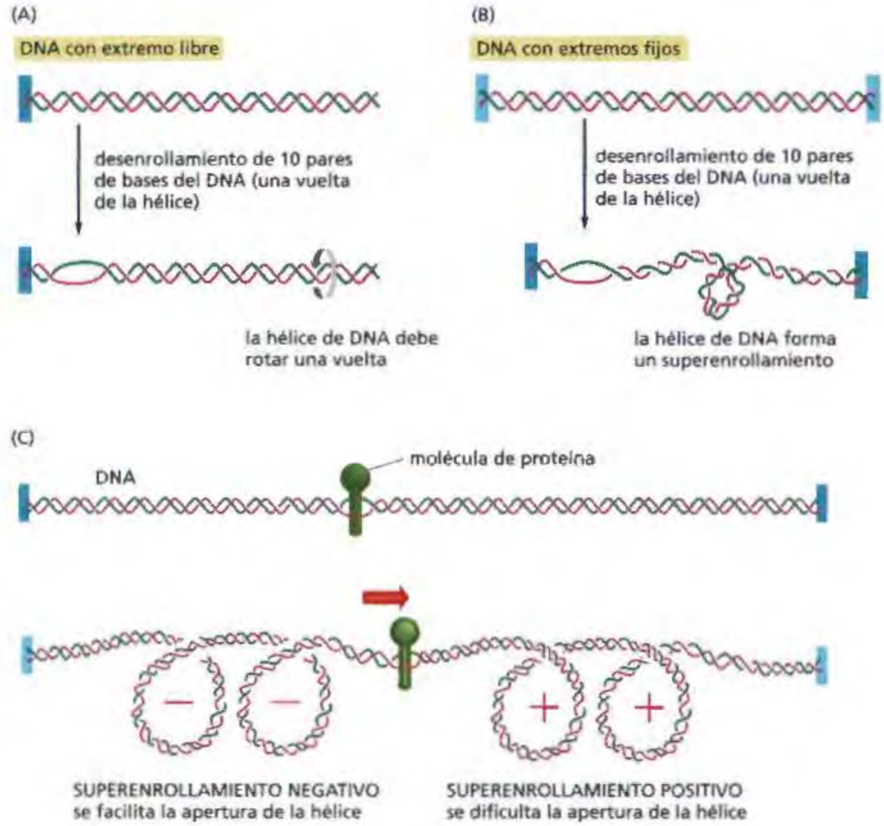
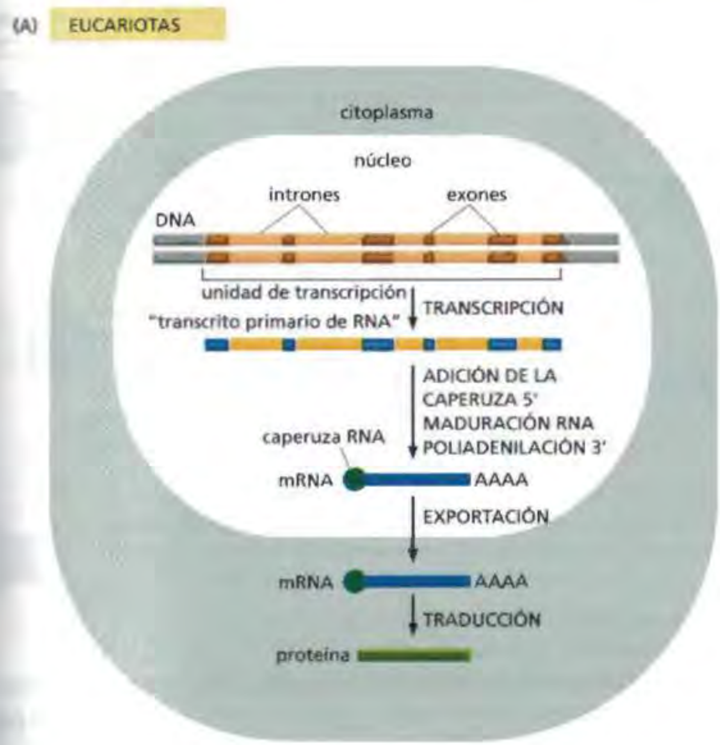


Figura 6–20 Tensión superhelicoidal del DNA causada por el superenrollamiento del DNA. (A) En una molécula de DNA con un extremo libre (o un corte en una de las cadenas que actúe como un torniquete), la doble hélice de DNA sufre una rotación por cada 10 pares de nucleótidos abiertos. (B) Si se evita esta rotación, se introduce en el DNA una tensión superhelicoidal al intentar abrir la doble hélice. Una manera de asumir esta tensión sería incrementar la rotación helicoidal de 10 a 11 pares de nucleótidos por vuelta de la doble hélice; sin embargo, la hélice de DNA resiste mal esta deformación y tiende a aliviar la tensión superhelicoidal plegándose en lazos superenrollados. Como resultado de ello, se forma un superenrollamiento de la doble hélice de DNA cada 10 pares de nucleótidos abiertos. En este caso, el superenrollamiento formado tiene signo positivo. (C) El superenrollamiento del DNA se induce por una proteína que avanza a lo largo de la doble hélice. Los dos extremos del DNA mostrado en la figura son incapaces de rotar libremente uno respecto del otro y la molécula de proteína tampoco puede rotar libremente mientras avanza. Bajo estas condiciones, el desplazamiento de la proteína genera un exceso de hélices en el DNA por delante de la proteína y un déficit de hélices por detrás de la posición de la proteína en el DNA, tal como se muestra.

con la estructura de la cromatina, típicamente ayudadas por complejos remodelantes de cromatina dependientes de ATP (véase pp. 215–216). Estos complejos pueden desplazarse con la polimerasa o pueden limitarse a buscar y rescatar las moléculas de polimerasa que ocasionalmente puedan haberse atascado. Además, algunos factores de elongación asociados con la RNA polimerasa eucariota facilitan la transcripción a través de los nucleosomas sin necesidad de energía adicional. Todavía no conocemos con detalle cómo se consigue, pero estas proteínas pueden transitoriamente desplazar los dímeros H2A-H2B de la zona central del nucleosoma reemplazándolos a medida que la polimerasa se desplaza través del DNA del nucleosoma.

Las polimerasas tanto bacterianas como eucariotas deben salvar otra dificultad durante la elongación. Para tratar este aspecto primero hemos de considerar una propiedad sutil inherente a la doble hélice de DNA denominada **superenrollamiento del DNA**. El superenrollamiento del DNA representa una conformación que adopta el DNA en respuesta a una tensión superhelicoidal; recíprocamente, la generación de varios lazos o enrollamientos de la hélice puede crear esa tensión. En la **Figura 6–20,** se ilustra una manera sencilla de visualizar las limitaciones topológicas que provocan el superenrollamiento del DNA. Cada vuelta de la doble hélice de DNA tiene unos 10 pares de nucleótidos. Imaginemos una hélice cuyos dos extremos estén fijos uno respecto del otro (como ocurre en un DNA circular, como el cromosoma bacteriano, o en un lazo fijado con fuerza como se cree que existen en los cromosomas eucariotas). En este caso, cada 10 nucleótidos que se desenrollen se formará un gran lazo de DNA superenrollado para compensar la tensión generada. La formación de este superenrollamiento es energéticamente favorable porque restablece el giro normal de la hélices de las regiones apareadas restantes que, de no ser así, tendrían que sobrecompactarse ya que sus extremos no tienen libertad de giro.

Cuando la RNA polimerasa avanza a lo largo de un segmento de DNA anclado a ambos extremos también genera tensión superhelicoidal (véase Figura 6–20C). Si la RNA polimerasa no puede rotar rápidamente (esta rotación es muy poco probable dado el tamaño de las RNA polimerasas y el transcrito que tiene unido), el desplazamiento de una RNA polimerasa a lo largo del DNA generará una tensión superhelicoidal positiva en el DNA por delante del punto en que se encuentra y una tensión helicoidal negativa por detrás de él. Parece que en los eucariotas esta situación aporta una ventaja: la tensión superhelicoidal positiva generada por delante de la polimerasa dificulta la apertura de la hélice de DNA, pero esta tensión de-



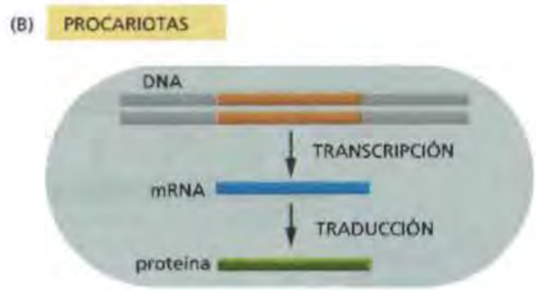


Figura 6–21 Resumen de los pasos que llevan del gen a la proteína en eucariotas y en bacterias. La cantidad final de una proteína en una célula depende de la eficiencia de cada uno de los pasos de síntesis y de la tasa de degradación de las moléculas de RNA y de proteína. (A) En las células eucariotas, la molécula de RNA resultante de la transcripción contiene tanto secuencias codificadoras (exones) como no codificadoras (intrones). Antes de que se pueda traducir a proteína, se tienen que modificar los dos extremos del RNA, se tienen que eliminar los intrones mediante una reacción de maduración (ayuste) catalizada enzimáticamente y el mRNA resultante debe ser exportado desde el núcleo al citoplasma. Aunque en la figura los pasos se representan de uno en uno, siguiendo una secuencia, en realidad, pueden tener lugar de forma simultánea. Por ejemplo, la adición de la caperuza y el ayuste suele iniciarse antes de que se haya completado la transcripción. Debido al acoplamiento entre los fenómenos de transcripción y del procesamiento del RNA, se encuentran muy pocas veces transcritos primarios –los RNA que en teoría se hubieran producido si no se hubiese producido el procesamiento. (B) En procariotas, la producción del mRNA es mucho más sencilla. El inicio de la transcripción genera el extremo 5' de una molécula de mRNA y el final de la transcripción genera el extremo 3'. Dado que las células procariotas carecen de núcleo, la transcripción y la traducción tienen lugar en el mismo compartimiento. De hecho, a menudo la traducción de un mRNA bacteriano comienza antes de que su síntesis se haya completado.

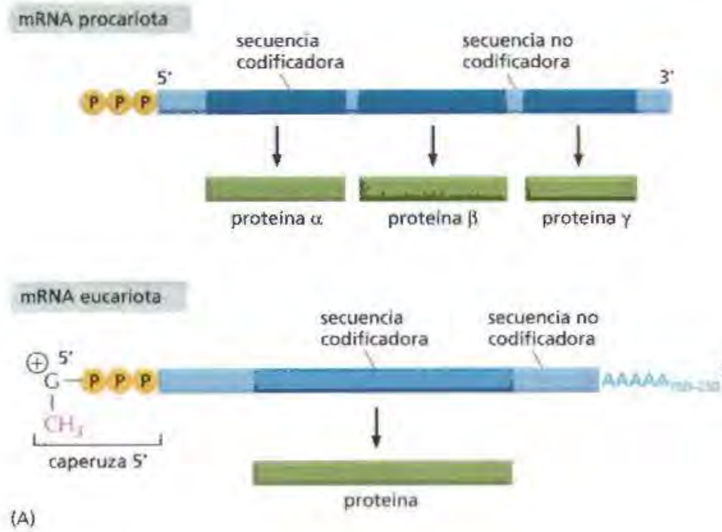
facilitar la desorganización de los nucleosomas, ya que la liberación del DNA del núcleo de histonas ayuda a relajar la tensión superhelicoidal positiva.

Cualquier proteína que se impulsa a sí misma a lo largo de un fragmento de la doble hélice de DNA tiende a generar una tensión superhelicoidal. En células eucariotas, las topoisomerasas de DNA eliminan con rapida esta tensión superhelicoidal (véase p. 278). Pero en bacterias, una topoisomerasa específica, llamada *DNA girasa*, utiliza la energía de la hidrólisis del ATP para generar continuamente superhélices en el DNA y mantener el DNA bajo una tensión constante. Se trata de *superhélices negativas*, con un sentido de giro opuesto al de las *superhélices positivas* que se generan en una región al abrirse la molécula de DNA (véase la Figura 6–20B). Cuando una región de la hélice se abre, elimina del DNA bacteriano estas superhélices y reduce así la tensión superhelicoidal. La DNA girasa consigue de esta forma que la apertura de la hélice de DNA sea energéticamente favorable, comparada con la apertura de una hélice que no esté superenrollada. Por esta razón, esta enzima facilita aquellos procesos genéticos de las bacterias, incluyendo el inicio de la transcripción por la RNA polimerasa bacteriana, que requieren la apertura de la hélice (véase la Figura 6–11).

La elongación de la transcripción en eucariotas está estrechamente acoplada al procesamiento del RNA

En bacterias, la síntesis de mRNA depende de que la RNA polimerasa empiece y acabe de funcionar en unos puntos específicos del genoma. La situación en eucariotas es sustancialmente diferente. En particular, la transcripción sólo es el primer paso de una serie de varias etapas necesarias para producir un mRNA. Otras etapas críticas son la modificación covalente de los extremos del RNA y la eliminación de las *secuencias intrónicas* que son escindidas del transcrito de RNA por el proceso conocido como *maduración por corte y empalme del RNA* (o *ayuste*; en inglés, *splicing*) (**Figura 6–21**).

Los dos extremos del mRNA eucariota son modificados: por la adición de una *caperuza* en el extremo 5' y por la *poliadenilación* del extremo 3' (**Figura 6–22**). Estos extremos modificados permiten a la célula asegurarse de que están presentes ambos extremos de la molécula de mRNA (y, por tanto, que el mensaje está intacto) antes de exportar la secuencia de RNA del núcleo al citosol para su traducción a proteína. La maduración del RNA acerca diferentes zonas de la secuencia que codifican una proteína y ofrece a los eucariotas superiores la capacidad de sintetizar diferentes proteínas a partir de un mismo gen.



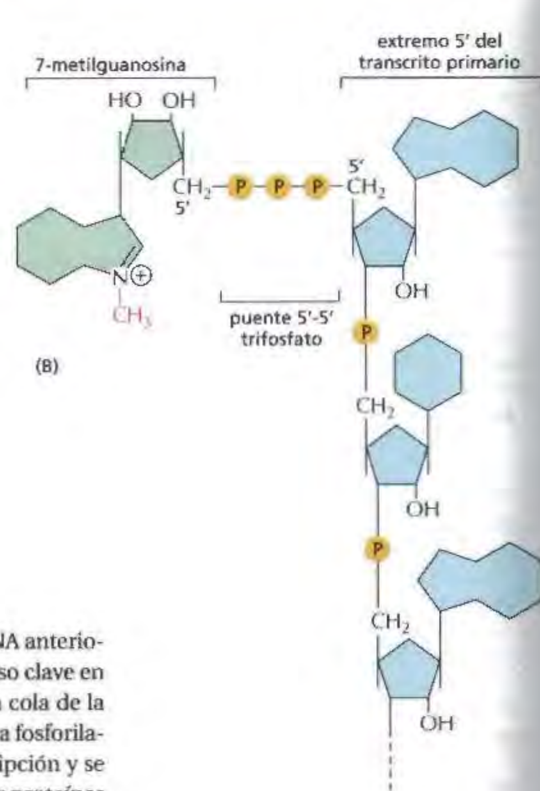


Figura 6–22 Comparación de las estructuras de las moléculas de mRNA procariotas y eucariotas. (A) Los extremos 5' y 3' de un mRNA bacteriano no presentan modificación alguna y se corresponden con los extremos de la molécula generados por la RNA polimerasa, que inicia y termina, respectivamente, la transcripción en estos puntos. Los extremos correspondientes de una molécula de mRNA eucariota se forman mediante la adición de una caperuza 5', la escisión del transcrito de pre-mRNA y la adición de una cola de poli-A, respectivamente. La figura también ilustra otra diferencia entre los mRNA procariotas y eucariotas: los mRNA bacterianos pueden contener las instrucciones para fabricar varias proteínas diferentes, mientras que los eucariotas prácticamente siempre contienen la información de una única proteína. (B) Estructura de la caperuza de los extremos 5' de las moléculas de mRNA eucariotas. Hay que destacar la inusual unión 5'-5' de la 7-metil-G al resto del RNA. Muchos mRNA eucariotas contienen una segunda modificación adicional: el grupo 2'-hidroxilo de la segunda unidad de ribosa del mRNA está metilado (no se muestra en la figura).

Un ingenioso mecanismo acopla todos los procesos de procesamiento del RNA anteriores a la elongación de la transcripción. Como se describió con anterioridad, un paso clave en la iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa II es la fosforilación de la cola de la RNA polimerasa II, llamada el CTD (***C-terminal domain:*** dominio C-terminal). Esta fosforilación se produce gradualmente a medida que la RNA polimerasa inicia la transcripción y se desplaza a lo largo del DNA. No sólo ayuda a disociar la RNA polimerasa II de otras proteínas presentes en el punto de inicio de la transcripción, sino que también permite que se asocien una nueva serie de proteínas a la cola de la RNA polimerasa que participan en la elongación de la transcripción y en el procesamiento del RNA. Como expondremos a continuación, algunas de estas proteínas parecen "saltar" de la cola de la polimerasa a la molécula naciente de RNA y empezar a procesarla en cuanto emerge de la RNA polimerasa. Así, podemos considerar la RNA polimerasa II en su modo de elongación como una factoría de RNA, que transcribe el DNA a RNA y procesa el RNA que está fabricando (**Figura 6–23**). Completamente extendido, el CTD es cerca de 10 veces más largo que el resto de la RNA polimerasa y, en efecto, actúa como correa, uniendo varias proteínas y acercándolas todo lo necesario. Esta estrategia, que acelera la velocidad de las reacciones siguientes, se observa por lo general en la célula (véanse Figuras 4–69 y 16–38).

La adición de la caperuza es la primera modificación de los pre-mRNA eucariotas

Una vez la RNA polimerasa II ha sintetizado, aproximadamente, los primeros 25 nucleótidos del RNA, el extremo 5' de la nueva molécula de RNA se modifica mediante la adición de una "caperuza" o "cap" que consiste en un nucleótido de guanina modificado (véase la Figura 6–22B). La adición de la caperuza la llevan a cabo tres enzimas que actúan de forma sucesiva: una de ellas (una fosfatasa) elimina un grupo fosfato del extremo 5' del RNA naciente, otra (una guanil transferasa) añade un GMP mediante un enlace poco común (5'-5', en vez del enlace 5'-3' habitual) y la tercera (una metil transferasa) añade un grupo metilo a la guanosina (**Figura 6–24**). Dado que estas tres enzimas se unen a la cola fosforilada de la RNA polimerasa en la posición de la serina 5, la modificación añadida por TFIIH durante la iniciación de la transcripción, están situadas de forma óptima para modificar el extremo 5' del transcrito naciente en cuanto emerge de la polimerasa.

La caperuza 5' metilada indica cuál es el extremo 5' de los mRNA eucariotas y ayuda a la célula a distinguir los mRNA de otros tipos de moléculas de RNA presentes. Por ejemplo, las RNA polimerasas I y III fabrican moléculas de RNA a las que no se les añade la caperuza durante la transcripción, en parte porque estas polimerasas carecen de CTD. En el núcleo, la caperuza se une a un complejo proteico llamado CBC (***cap-binding complex:*** complejo de unión a la caperuza) que, como se expondrá más adelante, ayuda al RNA a ser procesado correctamente y exportado. La caperuza 5' metilada también tiene un papel importante en la traducción de los mRNA en el citosol, como veremos más adelante en este mismo capítulo.

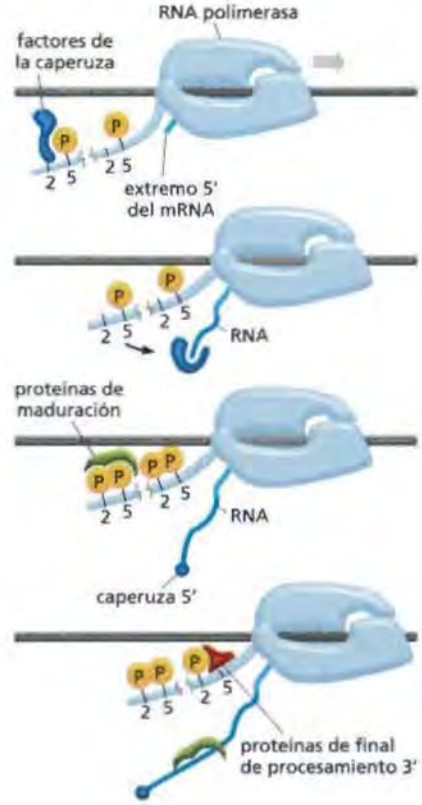


Figura 6–23 La RNA polimerasa II como una "fábrica de RNA". A medida que la polimerasa transcribe el DNA a RNA, transporta proteínas procesadoras del pre-mRNA unidas a su cola, que van siendo transferidas al RNA naciente en el momento adecuado. La cola, conocida como CTM, contiene 52 repeticiones en tándem de secuencias de siete aminoácidos, con dos serinas en cada repetición. Las proteínas de la caperuza primero se unen a la cola de la mRNA polimerasa cuando está fosforilada en las Ser5 de las siete repeticiones, al final del proceso de inicio de la transcripción (véase la Figura 6–16). Esta estrategia garantiza que se coloque a la molécula de RNA la caperuza de forma eficiente antes de que el extremo 5' terminal emerja desde la RNA polimerasa. A medida que la polimerasa continúa transcribiendo, las colas son fosforiladas en las posiciones Ser2 por quinasas asociadas a polimerasas de elongación y finalmente desfosforiladas en las posiciones Ser5. Estas modificaciones posteriores atraen proteínas de maduración y de final de procesamiento 3' hacia la polimerasa que se está desplazando, y se colocan para actuar sobre la cadena de RNA acabada de sintetizar a medida que emerge de la RNA polimerasa. Existen muchas enzimas que procesan el RNA y no todas ellas viajan con la polimerasa. Por ejemplo, para la maduración de RNA, la cola sólo transporta algunos componentes críticos; cuando se han transferido a la molécula de RNA, actúan como lugares de nucleación del resto de componentes.

Cuando la RNA polimerasa acaba de transcribir un gen, se libera del DNA, algunas fosfatasas solubles eliminan los fosfatos de su cola, y puede volver a iniciar la transcripción. Únicamente las formas desfosforiladas de la RNA polimerasa II son competentes para empezar la síntesis de RNA en un promotor.

La maduración del RNA elimina los intrones de los pre-mRNA recién transcritos

Como se indicó en el Capítulo 4, las secuencias codificadoras de proteínas de los genes eucariotas suelen estar interrumpidas por secuencias no codificadoras (intrones). Esta característica de los genes eucariotas, descubierta en 1977, sorprendió a los científicos que hasta este momento se habían familiarizado con los genes bacterianos, que consisten en segmentos continuos de DNA codificador directamente transcritos a mRNA. Muy al contrario, los genes eucariotas están divididos en pequeños fragmentos de secuencia codificadora (*secuencias expresadas* o **exones**), separadas por otras secuencias mucho más largas, las denominadas *secuencias intercaladas* o **intrones**. Por lo tanto, la secuencia que realmente codifica un gen eucariota suele representar sólo una pequeña fracción de la longitud total del gen (Figura 6-25).

Tanto los intrones como los exones son transcritos a RNA. Los intrones tienen que ser eliminados de la molécula de RNA recién sintetizada mediante un proceso conocido como **maduración por corte y empalme del RNA** o **ayuste del RNA** (*RNA splicing*). La inmensa mayoría de las reacciones de ayuste que tienen lugar en las células se realizan sobre moléculas de RNA, por lo que la descripción se centrará en este tipo de moléculas. A veces se suele denominar maduración de precursores de mRNA (o pre-mRNA). Sólo después de haber tenido lugar los procesamientos de los extremos 5' y 3' y la maduración por corte y empalme, el pre-mRNA se denomina mRNA.

En cada reacción de maduración o ayuste se elimina un intrón, mediante dos reacciones consecutivas de transferencia de un grupo fosforilo conocidas como transesterificaciones. Este proceso une dos exones y elimina el intrón en forma de lazo (**Figura 6–26**). El número de enlaces fosfato de alta energía permanece constante, por lo que, en principio, estas reacciones podrían tener lugar sin la rotura de nucleósidos trifosfato. Sin embargo, la maquinaria que cataliza la maduración del pre-mRNA es compleja –consta de 5 moléculas adicionales de RNA y más de 200 proteínas– e hidroliza muchas moléculas de ATP en cada reacción de maduración. Probablemente esta complejidad adicional asegure que la maduración se realiza con precisión, pero que a la vez sea lo bastante flexible como para reconocer la enorme variedad de intrones que se encuentran en una célula eucariota.

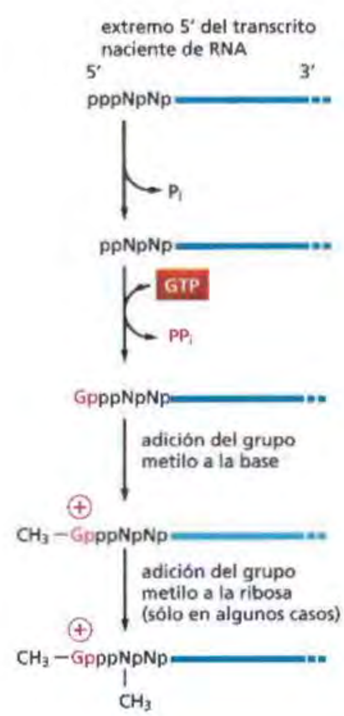


Figura 6–24 Reacciones de adición de la caperuza al extremo 5' de cada molécula de RNA sintetizada por la RNA polimerasa II. La caperuza se une mediante un nuevo enlace 5'-5' establecido entre el residuo 7-metilguanosina, que está cargado positivamente, y el extremo 5' del transcrito de RNA (véase la Figura 6-22B). La letra N representa cualquiera de los cuatro ribonucleótidos, aunque el primer nucleótido de la cadena de RNA suele ser una purina (una A o una G). (Adaptado de A.J. Shatkin, *BioEssays* 7:275–277, 1987. Con la autorización de ICSU Press.)

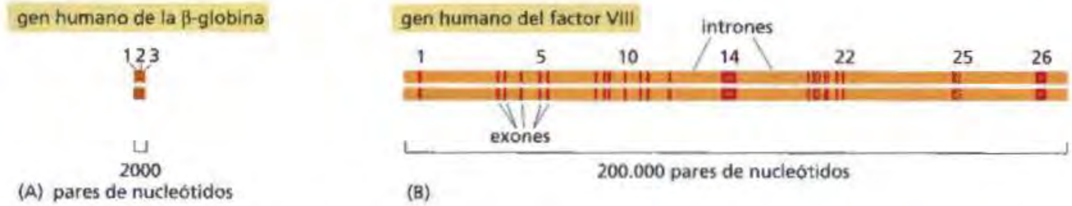


Figura 6–25 Estructura de dos genes humanos mostrando la disposición de los exones y los intrones. (A) El gen de la β-globina, relativamente pequeño, que codifica una de las subunidades de la proteína transportadora de oxígeno, la hemoglobina, tiene 3 exones (véase también la Figura 4–7). (B) El gen del factor VIII, mucho mayor, tiene 26 exones; codifica una proteína (el factor VIII) que participa en el proceso de coagulación de la sangre. La forma más frecuente de hemofilia es el resultado de mutaciones de este gen.

El hecho de eliminar tantos intrones durante la maduración del RNA parece un derroche para la célula. Para intentar explicar la razón de este fenómeno, los científicos han destacado que la organización en exones-intrones facilita la aparición de nuevas proteínas útiles para la célula a escalas evolutivas de tiempo. Así, la presencia de numerosos intrones en el DNA posibilita que mediante la recombinación genética se combinen fácilmente los exones de los diferentes genes (véase p. 140), permitiendo así, mediante la combinación de partes de genes preexistentes, que evolucionen con mayor frecuencia genes que codifican nuevas proteínas. La observación, descrita en el Capítulo 3, de que muchas proteínas de las células actuales parecen confeccionadas a partir de un conjunto de piezas proteicas comunes, llamadas *dominios proteicos*, refuerza esta idea.

La maduración del RNA también ofrece otra gran ventaja. Los transcritos de muchos genes eucariotas (en los genes humanos se estima que un 75%) pueden madurar de más de una forma, lo que permite que un mismo gen produzca un juego de proteínas diferentes (**Figura 6–27**). En lugar de ser el proceso derrochador que podría parecer en un principio, la maduración del RNA permite a los eucariotas incrementar el ya de por sí enorme potencial codificador de sus genomas. Volveremos de nuevo sobre esta idea en este capítulo y en el siguiente, pero primero hemos de describir la maquinaria celular que desarrolla esta notable tarea.

La secuencia de nucleótidos indica dónde se tiene que producir el corte

El mecanismo de maduración del pre-mRNA, mostrado en la Figura 6–26, implica que la maquinaria de maduración debe reconocer tres porciones de la molécula precursora de RNA: el lugar de rotura 5', el lugar de rotura 3' y el punto de ramificación en la secuencia del intrón que forma la base del lazo eliminado. No es de extrañar que cada lugar tenga una secuencia

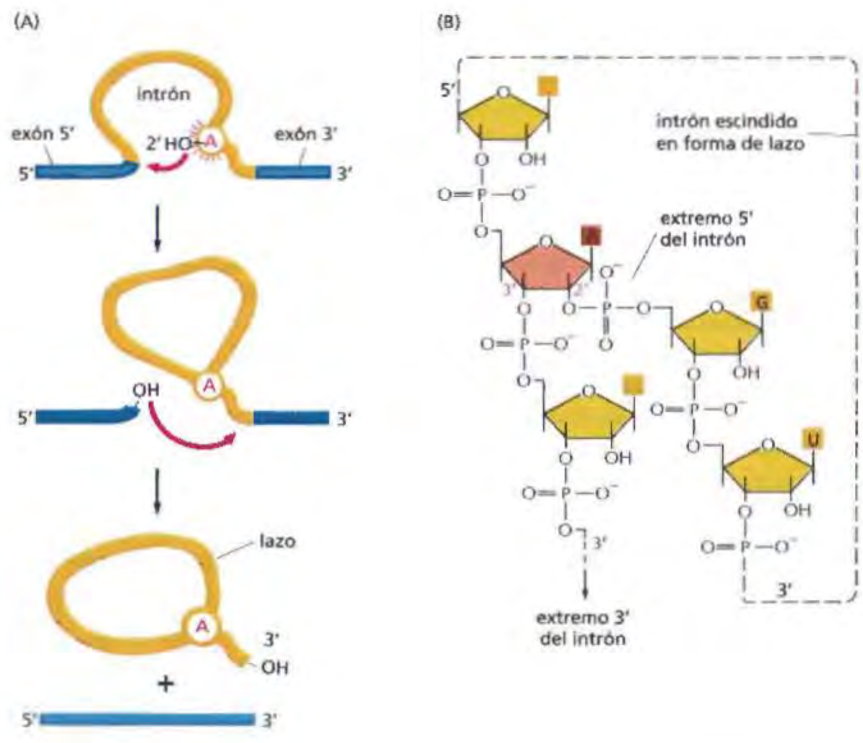


Figura 6–26 Reacción de maduración (ayuste) del pre-mRNA. (A) En el primer paso, un nucleótido de adenina específico de la secuencia del intrón (indicado en *rojo*) ataca el sitio 5' de maduración y corta el esqueleto de azúcar-fosfato del RNA en este punto. El extremo 5' del intrón se une covalentemente al nucleótido de adenina, como se muestra en detalle en (B), generando así un lazo en la molécula de RNA. El extremo 3'-OH libre de la secuencia del exón reacciona con el inicio del exón siguiente, de forma que ambos exones se unen y el intrón se libera en forma de *lazo*. Así, los dos exones quedan unidos formando una secuencia codificadora continua; el intrón liberado será degradado posteriormente.

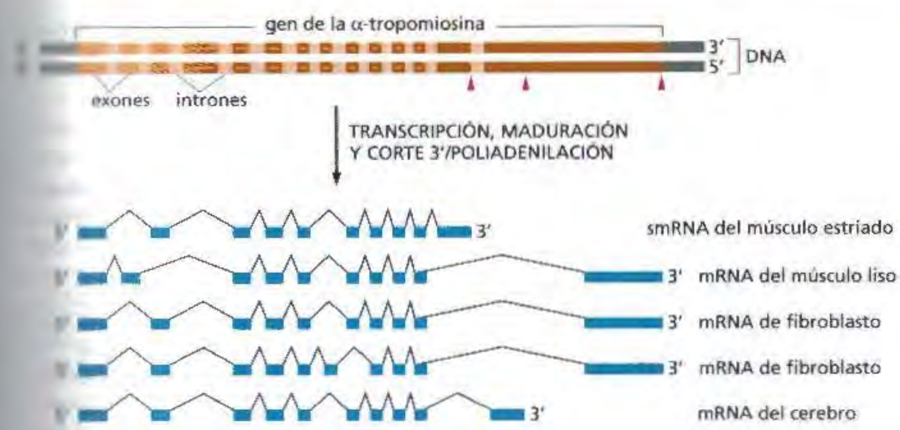


Figura 6–27 Maduración alternativa del gen de la α-tropomiosina de rata. La α-tropomiosina es una proteína sobreenrollada (véase la Figura 3–9) que regula la contracción en las células musculares. El transcrito primario puede ser procesado de diversas maneras, como se indica en la figura, dando lugar a distintos mRNA que, a su vez, originarán proteínas diferentes. Algunos de los patrones de maduración son específicos de ciertos tipos celulares. Por ejemplo, la α-tropomiosina de la musculatura estriada es diferente de la que se obtiene, a partir del mismo gen, en la musculatura lisa. Las puntas de flecha de la parte superior de la figura indican los sitios en los que se puede escindir el RNA y se puede añadir la cola de poli-A al extremo 3' de los RNA maduros.

consenso de nucleótidos similar a la de los otros intrones y que proporcione a la célula señales respecto a dónde se está produciendo la maduración (**Figura 6–28**). Sin embargo, estas secuencias consenso son bastante cortas y pueden acomodar un elevado grado de variabilidad. Como veremos en seguida, la célula incorpora otros tipos de información para acabar estableciendo exactamente dónde se debe producir la maduración de cada molécula de RNA.

La elevada variabilidad de las secuencias consenso de maduración supone un reto especial para los científicos que intentan descifrar las secuencias del genoma. Los intrones tienen un tamaño que varía de 10 a más de 100.000 nucleótidos y resulta muy difícil determinar los límites precisos de un intrón, incluso con la ayuda de potentes ordenadores. La posibilidad de que existan maduraciones alternativas complica todavía más el problema de predecir las secuencias proteicas exclusivamente a partir de las secuencias genómicas. Esta dificultad constituye una de las principales barreras para identificar todos los genes de una secuencia genómica completa y es la razón principal por la que sólo conocemos el número aproximado de genes del genoma humano.

El espliceosoma lleva a cabo la maduración (splicing) del RNA

A diferencia de los otros pasos de la síntesis del mRNA tratados hasta ahora, las etapas clave de la maduración del RNA no se producen por proteínas sino principalmente por moléculas de RNA. Determinadas moléculas especializadas de RNA reconocen las secuencias de nucleótidos que determinan dónde se debe producir la maduración y también participan en los procesos de la reacción de maduración. Estas moléculas de RNA son relativamente cortas (menos de 200 nucleótidos cada una) y se conocen cinco de ellas (U1, U2, U4, U5 y U6) implicadas en la vía principal de maduración de mRNA. Conocidas como **snRNA o RNA nucleares pequeños** (*small nuclear RNA*), cada una de ellas forma un complejo con al menos siete subunidades proteicas formando una snRNP o ribonucleoproteína nuclear pequeña (*small nuclear ribonucleoprotein*). Estas snRNP constituyen el núcleo del **espliceosoma**, un gran complejo de RNA y proteínas que lleva a cabo la maduración (en inglés, *splicing*) del pre-mRNA en las células.

El espliceosoma es una máquina dinámica y compleja. Cuando se estudia *in vitro* algunos componentes del espliceosoma se ensamblan sobre el pre-mRNA y, a medida que la

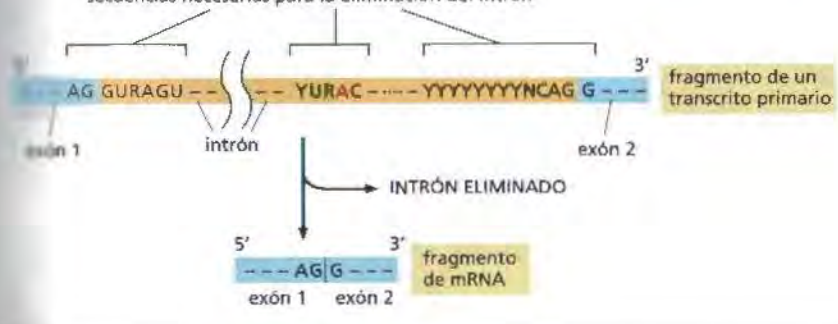
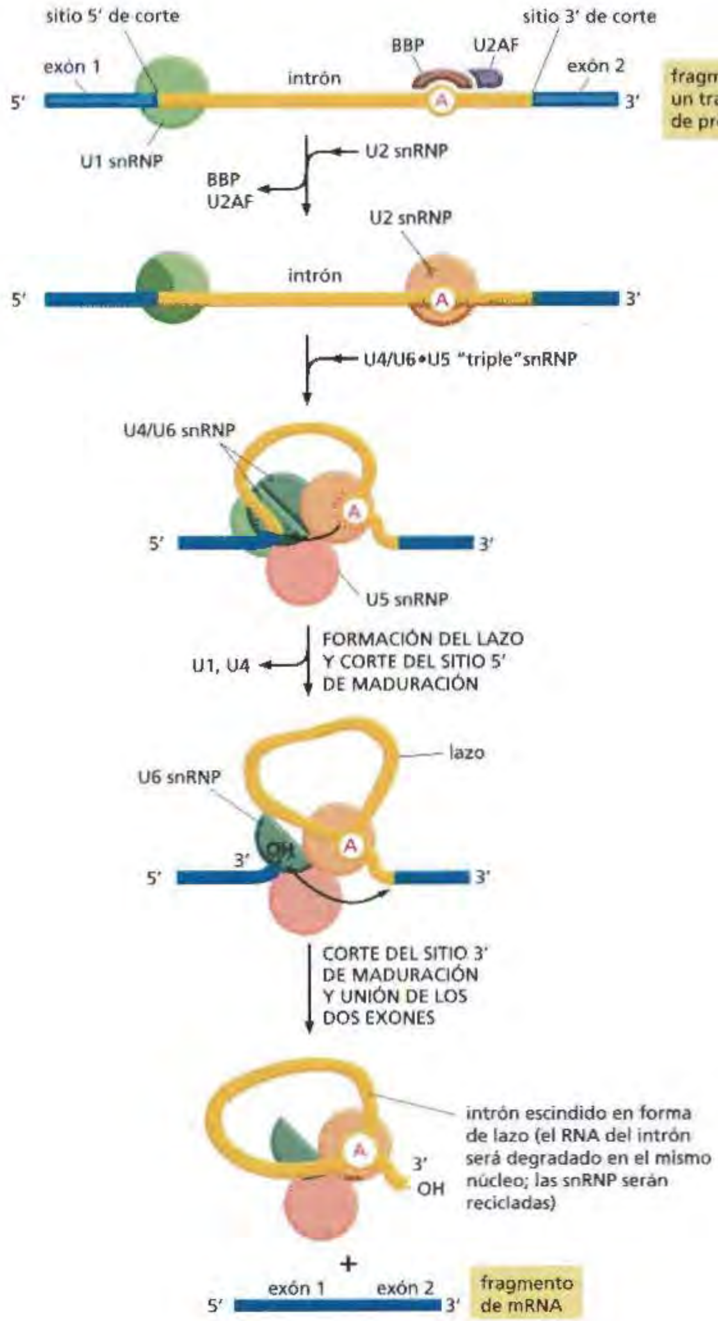


Figura 6–28 Secuencias consenso de nucleótidos de una molécula de RNA que indican el inicio y el final de la mayoría de los intrones en los seres humanos. Sólo se requieren los tres bloques de secuencias indicados para eliminar el intrón; el resto de la secuencia del intrón puede estar ocupado por cualquier nucleótido. A, G, U y C representan los nucleótidos estándar del RNA; R representa purinas (A o G); Y representa pirimidinas (C o U). La A destacada en *rojo* constituye el punto de ramificación del lazo que se origina durante la maduración. Los únicos nucleótidos que se conservan totalmente en las secuencias de corte son la secuencia GU al inicio del intrón y la secuencia AG al final del mismo. Las demás posiciones (incluso la A del punto de ramificación) pueden ser ocupadas por diversos nucleótidos, aunque los que se indican parecen ser los preferidos. La distancia que separa las tres secuencias consenso en el RNA puede ser muy variable; sin embargo, la distancia entre el punto de ramificación y el sitio 3' de corte suele ser mucho más corta que la distancia entre el sitio 5' de corte y el punto de ramificación.

reacción de maduración progresa, van entrando más componentes como el que elimina lastre para poder "despegar" (**Figura 6–29**). Sin embargo, muchos científicos creen que, dentro de la célula, el espliceosoma está en forma de ensamblaje laxo de todos los componentes que captura, hace madurar y libera RNA como una unidad coordinada, sufriendo reordenamientos generales cada vez que produce en proceso de maduración. Durante la reacción, el reconocimiento de los sitios de corte 5' y 3' y del punto de ramificación se lleva a cabo fundamentalmente por el apareamiento de bases entre los snRNA y las secuencias consenso del pre-mRNA sustrato (**Figura 6–30**). En el transcurso de la maduración, el espliceosoma pasa por varios procesos en los que se rompe un conjunto de interacciones entre bases y se forma otro nuevo en su lugar. Por ejemplo, el snRNA U1 es reemplazado por el snRNA U6 en el sitio 5' de maduración (véase la Figura 6–30A). Este tipo de reordenamientos RNA-RNA (en los que la formación de una interacción RNA-RNA requiere la rotura de otra) sucede varias veces durante la reacción de maduración. Permite comprobar y recomprobar las secuencias de RNA, antes de que se permita proceder a la reacción química, e incrementar de esta forma la precisión del proceso de maduración.

Figura 6–29 Mecanismo de maduración del pre-mRNA. La maduración del RNA está catalizada por un conjunto de snRNP (*círculos coloreados*) y otras proteínas (de las cuales la mayoría no se muestra) que, en conjunto, constituyen el espliceosoma. El espliceosoma reconoce las señales de corte de una molécula de pre-mRNA, aproxima los dos extremos del intrón y aporta la actividad enzimática que cataliza los dos pasos de la reacción (véase la Figura 6–26).



El snRPN U1 se aparea en el sitio de maduración 5' (véase la Figura 6–30A) y el lugar de ramificación es reconocido por la proteína de unión al lugar de ramificación o BBP (*branch-point binding protein*) y la U2AF o factor auxiliar U2 (*U2 auxilliary factor*).

La snRNP U2 desplaza a la BBP y la U2AF y se aparea con la secuencia consenso del lugar de ramificación (véase la Figura 6–30B).

La snRNP "triple" U4/U6•U5 entra en la reacción. En esta triple snRNP, los snRNA U4 y U6 se mantienen unidos entre sí por apareamiento de bases. Las reordenaciones subsiguientes generan el centro activo del espliceosoma y sitúan en la posición adecuada las regiones concretas del pre-mRNA sustrato para que tenga lugar la primera reacción fosforil transferasa.

Cuando se rompen las uniones de bases U4/U6 se producen algunas reordenaciones RNA-RNA más; este hecho permite el desplazamiento de U1 en el sitio 5' de corte (véase la Figura 6-30A) y la formación del lugar activo del espliceosoma para la primera reacción fosforil transferasa, lo que completa la maduración.

El espliceosoma utiliza la hidrólisis del ATP para provocar una compleja serie de reordenamientos RNA-RNA

Aunque no se requiere la hidrólisis del ATP para los procesos químicos de la maduración del RNA *per se*, sí que se requiere para el ensamblaje y las reordenaciones del espliceosoma. Algunas de las proteínas adicionales del espliceosoma utilizan la hidrólisis del ATP para romper las interacciones RNA-RNA existentes y permitir así la formación de otras nuevas. De hecho, todos los pasos que se muestran en la Figura 6–29 –excepto la asociación de la BBP con el punto de ramificación y de la snRNP U1 con el sitio 5' de maduración– requieren la hidrólisis de ATP y la participación de proteínas adicionales. Cada reacción de maduración requiere más de 200 proteínas, si contamos las que forman parte de las snRNP.

Las reordenaciones RNA-RNA del espliceosoma que requieren ATP tienen lugar en las propias snRNP y entre las snRNP y el pre-mRNA sustrato. Una de las funciones más importantes de estas reordenaciones es la generación del centro catalítico activo del espliceosoma. La estrategia de generar el centro activo sólo cuando ya se han ensamblado todos los componentes de la maduración sobre el pre-mRNA sustrato es una manera muy efectiva de prevenir una maduración descontrolada.

Quizá la característica más sorprendente del espliceosoma sea la naturaleza de su centro catalítico: está formado principalmente (si no exclusivamente) por moléculas de RNA en lugar de moléculas de proteína. En la última sección de este capítulo describiremos en términos generales cuáles son las propiedades estructurales y químicas del RNA que le permiten realizar una catálisis; por el momento, basta con tener en cuenta que los snRNA U2 y U6 del espliceosoma forman una precisa estructura tridimensional de RNA que yuxtapone el sitio 5' de maduración del pre-mRNA con el sitio de ramificación y probablemente realiza la primera reacción de transesterificación (véase la Figura 6–30C). De manera similar, los sitios 5' y 3' de maduración se aproximan uno a otro (mediante un proceso en el que interviene el snRNA U5) y facilitan la segunda transesterificación.

Cuando se ha completado la reacción química de la maduración, las snRNP permanecen unidas al lazo. El desensamblaje de estas snRNP del lazo (y entre ellas mismas) requiere

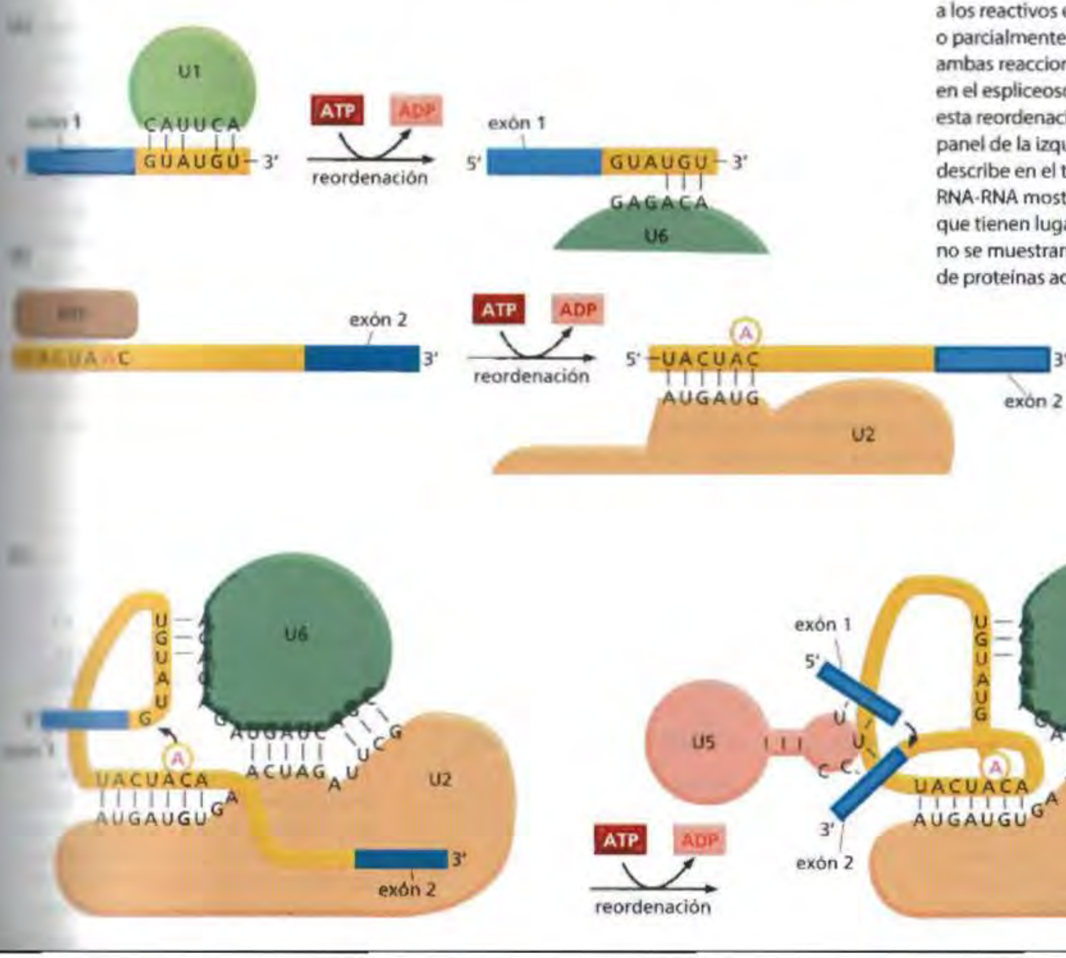


Figura 6–30 Algunos de las reordenaciones que tienen lugar en el espliceosoma durante la maduración del pre-mRNA. Se muestran los detalles del espliceosoma de *Saccharomyces cerevisiae*, en el que las secuencias secuencias de nucleótidos implicadas son ligeramente diferentes de las de las células humanas. (A) La sustitución de la snRNP U1 por la snRNP U6 tiene lugar antes de que ocurra la primera reacción de transfosforilación (véase la Figura 6–29). Este intercambio necesita que el sitio 5' de corte sea leído por dos snRNP diferentes, para incrementar así la precisión de la selección del sitio 5' por parte del espliceosoma. (B) El lugar de ramificación es reconocido primero por la BBP y, posteriormente, por la snRNP U2; como en (A), esta estrategia de comprobación y recomprobación incrementa la precisión de la selección del lugar correcto. La unión de U2 al lugar de ramificación obliga al desapareamiento de la adenina apropiada (en *rojo*), con lo que se activa e inicia el ataque al sitio 5' de maduración (véase la Figura 6–29). Junto con el reconocimiento previo por parte de la BBP, ésta es la forma que tiene el espliceosoma de elegir correctamente la adenina que constituirá el punto de ramificación. (C) Después de la primera reacción de transfosforilación (*izquierda*), una serie de reordenaciones aproximan los dos exones que deben ser unidos en la segunda reacción de transfosforilación (*derecha*). Las snRNP sitúan a los reactivos en posición y aportan (total o parcialmente) los lugares catalíticos de ambas reacciones. La snRNP U5 está presente en el espliceosoma antes de que tenga lugar esta reordenación; para mayor claridad, en el panel de la izquierda se ha omitido. Como se describe en el texto, todas las reordenaciones RNA-RNA mostradas en esta figura (y otras que tienen lugar en el espliceosoma pero que no se muestran) requieren la participación de proteínas adicionales y la hidrólisis de ATP.

otra serie de reordenaciones que necesitan la hidrólisis de más ATP para devolver los snRNA a su configuración original, de forma que puedan volver a ser utilizados en una nueva reacción. Cuando se ha completado la maduración, el espliceosoma dirige un juego de proteínas para que se unan a la molécula de mRNA cerca de la posición inicialmente ocupada por el intrón. Estas proteínas, denominadas *complejo de unión al exón* (*EJC*: *exon junction complex*) marcan el lugar en el que se ha producido con éxito un proceso de maduración y, como veremos más adelante en este capítulo, afecta el destino siguiente del mRNA.

Otras propiedades del pre-mRNA y de su síntesis ayudan a explicar cómo se escogen de forma correcta los sitios de maduración

El tamaño de los intrones es muy variable; alguno de ellos alcanza más de 100.000 nucleótidos. Si la selección de los puntos de maduración sólo estuviera determinada por la acción de las snRNP sobre una molécula de RNA preformada y libre de proteínas, los errores de maduración –tales como el salto de exones o la utilización de lugares de maduración crípticos– deberían ser muy habituales (**Figura 6–31**). Sin embargo, los mecanismos del espliceosoma encargados de mantener la fidelidad disponen de dos estrategias adicionales que contribuyen a asegurar que la maduración se produzca de forma adecuada. El primero de ellos es la consecuencia de las primeras etapas de la maduración que tienen lugar mientras las moléculas de pre-mRNA están siendo sintetizadas por la RNA polimerasa II. A medida que se produce la transcripción, la cola fosforilada de la RNA polimerasa transporta diversos componentes del espliceosoma (véase Figura 6–23); estos componentes son transferidos directamente desde la polimerasa al RNA a medida que éste va siendo sintetizado. Esta estrategia ayuda a la célula a mantener la huella de los intrones y de los exones: por ejemplo, los dnRNP que se ensamblan en el lugar de maduración 5' se presentan inicialmente con un solo lugar de maduración 3', ya que los lugares posteriores corriente abajo (en sentido 5' a 3') todavía no se han sintetizado. La coordinación de la transcripción con la maduración resulta en especial importante para impedir que el proceso se salte exones de forma inadecuada.

El tamaño de los exones tiende a ser mucho más uniforme que el de los intrones; su tamaño promedio en una gran variedad de organismos eucariotas es de 150 pares de nucleótidos (**Figura 6–32**). De acuerdo con la definición de la idea de exón, la maquinaria de maduración inicialmente selecciona las secuencias de los exones de tamaño relativamente homogéneo. A medida que tiene lugar la síntesis del RNA, un grupo de componentes adicionales del espliceosoma (sobre todo las proteínas SR, llamadas así porque contienen un dominio rico en serinas y argininas) se ensamblan sobre las secuencias exónicas y colaboran a marcar cada uno de los sitios de maduración 3' y 5' empezando por el extremo 5' del RNA (**Figura 6–33**). A su vez, estas proteínas reclutan snRNA U1, que señalan los límites de un exón en sentido corriente abajo (5' a 3'), y U2AF, que especifica los límites corriente arriba (3' a 5'). Marcando de forma específica los exones y, por tanto, aprovechando el tamaño relativamente uniforme de los exones, la célula incrementa la precisión con la que deposita los componentes iniciales de la maduración sobre el RNA naciente, lo cual contribuye a evitar los sitios crípticos de maduración. Todavía no entendemos en detalle de qué manera discriminan las proteínas SR las secuencias de los exones de las de los intrones; sin embargo, se sabe que algunas de las proteínas SR se unen en mayor medida a las secuencias específicas de RNA de algunos exones, denominados *activadores de maduración*. En principio, dado que ninguno de los diferentes codones puede ser usado para codificar ningún aminoácido, existe libertad para ajustar la secuencia de nucleótidos del exón para que forme lugares de unión para una proteína SR sin afectar de forma necesaria la secuencia de aminoácidos que determina el exón.

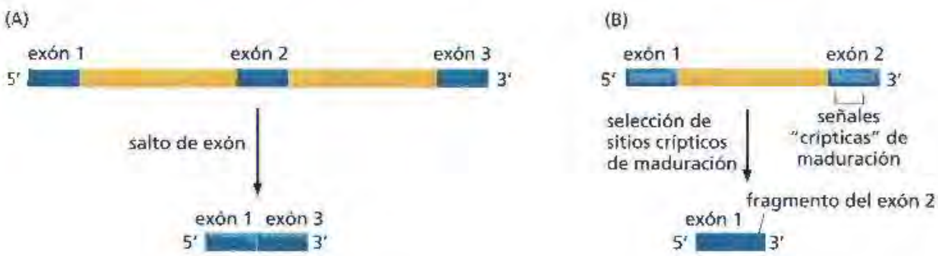


Figura 6–31 Dos tipos de errores de maduración. (A) Salto de exón. (B) Selección de sitios crípticos de maduración. Las señales "crípticas" de maduración son secuencias de nucleótidos del RNA que se asemejan mucho a las señales de maduración auténticas.

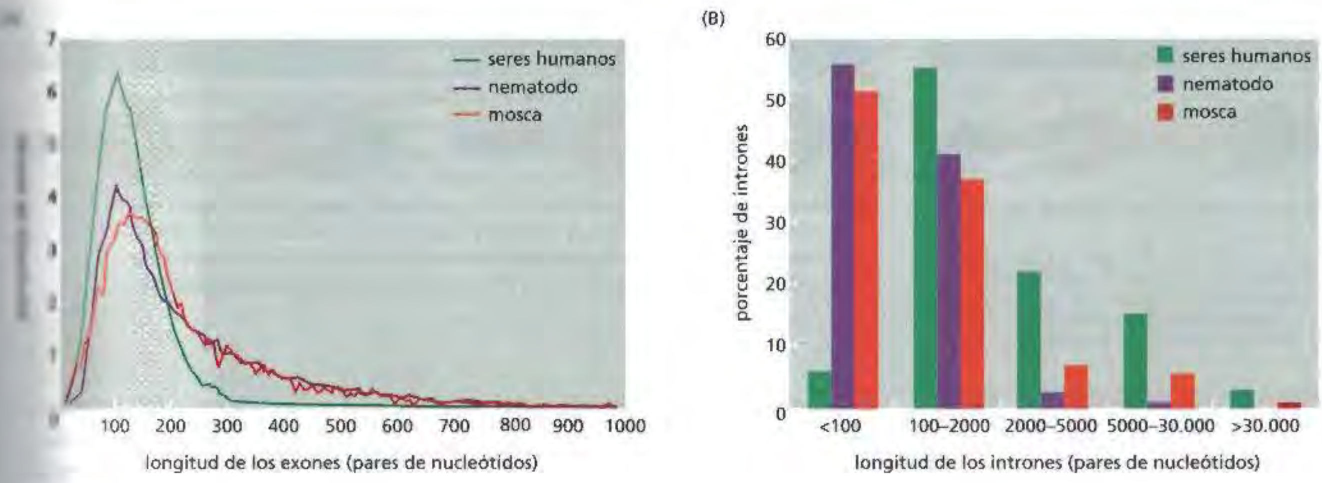


Figura 6–32 **Variación de la longitud de los intrones y de los exones en los genomas humano, de nematodo y de la mosca.** (A) Distribución de los tamaños de los exones. (B) Distribución del tamaño de los intrones. Hay que destacar que la longitud de los exones es mucho más uniforme que la de los intrones. (Adaptado de Consorcio Internacional para la Secuenciación del Genoma Humano, *Nature* 409:860-921, 2001. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

Tanto la delimitación de los exones e intrones como el ensamblaje del espliceosoma se inician sobre una molécula de RNA que todavía está siendo elongada por la RNA polimerasa por el extremo 3'. Sin embargo, el proceso químico real de maduración tiene lugar mucho más tarde. Este retraso significa que las secuencias intrónicas no son eliminadas de la molécula de pre-mRNA necesariamente en el orden en que aparecen en la cadena de RNA. También significa que, aunque el ensamblaje del espliceosoma es cotranscripcional, las reacciones de maduración pueden tener lugar postranscripcionalmente, es decir, después de que se haya acabado de fabricar la molécula de pre-mRNA.

Un segundo conjunto de snRNP procesa una pequeña fracción de secuencias intrónicas en animales y plantas

Los organismos eucariotas sencillos, como las levaduras, sólo tienen un conjunto de snRNP que realiza todo la maduración del pre-mRNA de la célula. Sin embargo, los eucariotas más complejos, como las moscas, los mamíferos o las plantas, disponen de un segundo conjunto de snRNP que dirige la maduración de una pequeña fracción de sus intrones. Esta forma minoritaria del espliceosoma reconoce un tipo diferente de secuencias de RNA en los sitios 5' y 3' de maduración y en el sitio de ramificación; se conoce como *espliceosoma de tipo U12* debido a la participación de la SnRNP U12 (**Figura 6–34A**). A pesar de reconocer secuencias diferentes de nucleótidos, las snRNP de este espliceosoma llevan a cabo los mismos tipos de interacciones RNA-RNA con el pre-mRNA y entre sí que ya hemos visto en las snRNP principales (Figura 6–34B). A pesar de que, como se ha descrito, algunos componentes de los espliceosomas mayores viajan con la RNA polimerasa II a medida que va transcribiendo los genes, éste no es el caso del espliceosoma U12. Es posible, por tanto, que la maduración mediada por U12 se retrase y ello represente a la célula un camino para corregular la maduración de los centenares de genes cuya expresión requiere este espliceosoma. Varios mRNA de

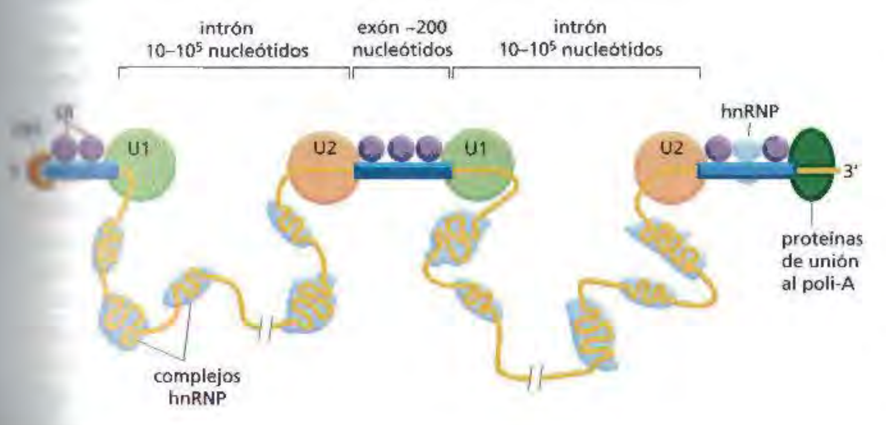


Figura 6–33 **La idea de definición de los exones.** Según esta propuesta, las proteínas SR se unen a cada exón en el pre-mRNA, ayudando así a guiar a las snRNP a los límites correctos intrón/exón. Esta demarcación de los exones por las proteínas SR tiene lugar cotranscripcionalmente y se inicia en el CBC o complejo de unión de la caperuza (*cap-binding complex*), en el extremo 5'. Como se indica, los intrones del pre-mRNA, que pueden ser muy largos, se empaquetan en complejos hnRNP (ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas) que los compactan en estructuras mucho más manejables y, quizá, contribuyen a enmascarar posibles sitios crípticos de maduración. Se ha propuesto que las proteínas hnRNP se asocian sobre todo con los intrones y que esta preferencia ayuda al espliceosoma a distinguir los intrones de los exones. Sin embargo, como se muestra en la figura, al menos algunas proteínas hnRNP se pueden unir a los exones. (Adaptado de R. Reed, *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:340-345, 2000. Con la autorización de Elsevier.)

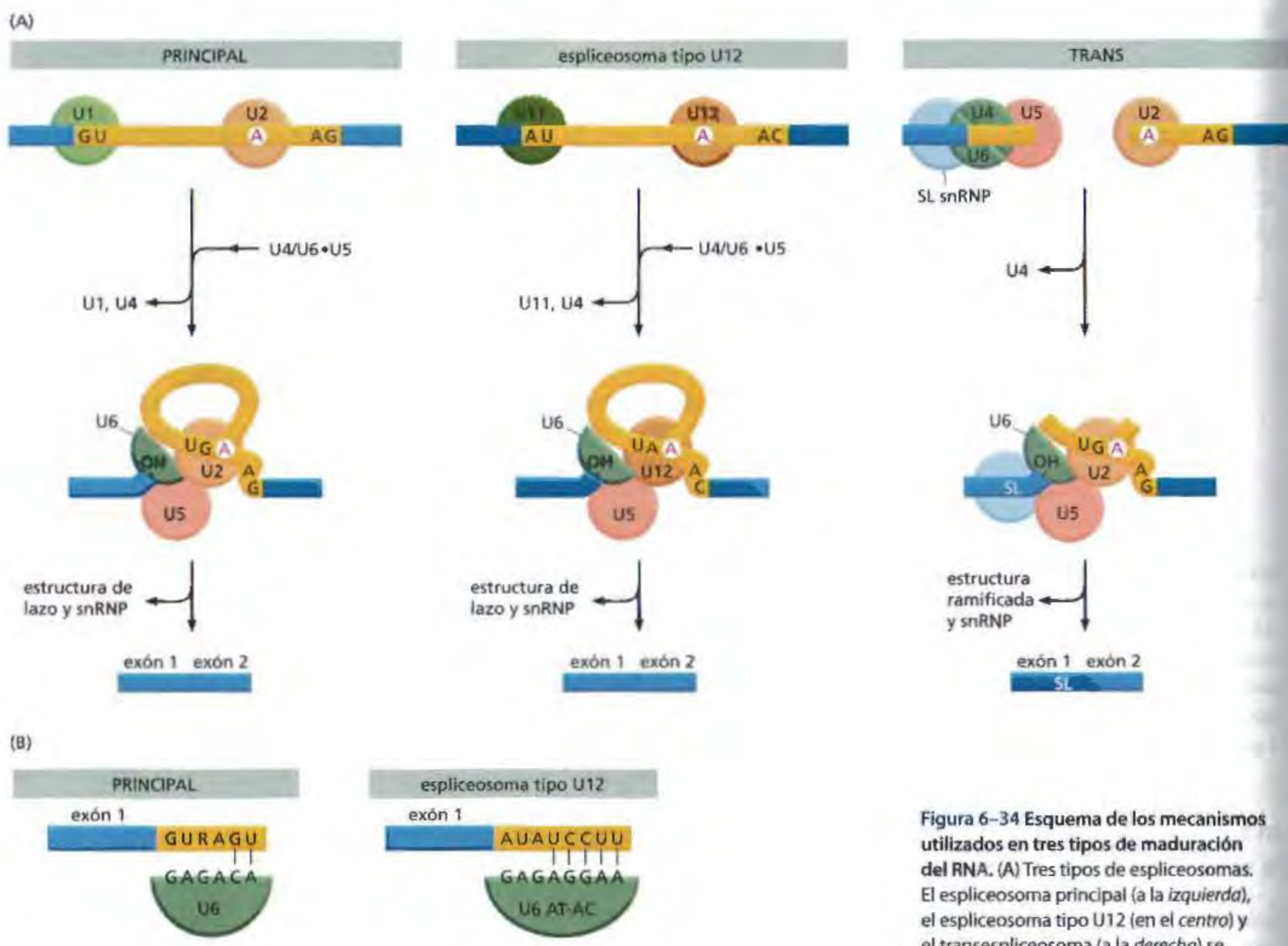


Figura 6–34 Esquema de los mecanismos utilizados en tres tipos de maduración del RNA. (A) Tres tipos de espliceosomas. El espliceosoma principal (a la *izquierda*), el espliceosoma tipo U12 (en el *centro*) y el transespliceosoma (a la *derecha*) se representan en dos estados diferentes de ensamblaje. Los intrones eliminados por el espliceosoma tipo U12 tienen unas secuencias consenso de maduración diferentes de las de los intrones eliminados por el espliceosoma principal. En los seres humanos, se estima que el 0,1% de los intrones es eliminado por el espliceosoma tipo U12. En la transmaduración, algo que no ocurre en humanos, una parte del snRNA SL se convierte en el primer exón del mRNA maduro, por lo que la snRNP SL acaba siendo consumida durante la reacción. (B) Tanto la snRNP U6 principal como la snRNP U6 específica del espliceosoma tipo U12 reconocen el sitio 5' de maduración, pero lo hacen mediante apareamientos de bases diferentes. Las secuencias representadas corresponden a las de los seres humanos. (Adaptado de Y.T. Yu et al., The RNA world, pp. 487-524. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.)

mamíferos contienen una mezcla de intrones, algunos de los cuales son eliminados por el espliceosoma mayor y otros por el espliceosoma menor; se ha propuesto que esta distribución permite que ocurran patrones complejos de maduración alternativa.

Algunos organismos eucariotas presentan una variante particular de la maduración, denominada **transmaduración**. Entre estos organismos, se encuentran los tripanosomas –protozoos que causan la enfermedad del sueño a los humanos en África– y el organismo pluricelular modelo, el gusano nematodo. En la transmaduración, los exones de dos transcritos de RNA diferentes se unen entre sí formando una molécula de mRNA madura (véase la Figura 6–34A). Los tripanosomas fabrican todos sus mRNA de esta manera, mientras que sólo un 1% de los mRNA del nematodo sufren el proceso de transmaduración. En ambos casos, un exón determinado puede unirse al extremo 5' de muchos transcritos diferentes de la célula; de esta forma, todos los productos de la transmaduración tienen el mismo exón 5' y diferentes exones 3'. En esta reacción, se utilizan muchas de las mismas snRNP utilizadas en la maduración convencional, aunque la transmaduración utiliza una sola snRNP (llamada la SL RNP) que aporta el exón común (véase la Figura 6–34).

Desconocemos la razón por la cual algunos organismos utilizan la transmaduración; sin embargo, parece que el exón 5' común puede facilitar la traducción del mRNA. Así, parece que los mRNA producidos por transmaduración de los nematodos son traducidos con una eficiencia particularmente elevada.

La maduración (ayuste) del RNA muestra una notable plasticidad

Hemos visto que la elección de los sitios de maduración depende de características del transcrito de pre-mRNA como la afinidad de las tres señales del RNA para la maquinaria de la maduración (los sitios 5' y 3' y el sitio de ramificación), el ensamblaje cotranscripcional del



Figura 6–35 Procesamiento anormal del RNA transcrito primario de la β-globina en seres humanos afectados por la enfermedad β talasemia. En los ejemplos mostrados, la enfermedad está causada por mutaciones en los sitios de maduración (*puntas de flecha negras*) en el genoma de los pacientes afectados. Los *rectángulos azul oscuro* representan los tres exones normales; las *líneas rojas* indican los sitios 5' y 3' de maduración. Los *rectángulos azul claro* corresponden a las nuevas secuencias de nucleótidos incluidas en la molécula final de mRNA como resultado de la mutación. Hay que destacar que cuando una mutación deja un sitio de maduración sin su correspondiente pareja, se produce el salto de un exón o se utiliza algún sitio "críptico" de maduración, como en (C) y (D). (Adaptado en parte de S.H. Orkin, en The Molecular Basis of Blood Diseases [G. Stamatoyannopoulos et al., eds.], pp. 106-126. Philadelphia: Saunders, 1987.)

espliceosoma y la precisión "de relojero" que subyace a la definición de los exones. No sabemos con qué precisión se producen los procesos de maduración porque, como veremos más adelante, existen varios sistemas de control de calidad que rápidamente destruyen aquellos mRNA cuya maduración es errónea. Sin embargo sabemos que, comparados con otros procesos de la expresión génica, la maduración es muy flexible. Por ejemplo, una mutación en una secuencia crítica para la maduración de un intrón determinado no impide necesariamente que se procese este intrón. Por el contrario, la mutación suele originar un nuevo patrón de maduración (**Figura 6–35**). En el caso más habitual, se salta un exón (Figura 6–35B). En otros casos, la mutación provoca que se utilice de forma eficiente un sitio críptico de maduración (Figura 6–35C). Parece que la maquinaria de maduración ha evolucionado en el sentido de escoger el mejor patrón posible de sitios de maduración y si el óptimo ha sido dañado por una mutación, seleccionará el siguiente y así sucesivamente. Esta flexibilidad en el proceso de maduración del RNA sugiere que los cambios en los patrones de maduración causados por mutaciones aleatorias han supuesto un mecanismo importante en la evolución de los genes y de los organismos.

La plasticidad de la maduración del RNA también significa que la célula puede regular el patrón de maduración de sus RNA. En esta misma sección, ya hemos visto que la maduración alternativa puede generar diferentes proteínas a partir de un mismo gen. Algunos ejemplos de maduración alternativa son constitutivos; es decir, los mRNA procesados de manera alternativa son fabricados continuamente por las células de un organismo. Sin embargo, en muchos casos la célula regula los patrones de maduración de manera que cada forma diferente de la proteína sea fabricada en momentos diferentes y en tejidos diferentes (véase la Figura 6–27). En el Capítulo 7, volveremos sobre este aspecto para analizar algunos ejemplos específicos de regulación de la maduración del RNA.

Probablemente la maduración de RNA catalizada por el espliceosoma evolucionó a partir de mecanismos de automaduración

Cuando se descubrió el espliceosoma, su mecanismo confundió a los biólogos moleculares. ¿Por qué son las moléculas de RNA y no las de proteína las que interpretan los papeles principales en el reconocimiento de los sitios de maduración y en la propia reacción química de la maduración? ¿Por qué se forma un lazo intermediario en vez de utilizar la alternativa, aparentemente más sencilla, de aproximar los sitios 5' y 3' de maduración en un solo paso, seguido del corte y empalme de las secuencias exónicas? Las respuestas a estas preguntas reflejan la forma en que se supone que ha evolucionado el espliceosoma.

Como ya expusimos brevemente en el Capítulo 1 (y lo volveremos a hacer con más detalle en la sección final de este capítulo), es probable que las células primitivas utilizasen moléculas de RNA en lugar de proteínas como sus principales catalizadores y que almacenasen su información genética sobre todo en forma de secuencias de RNA en lugar de DNA. En estas células primitivas, las reacciones de maduración catalizadas por RNA deberían tener, probablemente, funciones importantes. Como prueba de ello, todavía hoy existen algunos intrones de *RNA autocatalíticos* (es decir, secuencias intrónicas cuya maduración puede tener lugar en ausencia de cualquier otra molécula de proteína o de RNA) –por ejemplo, en los genes nucleares de rRNA del ciliado *Tetrahymena*, en algunos genes del bacteriófago T4 y en algunos genes de mitocondrias y de cloroplastos.

Un intrón autocatalítico se puede identificar incubando en un tubo de ensayo una molécula pura de RNA que contenga la secuencia intrónica y observando si tiene lugar la reac-

ción de maduración. De esta forma, se pueden distinguir dos clases principales de intrones autocatalíticos. Los *intrones del grupo I* inician la reacción de maduración mediante la unión de un nucleótido G a la secuencia del intrón; este G se activa, formando el grupo atacante que romperá el primero de los enlaces fosfodiéster escindidos durante el proceso de maduración (el enlace del sitio 5' de maduración). En los *intrones del grupo II*, un residuo A especialmente reactivo del intrón actúa de grupo de ataque y se genera un lazo intermediario. El resto de la reacción de maduración es idéntica en ambos grupos de intrones autocatalíticos. Se supone que ambos grupos representan vestigios de mecanismos moleculares muy antiguos (**Figura 6–36**).

En ambos tipos de reacciones de automaduración, la secuencia de nucleótidos del intrón es crítica; el RNA del intrón se pliega adoptando una estructura tridimensional específica, que aproxima los sitios 5' y 3' de corte y sitúa los grupos reactivos en las posiciones precisas para realizar la reacción química (véase la Figura 6–6C). Debido a que las reacciones químicas de sus mecanismos de maduración son muy similares, se ha propuesto que el espliceosoma evolucionó a partir del grupo II de intrones autocatalíticos. De acuerdo con esta idea, cuando las snRNP del espliceosoma adoptaron los papeles estructurales y químicos de los intrones del grupo II, las estrictas limitaciones de la secuencia de los intrones desaparecieron, por lo que se produjo una vasta expansión del número de RNA diferentes que podían ser sometidos a maduración.

Unas enzimas procesadoras del RNA generan el extremo 3' de los mRNA eucariotas

Como se explicó anteriormente, el extremo 5' del pre-mRNA fabricado por la RNA polimerasa II adquiere la caperuza 5' casi en el mismo momento en que emerge de la RNA polimerasa. Posteriormente, a medida que la polimerasa prosigue su avance a lo largo del gen, el

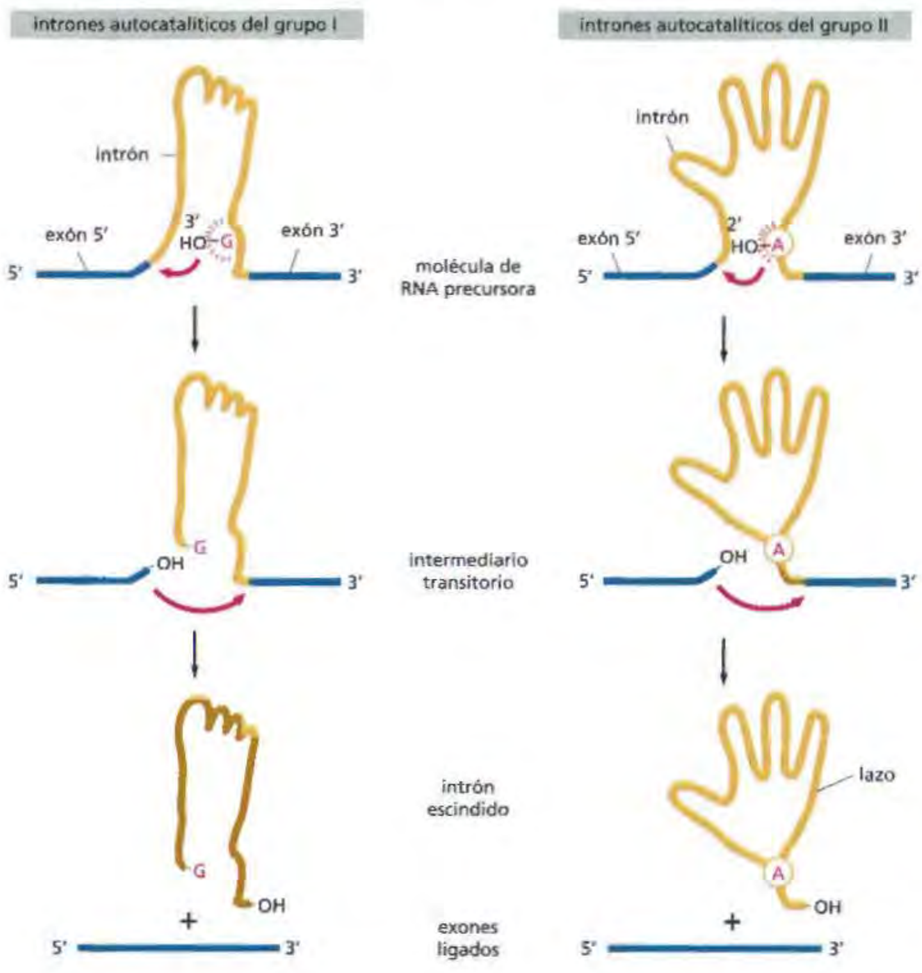


Figura 6–36 Las dos clases conocidas de intrones con capacidad de automaduración. En la figura se destacan las semejanzas entre los dos mecanismos. En los dos casos, el proceso está acelerado por algunas proteínas adicionales presentes en la célula, aunque la catálisis está mediada exclusivamente por el RNA. Los intrones del grupo I inician la maduración uniendo un nucleótido G libre a un sitio específico del RNA, mientras que los intrones del grupo II lo hacen utilizando un nucleótido de A, especialmente reactivo, de la propia secuencia del intrón. Ambos tipos de reacciones de automaduración requieren que el intrón se pliegue formando una estructura tridimensional determinada que permita generar la actividad catalítica de la reacción (véase la Figura 6–6). El mecanismo utilizado por los intrones del grupo II libera el intrón en forma de una estructura de lazo y todo el proceso recuerda la maduración del pre-mRNA que tiene lugar en el espliceosoma (compárese con la Figura 6–29). En las células eucariotas, la maduración del RNA tiene lugar sobre todo en el espliceosoma y los RNA autocatalíticos representan casos excepcionales. (Adaptado de T.R. Cech, *Cell* 44:207-210, 1986. Con la autorización de Elsevier.)

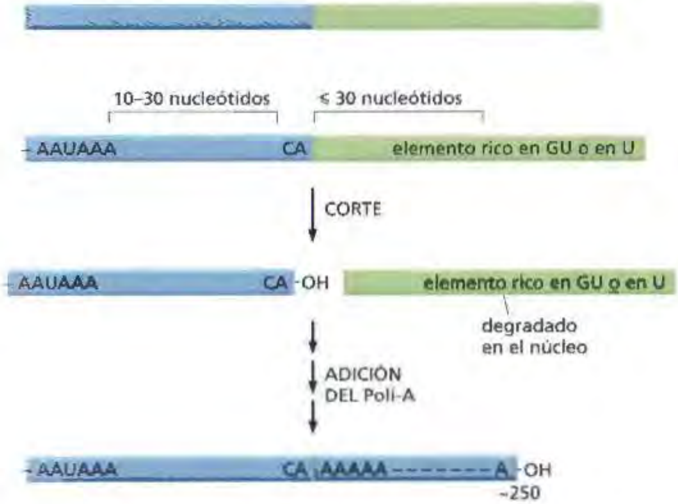


Figura 6–37 Secuencias consenso que dirigen el corte y la poliadenilación que forma el extremo 3′ de un mRNA eucariota. Estas secuencias están codificadas en el genoma y, cuando han sido transcritas a RNA, son reconocidas por proteínas específicas. Al hexámero AAUAAA se le une el CPSF, al elemento rico en GU más allá del sitio de corte se le une el CstF (véase Figura 6–38) y a la secuencia CA, un tercer factor necesario para la reacción de corte. Como otras secuencias consenso de las que hemos tratado en este capítulo (véase Figura 6–12), las secuencias que se muestran en esta figura representan una amplia variedad de señales individuales de corte y de poliadenilación.

espliceosoma se va ensamblando sobre el RNA y van delimitando los límites de exones e intrones. La larga cola C-terminal de la RNA polimerasa coordina estos procesos al transferir directamente al RNA los componentes que participan en la adición de la caperuza y en la maduración, a medida que el RNA emerge de la enzima. Veremos en esta sección que cuando la RNA polimerasa II alcanza el final del gen, un mecanismo similar asegura que el extremo 3′ del pre-mRNA sea procesado de forma adecuada.

Como era de esperar, la posición del extremo 3′ de cada molécula de mRNA está especificada, en último término, por una señal codificada en el genoma (**Figura 6–37**). Estas señales son transcritas a RNA cuando la RNA polimerasa II pasa sobre ellas y entonces son reconocidas (como RNA) por una serie de proteínas de unión al RNA y enzimas procesadoras del RNA (**Figura 6–38**). En este proceso tienen una importancia destacada dos complejos proteicos, llamados CstF o factor F estimulador de la escisión (***cleavage stimulation factor F***) y CPSF o factor de especificidad de la escisión y la poliadenilación (***cleavage and polyadenylation specificity factor***). Ambos complejos viajan con la cola de la RNA polimerasa y son transferidos al extremo 3′ de una molécula de RNA cuando emerge de la RNA polimerasa.

Cuando el CstF y el CPSF se unen a unas secuencias determinadas de nucleótidos de la molécula naciente de RNA, se les ensamblan otras proteínas adicionales que generarán el extremo 3′ del mRNA. Primero, el RNA es escindido (véase la Figura 6–38). A continuación, una enzima llamada poli-A polimerasa (PAP) añade, de uno en uno, aproximadamente 200 nucleótidos de A al extremo 3′ originado en la escisión anterior. El nucleótido precursor de estas adiciones es el ATP y se forman el mismo tipo de enlaces 5′ a 3′ que en la síntesis convencional de RNA (véase la Figura 6–4). Al contrario que las RNA polimerasa normales, la poli-A polimerasa no necesita un molde; por lo tanto, la cola de poli-A de los mRNA eucariotas no está directamente codificada en el genoma. A medida que se va sintetizando la cola de poli-A, se le van uniendo una serie de proteínas, llamadas proteínas de unión al poli-A que, mediante un mecanismo todavía mal conocido, determinan la longitud final de la cola. Algunas proteínas de unión a poli-A permanecen unidas a la cola de poli-A mientras el mRNA pasa del núcleo al citosol y contribuyen a dirigir la síntesis de la proteína en el ribosoma, como veremos más adelante.

Cuando el extremo 3′ de una molécula de pre-mRNA eucariota ha sido escindido, la RNA polimerasa II continúa transcribiendo, en alguoos casos varios centenares de nucleótidos. Pero la polimerasa rápidamente libera su presa sobre el DNA molde y la transcripción termina; cuando se ha producido la rotura del extremo 3′, el RNA acabado de sintetizar que emerge de la polimerasa no presenta una caperuza en 5′. Este RNA desprotegido es degrada-

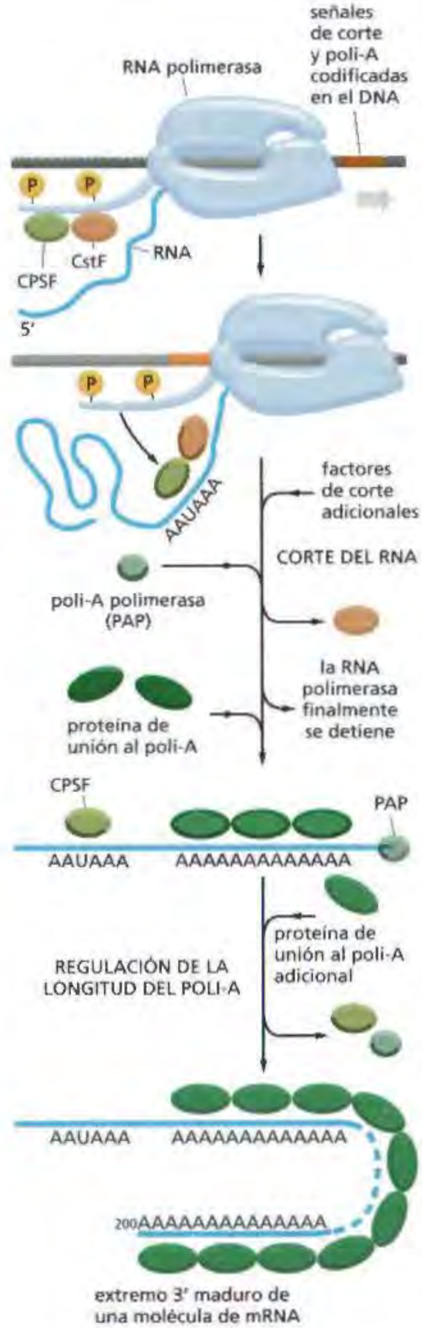


Figura 6–38 Algunas de las etapas principales del proceso de generación del extremo 3′ de un mRNA eucariota. Este proceso es mucho más complejo que su equivalente en bacterias, en el que la RNA polimerasa se detiene al llegar a una señal de terminación y libera tanto el extremo 3′ de su transcrito como el molde de DNA (véase la Figura 6–11).

do con rapidez por una 5' → 3' exonucleasa que es transportada por la cola de la polimerasa. Aparentemente, es la degradación de este RNA la que finalmente hace que la RNA polimerasa se disocie del DNA.

Los mRNA maduros de los organismos eucariotas son exportados selectivamente desde el núcleo

Ya hemos visto que la síntesis del pre-mRNA y su procesamiento en eucariotas tiene lugar de manera ordenada en el núcleo de la célula. Sin embargo, estos procesos generan un problema especial para las células eucariotas, especialmente en las de organismos complejos en los que los intrones son mucho mayores que los exones. De todo el pre-mRNA sintetizado, sólo una pequeña fracción –el mRNA maduro– será de utilidad para la célula. El resto –los intrones escindidos, los RNA rotos, los pre-mRNA procesados de forma aberrante– no sólo son inútiles sino que pueden resultar peligrosos. ¿Cómo, entonces, puede la célula distinguir entre las relativamente poco frecuentes moléculas de mRNA maduro que debe conservar y la abrumadora cantidad de desechos del procesamiento del RNA?

La respuesta es que a medida que una molécula de RNA es procesada, pierde ciertas proteínas y adquiere otras, marcando así la finalización correcta de cada uno de las diferentes etapas. Por ejemplo, hemos visto que la adquisición de los complejos de unión a la caperuza, los complejos de unión al exón y las proteínas de unión a poli-A marcan la finalización de la formación de la caperuza, de la maduración y de la adición de poli-A respectivamente. Una molécula de mRNA completada de forma adecuada también es reconocida por las proteínas de que carece. Por ejemplo, la presencia de una snRNP significaría una maduración incompleta o aberrante. Sólo cuando todas las proteínas presentes sobre una molécula de mRNA signifiquen colectivamente que el proceso se ha completado con éxito, el mRNA será exportado desde el núcleo al citosol y traducido a proteína. Los mRNA procesados de forma inadecuadamente, y otros "escombros" de RNA, son retenidos en el núcleo donde serán degradados por el **exosoma** nuclear, un gran complejo proteico cuyo interior es rico en exonucleasas 3' a 5'. Así, las células eucariotas sólo exportan al citoplasma moléculas útiles de RNA mientras que los "escombros" se quedan en el núcleo.

De todas las proteínas que se ensamblan en las moléculas de pre-mRNA mientras emergen de las RNA polimerasa durante la transcripción, las más abundantes son las hnRNP (ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas) (véase Figura 6–33). Algunas de estas proteínas (en los seres humanos se conocen unas 30) desenrollan las horquillas en hélice del RNA de forma que las señales de maduración y otras señales del RNA pueden ser leídas con más facilidad. Otras preferentemente empaquetan el RNA contenido en las larguísimas secuencias intrónicas que son frecuentes en los genes de organismos complejos. Por tanto, pueden desempeñar un importante papel diferenciando los mRNA maduros de los "escombros" producidos por el procesamiento del RNA.

Los mRNA procesados con éxito son guiados a través de los **complejos de poro nuclear** (NPC: ***n****uclear* ***p****ore* ***c****omplexes*) –canales acuosos situados en la membrana nuclear que conectan directamente el nucleoplasma con el citosol (**Figura 6–39**). Las moléculas pequeñas (menos de 50.000 daltons) difunden libremente a través de estos canales. Sin embargo, la mayoría de las macromoléculas de las células, incluidos los complejos mRNA-proteína, son demasiado grandes para pasar a través de los canales sin que exista ningún proceso especial. La célula utiliza energía para transportar de forma activa estas macromoléculas en ambos sentidos a través de los complejos de poro nuclear.

Como explicamos con detalle en el Capítulo 12, las macromoléculas son desplazadas a través de los complejos de poro nucleares por *receptores de transporte nucleares* los cuales, dependiendo de la identidad de la macromolécula, la "escoltan" desde el núcleo hasta el citoplasma o viceversa. Para que se produzca la exportación de un mRNA, un receptor de transporte nuclear específico debe cargarse sobre el mRNA, una etapa que, al menos en algunos organismos, se asocia con la rotura 3' y la poliadenilación. Una vez ha ayudado a desplazar una molécula de RNA a través del complejo de poro nuclear, el receptor de transporte se disocia del mRNA, vuelve a entrar en el núcleo y exporta otra molécula de mRNA (**Figura 6–40**).

En el caso del mRNA de los genes de los anillos de Balbiani de los insectos, un mRNA extraordinariamente abundante, la exportación de los complejos mRNA-proteína desde el núcleo se puede observar con el microscopio electrónico. Cuando estos genes se transcriben, el RNA recién formado es empaquetado por diversas proteínas incluyendo las hnRNP, las pro-

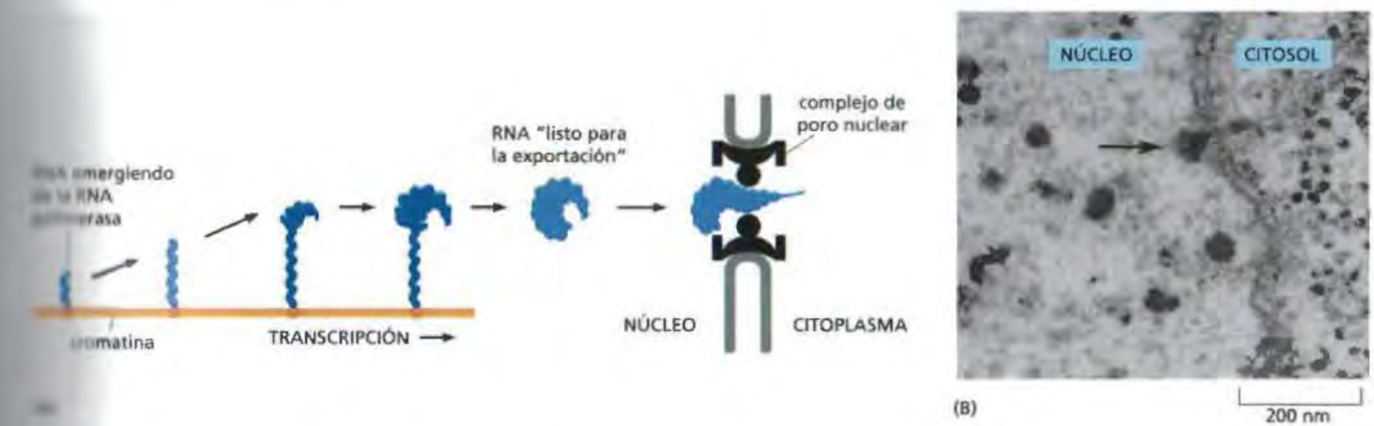


Figura 6–39 Transporte de una molécula de mRNA a través del complejo de poro nuclear. (A) La maduración de una molécula de mRNA a medida que es sintetizada por la RNA polimerasa y empaquetada por diferentes proteínas nucleares. Este esquema de un RNA extraordinariamente abundante, denominado mRNA del anillo de Balbiani, está basado en electromicrografías como la que se muestra en (B). Los genes del anillo de Balbiani se encuentran en las células de ciertos insectos. (A, adaptado de B. Daneholt. *Cell* 88:585-588, 1997. Con la autorización de Elsevier. B, de B.J. Stevens y H. Swift, *J. Cell Biol.* 31:55-77, 1966. Con la autorización de The Rockefeller University Press.)

proteínas SR y los componentes del espliceosoma. Estos complejos proteína–RNA sufren una serie de transiciones estructurales, que probablemente reflejan las diferentes etapas del procesamiento del RNA, y culminan con una apariencia de fibra curvada (véase Figura 6–39). Esta fibra curvada se desplaza por el nucleoplasma y entra en el complejo de poro nuclear (primero por la caperuza 5') y entonces sufre otra serie de transiciones estructurales a medida que se desplaza por el poro. Éstas y otras observaciones revelan que tanto los complejos pre-mRNA-proteína como los mRNA-proteína son estructuras dinámicas que ganan y pierden numerosas proteínas específicas durante la síntesis, el procesamiento y la exportación del RNA (véase Figura 6–40).

Como hemos visto, algunas de estas proteínas marcan los diferentes estadios de la maduración del mRNA; otras proteínas depositadas sobre el mRNA cuando todavía está en el núcleo pueden afectar el destino del RNA tras su transporte al citosol. Así, la estabilidad de un mRNA en el citosol, la eficiencia con la que será traducido a proteína y su destino final en el citosol dependen de proteínas adquiridas en el núcleo que permanecen unidas al RNA

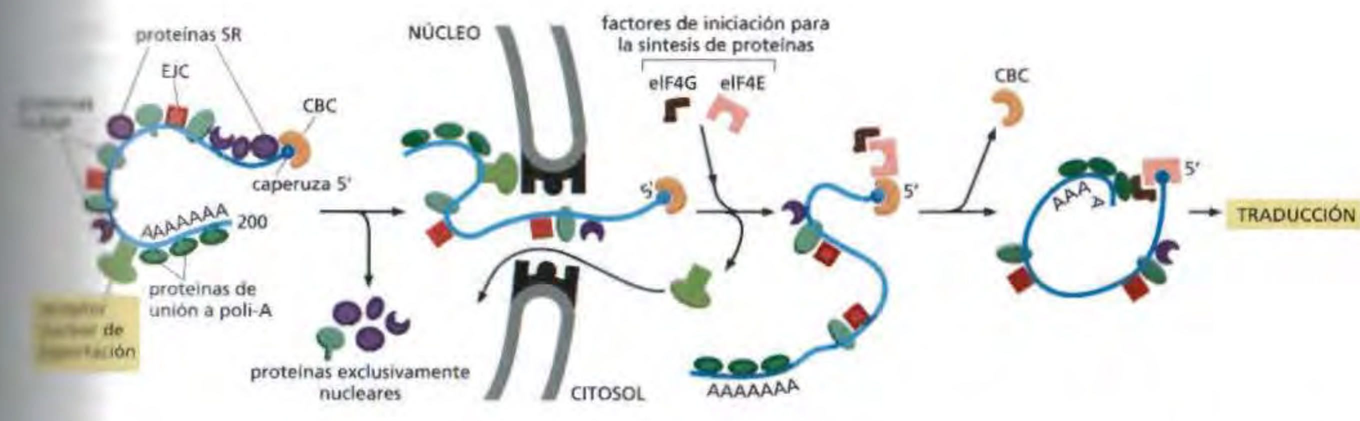


Figura 6–40 Esquema de una molécula de mRNA "lista para la exportación" y su transporte a través del poro nuclear. Tal como se indica, algunas proteínas viajan con el mRNA a medida que éste atraviesa el poro, mientras que otras se quedan en el núcleo. El receptor nuclear de exportación de mRNA es un complejo de proteínas que se deposita cuando el mRNA ha sido madurado y poliadenilado correctamente. Cuando el mRNA es exportado al citosol, el receptor de exportación se disocia del mRNA y vuelve a ser importado al núcleo, donde puede volver a ser utilizado. Inmediatamente después de que el mRNA ha abandonado el núcleo y antes de que pierda el complejo de unión a la caperuza o CBC (*cap-binding complex*), este mRNA es sometido a un análisis final, denominado *destrucción del mRNA mediada por triplete sin sentido*, que se describe al final del capítulo. Cuando ha superado este análisis, el mRNA continúa cediendo proteínas que había unido previamente y adquiriendo otras, antes de ser traducido de forma eficiente a proteína. EJC: complejo de unión a exones (*exon junction complex*).

después de que ha abandonado el núcleo. En el Capítulo 7 describiremos estos extremos cuando volvamos al control postranscripcional de la expresión génica.

Hemos visto que la síntesis y el procesamiento del RNA están íntimamente acoplados en la célula, por tanto, es previsible que la exportación desde el núcleo esté integrada, de alguna manera, con estos dos procesos. A pesar de que los anillos de Balbiani de RNA se desplazan a través del nucleoplasma y salen del núcleo a través de los poros nucleares, parece que otros mRNA son sintetizados y procesados muy cerca de los complejos de poro nucleares. En estos casos, que pueden representar la mayoría de los genes eucariotas, parece que la síntesis, el procesamiento y el transporte del mRNA están estrechamente acoplados; así, se puede imaginar que el mRNA que emerge del poro nuclear es como un coche que sale de una cadena de montaje. Más adelante en este capítulo veremos que la célula realiza otro control de calidad sobre cada mRNA antes de que pueda ser traducido a proteína de forma eficiente.

Antes de analizar qué sucede con el mRNA después de salir del núcleo, vamos a considerar brevemente cómo tiene lugar la síntesis y procesamiento de las moléculas de RNA no codificador. Aunque existen muchos otros ejemplos, la exposición se centrará en los rRNA que resultan críticos en la traducción de los mRNA a proteínas.

En el núcleo también se sintetizan y procesan muchos RNA no codificadores

Tan sólo un pequeño porcentaje del peso seco de una célula de mamífero es RNA; de éste, sólo un 3-5% corresponde al mRNA. De la fracción restante, una parte representa las secuencias intrónicas antes de que sean degradadas, pero la mayoría del RNA de las células lleva a cabo funciones estructurales y catalíticas (véase la Tabla 6–1, p. 336). Los RNA más abundantes de las células son los RNA ribosómicos (rRNA) –que constituyen cerca del 80% del RNA de una célula que se esté dividiendo rápidamente. Como describiremos más adelante en este mismo capítulo, estos RNA forman el núcleo de los ribosomas. Al diferencia de lo que ocurre en bacterias –en las que todos los RNA de la célula son sintetizados por la misma RNA polimerasa– los eucariotas poseemos una polimerasa especializada, la RNA polimerasa I, que se dedica a fabricar los rRNA. La RNA polimerasa I es estructuralmente similar a la RNA polimerasa II descrita; sin embargo, la ausencia de la cola C-terminal en la polimerasa I explica en parte por qué sus transcritos no presentan ni caperuza 5' ni cola de poli-A. Como ya se mencionó, esta diferencia ayuda a la célula a distinguir entre los RNA no codificadores y los mRNA.

Cada molécula de mRNA puede someterse a múltiples rondas de traducción, amplificando en gran medida la producción de moléculas de proteína, por lo que muchas de las proteínas más abundantes de la célula se sintetizan a partir de genes de los que hay una sola copia por genoma haploide. Por el contrario, los componentes de RNA del ribosoma son productos génicos finales; cada célula de mamífero en crecimiento debe sintetizar en cada generación celular aproximadamente 10 millones de copias de cada tipo de RNA ribosómico para fabricar sus 10 millones de ribosomas. Sólo se pueden alcanzar las cantidades adecuadas de cada RNA ribosómico gracias a que la célula contiene muchas copias de los **genes rRNA** que codifican los RNA ribosómicos (**rRNA**). Incluso *E. coli* necesita siete copias de sus genes rRNA para cubrir las necesidades celulares de ribosomas. Las células humanas contienen unas 200 copias de cada gen rRNA por genoma haploide, distribuidas por grupos en cinco cromosomas diferentes (véase la Figura 4–11), mientras que las células de la rana *Xenopus* contienen aproximadamente 600 copias de cada gen rRNA por genoma haploide en un solo grupo situado en un solo cromosoma (**Figura 6–41**).

Los organismos eucariotas tienen cuatro tipos de rRNA, y en los ribosomas hay una copia de cada uno de ellos. Tres de los cuatro rRNA (18S, 5.8S y 28S) se obtienen mediante la modificación química y escisión de un solo rRNA precursor (**Figura 6–42**); el cuarto (el rRNA 5S) se sintetiza a partir de un grupo diferente de genes mediante una polimerasa diferente, la RNA polimerasa III, y no requiere ninguna modificación química.

El rRNA precursor de 13.000 nucleótidos de longitud sufre importantes modificaciones químicas antes de escindirse en los tres rRNA a los que da lugar y a partir de los cuales se construye el ribosoma. Entre estas modificaciones, se incluyen unas 100 metilaciones en posiciones 2'-OH de los azúcares de los nucleótidos y 100 isomerizaciones de nucleótidos de uridina a pseudouridina (**Figura 6–43A**). No comprendemos todavía con detalle el significado y la función de estas modificaciones, pero probablemente son importantes en el plega-



Figura 6–41 Transcripción de los genes de rRNA dispuestos en tándem vista por electromicroscopía. Es fácil observar el patrón de genes alternativamente transcritos y no transcritos. En la Figura 6–9, se muestra una vista a más aumentos de genes de rRNA. (De V.E. Foe, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42:723-740, 1978. Con la autorización de Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

miento y ensamblaje de los rRNA finales y algunos de ellos pueden participar de alguna forma útil en el funcionamiento de los ribosomas. Cada modificación tiene lugar en una posición específica del rRNA precursor. Estas posiciones vienen especificadas por unos 150 "RNA guía" que se localizan sobre el rRNA precursor mediante apareamiento de bases y permiten situarse así en el sitio adecuado a una enzima modificadora del RNA (Figura 6–43B). Otros RNA guía provocan la escisión de los rRNA precursores en los rRNA maduros, probablemente causando cambios conformacionales en el RNA precursor y exponiendo estos lugares a las nucleasas. Todos estos RNA guía son miembros de una gran clase de RNA llamados **RNA nucleolares pequeños** (**snoRNA:** *small nucleolar RNA*), llamados así porque realizan sus funciones en un subcompartimiento del núcleo conocido como el nucleolo. Muchos snoRNA están codificados en los intrones de otros genes, especialmente los que codifican las proteínas ribosómicas. Por lo tanto, son sintetizados por la RNA polimerasa II y procesados a partir de las secuencias intrónicas escindidas.

Recientemente se han identificado algunas moléculas semejantes a snoRNA que sólo se expresan en las células del cerebro. Parece ser que direccionan la modificación de mRNA, en vez de rRNA, y podrían constituir un nuevo tipo de mecanismo regulador de genes, todavía muy poco conocido.

El nucleolo es una factoría de producción de ribosomas

El nucleolo es la estructura más aparente que se puede detectar en el núcleo de una célula eucariota cuando se la observa en un microscopio óptico. Por esa razón, fue tan estudiado

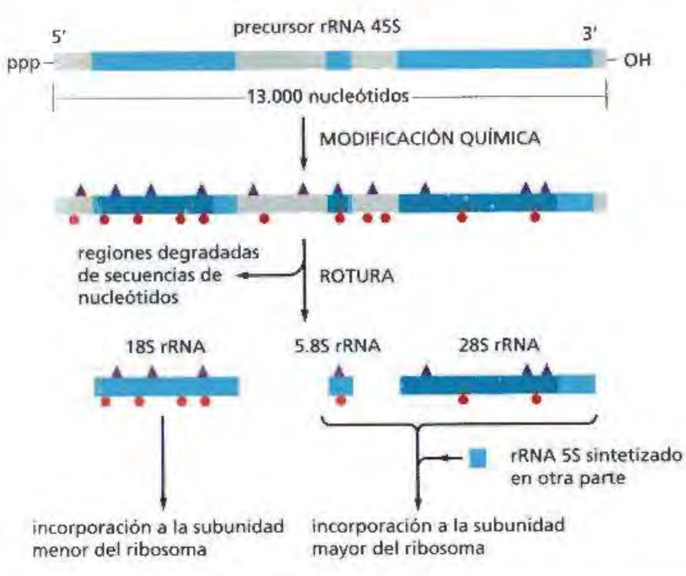


Figura 6–42 Modificación química y procesamiento de nucleótidos de una molécula de rRNA precursora 45S, en tres RNA ribosómicos separados. La molécula precursora de rRNA sufre dos tipos de modificaciones químicas (el código de colores está indicado en la Figura 6–43) antes de ser cortada. Casi la mitad de la secuencia de nucleótidos de este rRNA precursor es eliminada y degradada en el núcleo. Los rRNA se denominan según su valor de "S", que se refiere a su velocidad de sedimentación en una ultracentrifugadora. Cuanto mayor es el valor de S, mayor es el tamaño del rRNA.

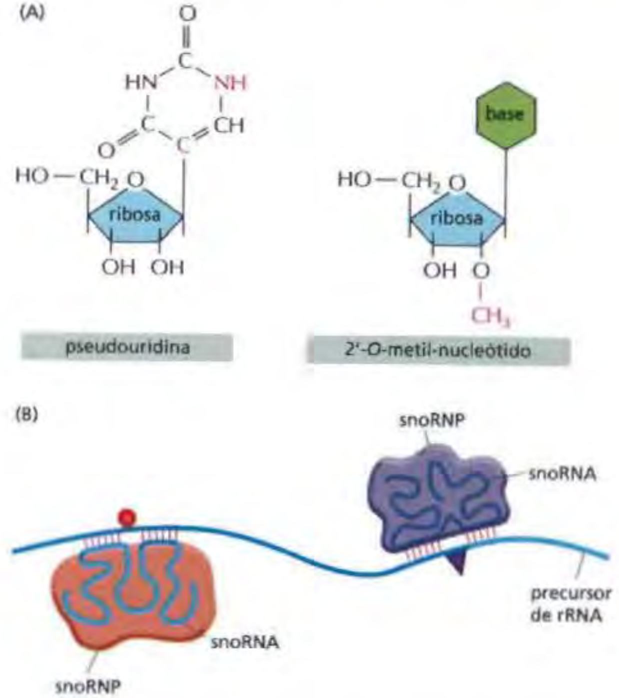


Figura 6–43 Modificaciones del rRNA precursor mediante los RNA guía. (A) Tras la síntesis del rRNA, tienen lugar dos modificaciones covalentes destacadas; las diferencias con los nucleótidos incorporados inicialmente están indicadas por los átomos dibujados en *rojo*. La pseudouridina es un isómero de la uridina en la que la base ha girado respecto al azúcar. (B) Como se indican, los snoRNA determinan los sitios de modificación por apareamiento de bases con las secuencias complementarias del precursor de rRNA. Los snoRNA están unidos a proteínas y los complejos reciben el nombre de snoRNP. Las snoRNP contienen tanto las secuencias guía como las enzimas que modifican el rRNA.

por los primeros citólogos que en una revisión de 1898 recogía 700 referencias bibliográficas. Ahora sabemos que el nucleolo es el lugar donde se procesan los rRNA y donde se ensamblan formando las subunidades de los ribosomas. A diferencia de la mayoría de los demás orgánulos de la célula, el nucleolo no está rodeado por una membrana (**Figura 6–44**), sino que consiste en una gran agregación de macromoléculas, incluyendo los propios genes rRNA, el rRNA precursor, los rRNA maduros, las enzimas procesadoras del rRNA, las snoRNP, las proteínas de los ribosomas y algunos ribosomas parcialmente ensamblados. Probablemente, la asociación de todos estos componentes permite que el ensamblaje de los ribosomas se haga de manera más rápida y sencilla.

Varios tipos de moléculas de RNA tienen un papel central en las características químicas y en la estructura del nucleolo, lo cual sugiere que quizá ha evolucionado a partir de alguna antigua estructura presente en las células cuando predominaba la catálisis mediada por el

Figura 6–44 Electromicrografía de una sección ultrafina de un nucleolo de un fibroblasto humano, mostrando sus tres zonas diferenciadas. (A) Vista completa del núcleo. (B) Imagen a alta resolución del nucleolo. Parece que la transcripción de los genes de rRNA tiene lugar entre el centro fibrilar y el componente fibrilar denso, y que el procesamiento de los rRNA y su ensamblaje en las dos subunidades del ribosoma va avanzando desde el componente fibrilar denso hacia los componentes granulares periféricos. (Cortesía de E.G. Jordan y J. McGovern.)

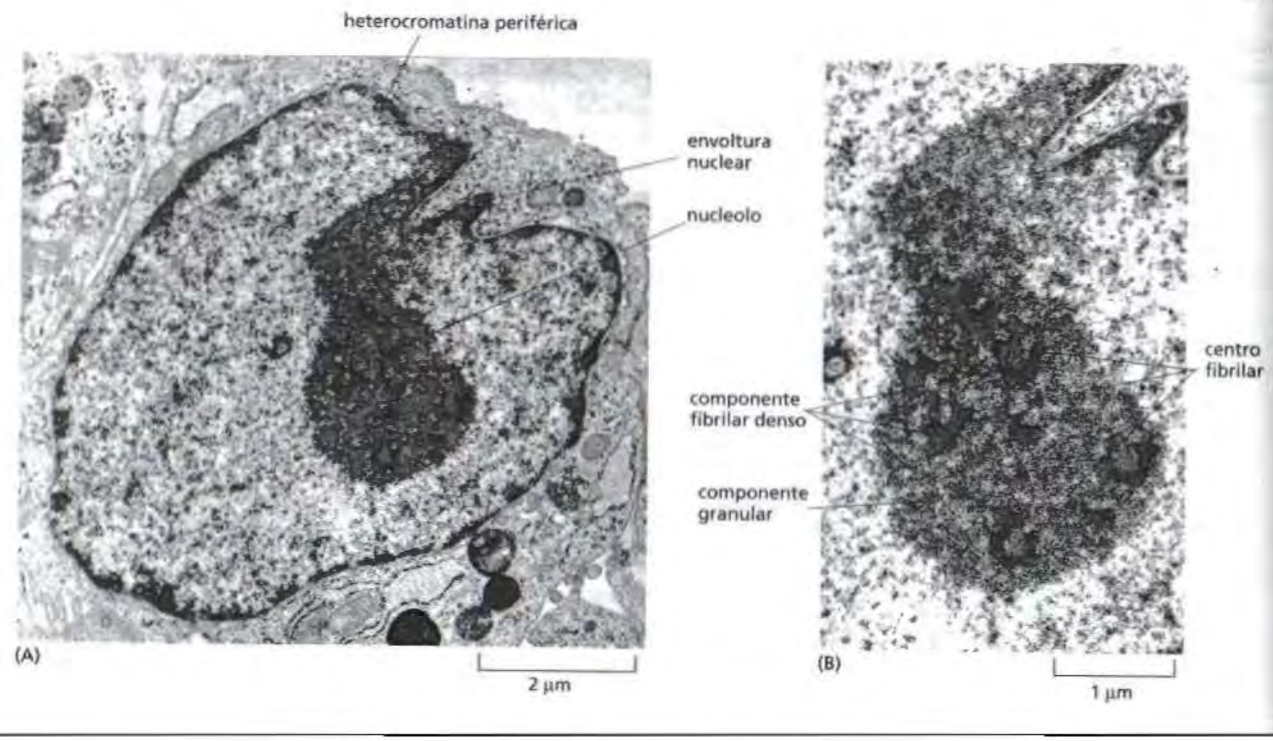
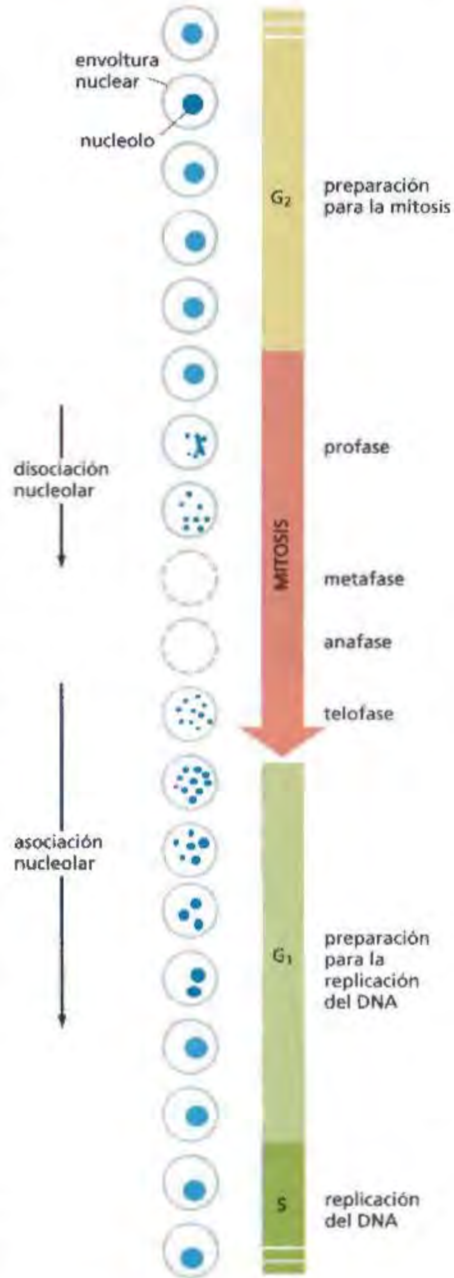


Figura 6–45 Cambios de apariencia del nucleolo en una célula humana durante el ciclo celular. En este esquema sólo se representa el núcleo de la célula. En la mayoría de las células de organismos eucariotas, la envoltura nuclear se rompe durante la mitosis, tal como indican los círculos discontinuos.



rRNA. En las células actuales los genes rRNA también desempeñan un papel importante en la formación del nucleolo. En una célula humana diploide, los genes rRNA están distribuidos en 10 grupos localizados cerca del extremo de cada de cinco pares de cromosomas (véase la Figura 4–11). Durante la interfase estos 10 cromosomas contribuyen a las asas de DNA (que contienen los genes rRNA) del núcleo; en la fase M, cuando los cromosomas se condensan, el nucleolo desaparece. Finalmente, en la telofase, cuando los cromosomas recuperan su estado semidisperso, los extremos de los 10 cromosomas coalescen y se vuelve a formar el nucleolo (**Figura 6–45** y **Figura 6–46**). Para que tenga lugar este proceso, es necesaria la transcripción de los genes rRNA mediante la RNA polimerasa I.

Como era de esperar, el tamaño del nucleolo refleja el número de ribosomas que está fabricando la célula. Su tamaño varía enormemente entre las diferentes células y puede cambiar a lo largo de la vida de una célula, ocupando un 25% del volumen nuclear total en las células que están fabricando cantidades especialmente grandes de proteína.

El ensamblaje de los ribosomas es un proceso complejo, las características más importantes del cual se muestran en la **Figura 6–47**. Además de su importante papel en la biogénesis de los ribosomas, el nucleolo también es el lugar donde se fabrican otros RNA y donde se ensamblan otros complejos RNA-proteína. Por ejemplo, la snRNP U6, que como hemos visto participa en la maduración del pre-mRNA (véase la Figura 6–29), está formada por una molécula de RNA y al menos siete proteínas. El snRNA U6 es modificado químicamente por los snoRNA del nucleolo antes de su ensamblaje final en la snRNP U6. Se cree que en el nucleolo también se ensamblan otros importantes complejos RNA-proteína, como la telomerasa (que se trató en el Capítulo 5) y la partícula de reconocimiento de señales (que describiremos el Capítulo 12). Finalmente, los tRNA (RNA de transferencia), que transportan los aminoácidos para la síntesis proteica, también son procesados en el nucleolo; como los genes rRNA, los que codifican los tRNA están agrupados en el nucleolo. Por lo tanto, el nucleolo puede ser considerado como una gran factoría en la que muchos RNA no codificadores se transcriben, procesan y ensamblan con proteínas formando una gran variedad de complejos ribonucleoproteicos.

El núcleo contiene varias estructuras subnucleares

Aunque el nucleolo es la estructura más prominente del núcleo, también se han visualizado y estudiado otros cuerpos nucleares (**Figura 6–48**). Entre ellos, se incluyen los cuerpos de Cajal (llamados así en honor del científico que los describió por primera vez en 1906), los GEMS (cuerpos Géminis de Cajal) y los grupos de gránulos intercromatínicos (también llamados "motas" o "speckles"). Como el nucleolo, estas estructuras también carecen de membrana y son muy dinámicas; su apariencia es, probablemente, el resultado de la estrecha

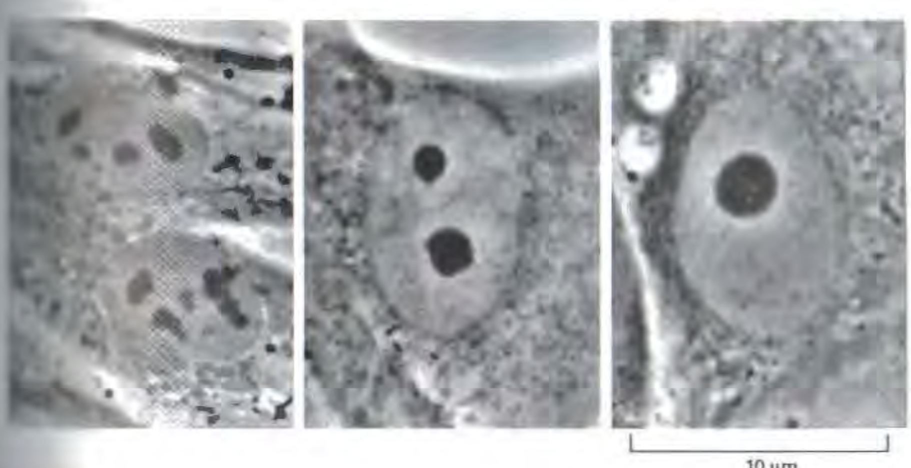


Figura 6–46 Fusión nucleolar. Estas micrografías de fibroblastos humanos en cultivo muestran varios estados de la fusión nucleolar. Después de la mitosis, cada uno de los 10 cromosomas humanos portadores de un grupo de genes de rRNA empieza a formar un pequeño nucleolo individual, que rápidamente se fusiona con los demás formando un gran nucleolo único, típico de muchas células en interfase. (Cortesía de E.G. Jordan y J. McGovern.)

asociación de los componentes proteicos y de RNA implicados en la síntesis, ensamblaje y almacenamiento de macromoléculas implicadas en la expresión génica. Los cuerpos de Cajal y los GEMS se parecen entre sí y con frecuencia están apareados en el núcleo; no está claro que representen estructuras auténticamente diferentes. Parecen ser los lugares donde los snoRNA y los snRNA sufren sus modificaciones covalentes y su ensamblaje final con proteínas. Un grupo de RNA guía, llamados *RNA Cajal pequeños (scaRNA)* seleccionan los lugares de estas modificaciones mediante apareamiento de bases. Los cuerpos de Cajal/GEMS también pueden ser lugares donde se reciclan las snRNP y se reajustan sus RNA tras las modificaciones sufridas durante la maduración (véase p. 352). Por el contrario, se ha propuesto que los grupos de gránulos intercromatínicos son almacenes de proteínas snRNP maduras y otros componentes de procesado de RNA, que están listas para ser utilizadas en la producción de los mRNA (**Figura 6–49**).

Los científicos han encontrado muchas dificultades para deducir la función de estas pequeñas estructuras subnucleares, en parte debido a que sus apariencias difieren entre organismos y pueden cambiar radicalmente cuando las células atraviesan el ciclo celular o responden a cambios en su entorno. Se están haciendo grandes progresos mediante el uso de herramientas genéticas –el examen de los efectos de mutaciones diseñadas en los organismos modelo o mutaciones espontáneas en los seres humanos. Como ejemplo, los GEMS contienen la proteína SMN (*survival of motor neurons*: supervivencia de neuronas motora). Ciertas mutaciones del gen que codifica esta proteína son la causa de la atrofia espinal mus-

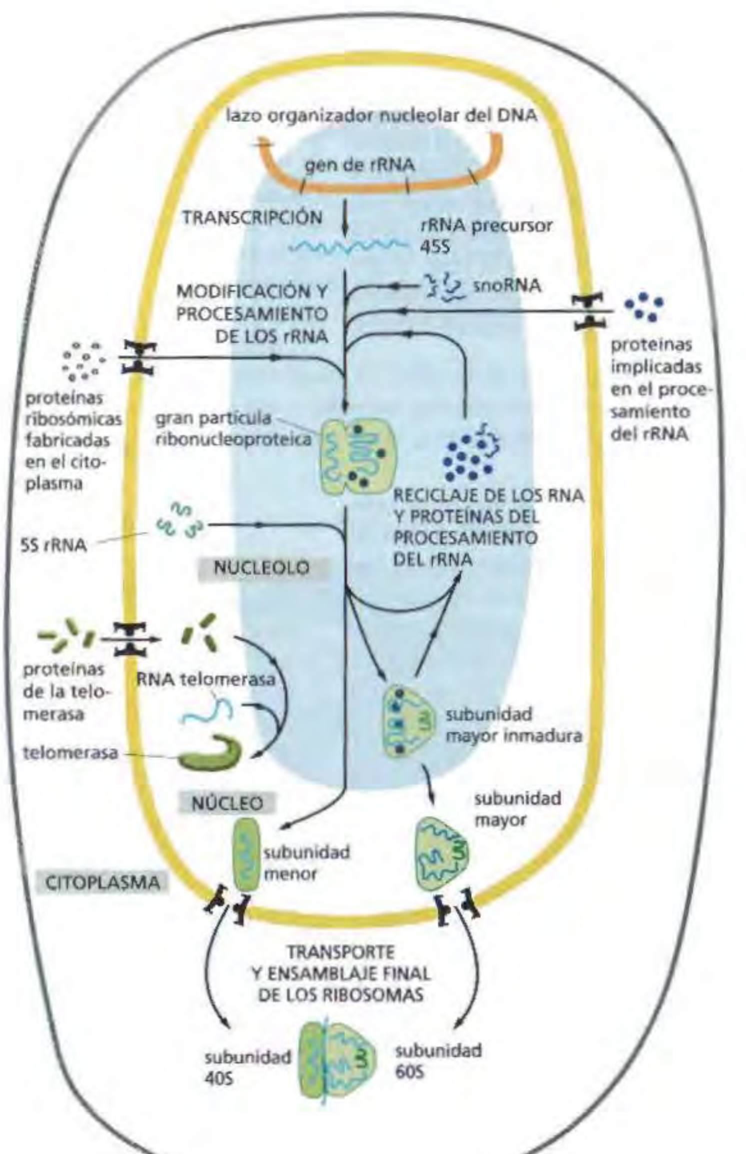


Figura 6–47 La función del nucleolo en la síntesis de los ribosomas y de otras ribonucleoproteínas. El rRNA precursor 45S es empaquetado en una gran partícula ribonucleoproteica que contiene muchas proteínas ribosómicas importadas del citoplasma. Mientras esta partícula está en el nucleolo, se van añadiendo elementos seleccionados y otros se eliminan, a medida que va siendo procesada hasta constituir las dos subunidades ribosómicas inmaduras, mayor y menor. Se cree que las dos subunidades ribosómicas sólo adquieren su forma funcional final cuando cada una de ellas es transportada de forma individual a través de los poros nucleares hasta el citoplasma. Otros complejos ribonucleoproteicos, como el de la telomerasa que se muestra, también se ensamblan en el nucleolo.

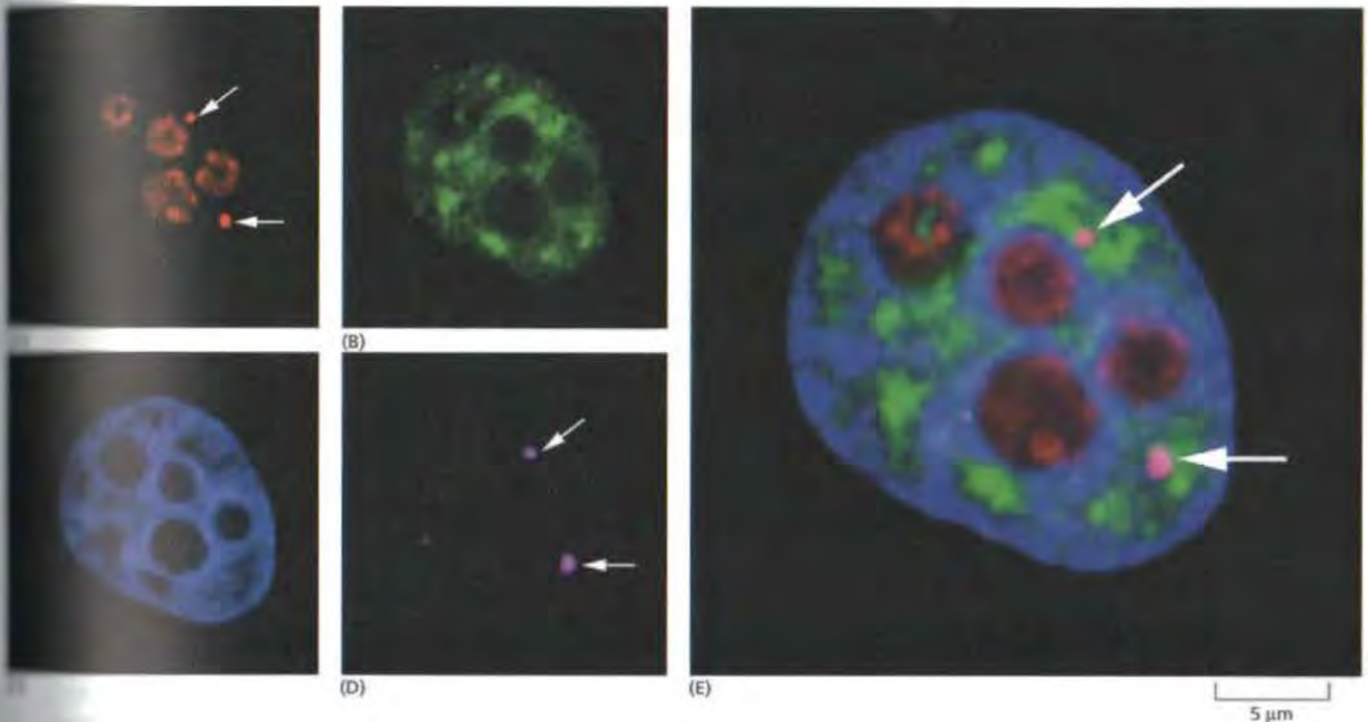


Figura 6–48 **Visualización de algunos cuerpos nucleares relevantes.** (A)-(D) Micrografías del núcleo de una misma célula humana, procesadas para realzar un tipo determinado de estructuras nucleares. (E) Superposición ampliada de las cuatro imágenes individuales. (A) muestra la localización de la proteína fibrilarina (un componente de varias snoRNP), que está presente tanto en los nucleolos como en los cuerpos accesorios de Cajal, estos últimos indicados por flechas. (B) muestra los gránulos de intercromatina o "motas" detectadas mediante anticuerpos contra una proteína implicada en la maduración del pre-mRNA. (C) está teñida para mostrar la masa de cromatina. (D) muestra la localización de la proteína coilina, presente en los cuerpos accesorios de Cajal (*flechas*; véase también la Figura 4–67). (De J.R. Swedlow y A.I Lamond, *Gen. Biol.* 2:1-7, 2001; Con la autorización de BioMed Central; micrografías, por cortesía de Judith Sleeman.)

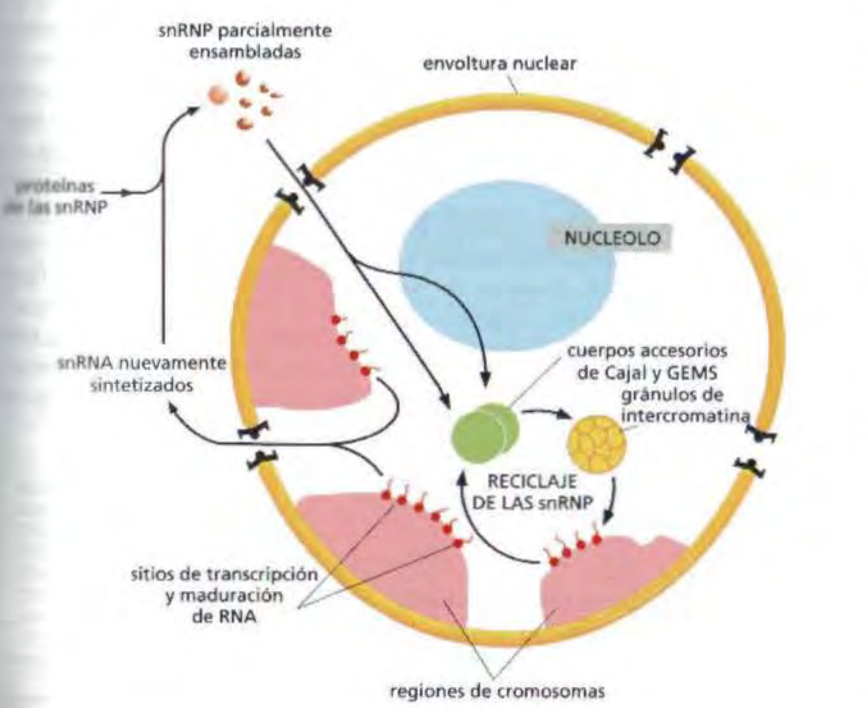


Figura 6–49 **Visión esquemática de las estructuras subnucleares.** Un típico núcleo de vertebrados tiene varios cuerpos de Cajal, en los que se cree que tienen lugar las modificaciones finales de las snRNP y las snoRNP. Se ha propuesto que los gránulos de intercromatina son almacenes de snRNP completamente maduras. Un núcleo típico de vertebrados tiene entre 20 y 50 gránulos de intercromatina.

Después de ser sintetizados, los snRNA son exportados desde el núcleo y sólo entonces sufren el procesamiento de sus extremos 5' y 3' y se ensamblan con las siete proteínas comunes de las snRNP (llamadas proteínas Sm). Estos complejos vuelven al núcleo y las snRNP sufren su modificación final por las scaRNA en los cuerpos de Cajal. Además, las snoRNA modifican químicamente la snRNP U6 en el nucleolo. Los sitios de transcripción y de maduración (aproximadamente unos 2000-3000 por núcleo de vertebrados) corresponden a las "fibras de pericromatina" observadas con el microscopio electrónico. (Adaptado de J.D. Lewis y D. Tollervey. *Science* 288:1385-1389, 2000. Con la autorización de AAAS.)

cular hereditaria, una enfermedad humana caracterizada por la atrofia de los músculos. Parece que la enfermedad está generada por un defecto en la producción de las snRNP. Una pérdida más completa de las snRNP sería probablemente letal.

Dada la importancia que tienen los subdominios nucleares en el procesamiento del RNA, se podría pensar que la maduración del pre-mRNA también tiene lugar en alguna localización particular del núcleo, ya que requiere numerosos componentes de RNA y de proteína. Sin embargo, ya hemos visto que el ensamblaje de los componentes de la maduración sobre el pre-mRNA es cotranscripcional, es decir, que la maduración tiene lugar en muchas localizaciones diferentes a lo largo de los cromosomas. A pesar de que una célula típica de mamífero expresa del orden de 15.000 genes, la transcripción y la maduración del RNA se localizan en tan sólo algunos miles de sitios del núcleo. Estos lugares también son muy dinámicos y probablemente son el resultado de la asociación de los componentes de la transcripción y la maduración, que generan pequeñas "cadenas de producción" en las que la concentración local de estos componentes es muy elevada. A menudo los agregados de gránulos de intercromatina –que contienen acumulaciones de componentes de procesamiento de RNA– se observan cerca de los lugares de transcripción, preparados para volver a llenar sus reservas. Así, parece que el núcleo está altamente organizado en subdominios, entre los que se desplazan las snRNP, las snoRNP y otros componentes nucleares de una manera ordenada según las necesidades de la célula (véase Figura 6–48; véase también la Figura 4–69).

Resumen

Antes de empezar la síntesis de una proteína determinada, se tiene que fabricar la molécula del mRNA correspondiente mediante la transcripción. Las bacterias contienen un solo tipo de RNA polimerasa (la enzima que lleva a cabo la transcripción del DNA a RNA). Para fabricar una molécula de mRNA, la enzima debe iniciar la transcripción en un promotor, sintetizar el RNA mediante la elongación de la cadena, detener la transcripción en un terminador y liberar tanto el molde de DNA como la molécula completa de mRNA. En las células eucariotas, el proceso de la transcripción es mucho más complejo y existen tres RNA polimerasas –polimerasa I, II y III– relacionadas evolutivamente unas con otras y con la polimerasa bacteriana.

La RNA polimerasa II sintetiza el mRNA eucariota. Esta enzima requiere una serie de proteínas adicionales, llamadas factores generales de transcripción, para iniciar la transcripción sobre un molde de DNA purificado, y otras proteínas (incluyendo complejos remodeladores de la cromatina y enzimas histona modificantes) para hacerlo sobre su molde de cromatina en el interior de una célula.

Durante la fase de elongación de la transcripción, el RNA naciente sufre tres tipos de procesamientos diferentes: se le añade un nucleótido especial a su extremo 5' (la caperuza), se eliminan las secuencias intrónicas del interior de la molécula de RNA (maduración o ayuste) y se genera el extremo 3' del mRNA (escisión y poliadenilación). Cada uno de estos procesamientos se inicia por proteínas que viajan con la RNA polimerasa II uniéndose a lugares de su larga y extendida cola C-terminal. La maduración o ayuste es especial dado que muchas de sus etapas clave no se realizan por proteínas sino por moléculas especializadas de RNA. Los mRNA procesados adecuadamente son transferidos a través de los complejos de poro nuclear hasta el citosol, donde son traducidos a proteína.

En algunos genes, el producto final es el RNA. En eucariotas, estos genes suelen ser transcritos por la RNA polimerasa I o la RNA polimerasa III. La RNA polimerasa I fabrica los RNA ribosómicos. Después de su síntesis en forma de un gran precursor, los rRNA son modificados químicamente, escindidos y ensamblados en las dos subunidades de los ribosomas en el nucleolo –un estructura subnuclear que también participa en el procesamiento de otros complejos RNA-proteína de la célula. Otras estructuras subnucleares adicionales (incluyendo los cuerpos de Cajal y los agregados de gránulos intercromatínicos) son lugares donde se ensamblan, almacenan y reciclan diversos componentes que participan en el procesamiento del RNA.

DEL RNA A LA PROTEÍNA

En la sección precedente hemos señalado que el producto final de algunos genes es una molécula de RNA, como las que forman parte de las snRNP o de los ribosomas. Sin embargo, la mayoría de los genes generan moléculas de mRNA que se utilizan como intermediarios en la síntesis de las proteínas. En esta sección examinaremos el mecanismo por el que una célula

convierte la información de una molécula de mRNA en una proteína. Este proceso, llamado traducción, fue el foco de atención de los biólogos por primera vez al final de la década de 1950, cuando se planteó el "problema de la codificación": ¿cómo se puede traducir la información contenida en una secuencia lineal de nucleótidos en el RNA a la secuencia lineal de unas unidades completamente diferentes –los aminoácidos de las proteínas? Esta fascinante pregunta fue el estímulo que promovió las investigaciones de los científicos de aquella época. Se trataba de un criptograma elaborado por la naturaleza que, después de más de tres mil millones de años de evolución, era resuelto por uno de los productos de esa evolución –el ser humano. En realidad no sólo se ha descubierto el código paso a paso sino que, en el año 2000, se acabó describiendo la estructura de la complicada maquinaria utilizada por la célula para leer el código –el ribosoma– en sus detalles atómicos.

La secuencia del mRNA es descodificada en grupos de tres nucleótidos

Una vez fabricado el mRNA, mediante la transcripción, el procesamiento de la información presente en su secuencia de nucleótidos se utilizará para la síntesis de una proteína. La transcripción es un proceso fácil de entender en cuanto a lo que representa de transferencia de información: dado que el DNA y el RNA son química y estructuralmente semejantes, el DNA puede actuar de forma directa como un molde para la síntesis del RNA por apareamiento entre bases complementarias. Como el propio término *transcripción* implica, es como si un mensaje escrito a mano se convirtiese, por ejemplo, en un texto escrito a máquina. El lenguaje y la forma del mensaje no cambian y los símbolos utilizados son muy parecidos.

Por el contrario, la conversión de la información del RNA a proteína representa una **traducción** de la información a otro lenguaje que utiliza símbolos muy diferentes. Además, dado que en el mRNA sólo hay 4 nucleótidos diferentes y en una proteína hay 20 tipos diferentes de aminoácidos, esta traducción no puede realizarse por una correspondencia uno a uno entre los nucleótidos del mRNA y los aminoácidos de la proteína. La secuencia de nucleótidos de un gen, a través del intermediario mRNA, es traducida a una secuencia de aminoácidos de una proteína siguiendo una serie de reglas, conocidas como el **código genético**. Este código fue descifrado a inicios de los años 1960.

La secuencia de nucleótidos de un mRNA se lee en grupos consecutivos de tres nucleótidos. El RNA es un polímero lineal de cuatro nucleótidos diferentes, así que hay $4 \times 4 \times 4 = 64$ combinaciones posibles de tres nucleótidos: los tripletes AAA, AUA, AUG, etc. Sin embargo, en las proteínas sólo hay 20 aminoácidos diferentes. O bien algunos tripletes de nucleótidos no se utilizan nunca o el código es redundante y algunos aminoácidos son especificados por más de un triplete. En realidad, la alternativa correcta es la segunda, como demuestra el código genético completamente descifrado de la **Figura 6–50**. Cada grupo de tres nucleótidos consecutivos del RNA recibe el nombre de **codón** y cada codón especifica un aminoácido o una señal de paro del proceso de la traducción.

Este código genético es utilizado por todos los organismos actuales. Aunque se han detectado algunas pequeñas diferencias en el código, éstas se dan sobre todo en el DNA mitocondrial. Las mitocondrias tienen sus propios sistemas de transcripción y síntesis de proteínas que actúan de forma bastante independiente de los del resto de la célula y es comprensible que sus pequeños genomas hayan podido albergar algunos cambios menores en el código (descritos en el Capítulo 14).

En principio, una secuencia de RNA podría traducirse siguiendo cualquiera de las tres posibles **pautas de lectura** diferentes, dependiendo del punto en que empiece el proceso de descodificación (**Figura 6–51**). Sin embargo, sólo una de las tres pautas de lectura de un mRNA codifica la proteína correcta. Más adelante, veremos cuál es la señal de puntuación

	AGA									UUA					AGC					
	AGG									UUG					AGU					
GCA	CGA						GGA			CUA				CCA	UCA	ACA			GUA	
GCC	CGC						GGC		AUA	CUC				CCC	UCC	ACC			GUC	UAA
GCG	CGG	GAC	AAC	UGC	GAA	CAA	GGG	CAC	AUC	CUG	AAA		UUC	CCG	UCG	ACG		UAC	GUG	UAG
GCU	CGU	GAU	AAU	UGU	GAG	CAG	GGU	CAU	AUU	CUU	AAG	AUG	UUU	CCU	UCU	ACU	UGG	UAU	GUU	UGA
Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	paro
A	R	D	N	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	

Figura 6–50 El código genético. Para cada aminoácido, se presenta la abreviatura estándar de una sola letra debajo de la abreviatura de tres letras (véase el Panel 3–1, pp.128-129, para el nombre completo de cada aminoácido y su estructura). Por convenio, los codones siempre se escriben con el extremo 5'-terminal a la izquierda. Cabe destacar que la mayoría de los aminoácidos están representados por más de un codón y que hay ciertas regularidades entre los codones que especifican cada uno de los aminoácidos. Los codones de un mismo aminoácido tienden a contener los mismos nucleótidos en la primera y segunda posición y varían en la tercera. Hay tres codones que no especifican ningún aminoácido sino que actúan como sitios de finalización (codones de paro), señalando el final de la secuencia codificadora de la proteína. Un codón –AUG– actúa tanto como codón de inicio, señalando el inicio del mensaje codificador de la proteína, como especificando el aminoácido metionina.

especial que, al inicio de cada mensaje de RNA, determina cuál es la pauta de lectura correcta al empezar la síntesis de la proteína.

Las moléculas de tRNA aparean los aminoácidos con los codones del mRNA

Los codones de una molécula de mRNA no reconocen directamente los aminoácidos que especifican: el grupo de tres nucleótidos no se une directamente al aminoácido. La traducción del mRNA a proteína depende de unas moléculas adaptadoras que reconocen y se unen por una región de su estructura al codón, y por otra región de su estructura, al aminoácido. Estos adaptadores son un grupo de pequeñas moléculas de RNA conocidas como **RNA de transferencia (tRNA)**, cada una de la cuales tiene unos 80 nucleótidos de longitud.

En este mismo capítulo ya hemos visto que las moléculas de RNA pueden plegarse adquiriendo estructuras tridimensionales precisas. Las moléculas de tRNA constituyen un ejemplo excepcional de este hecho. El tRNA plegado presenta cuatro zonas de dobles hélices, lo cual da lugar a una molécula que, al representarla de forma esquemática, recuerda una hoja de trébol (**Figura 6–52**). Por ejemplo, una secuencia 5'-GCUC-3' de una región de la cadena de nucleótidos puede aparearse de manera relativamente fuerte con una secuencia 5-GAGC-3' de otra región de la misma molécula. La hoja de trébol todavía sufre otro plegamiento, formando una estructura compacta en forma de L que se mantiene plegada gracias a la formación de enlaces de hidrógeno adicionales entre diferentes regiones de la molécula.

Las dos regiones de nucleótidos desapareados situadas en cada extremo de la L son cruciales para el funcionamiento de los tRNA en la síntesis de proteínas. Una de estas regiones forma el **anticodón**, un grupo de tres nucleótidos consecutivos que se aparea con el codón complementario de la molécula de mRNA. La otra es una región corta, de una sola hebra, si-

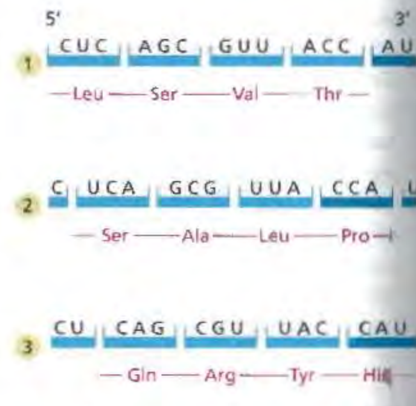
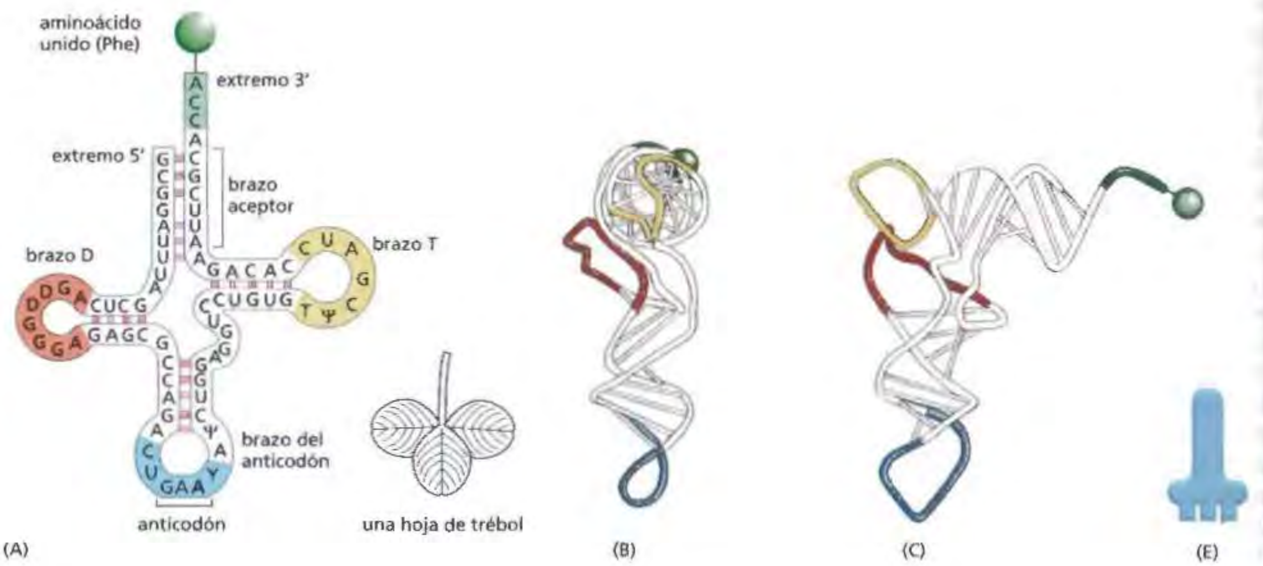


Figura 6–51 Las tres posibles pautas de lectura en la síntesis de proteínas. En el proceso de traducción de una secuencia de nucleótidos (*azul*) a una secuencia de aminoácidos (*rojo*), la secuencia de nucleótidos de la molécula de mRNA se lee desde el extremo 5' al 3' en grupos consecutivos de tres nucleótidos. Por tanto, en principio, la misma secuencia de RNA puede especificar tres secuencias de aminoácidos completamente diferentes según cuál sea la pauta de lectura que se siga. En realidad, sólo una de estas tres pautas de lectura contiene el mensaje real.



5' GCGGAUUUAGCUCAGDDGGGAGAGCGCCAGACUGAAYAΨCUGGAGGUCCUGUGTΨCGAUCCACAGAAUUCGCACCA 3'
(D) anticodón

Figura 6–52 Una molécula de tRNA. Un tRNA específico del aminoácido fenilalanina (Phe), representado de varias maneras. (A) Estructura en hoja de trébol, que muestra el apareamiento de bases complementarias (*líneas rojas*) que generan las estructuras en doble hélice de la molécula. El anticodón es la secuencia de tres nucleótidos que se aparea con un codón del mRNA. El aminoácido correspondiente al par codón/anticodón se une al extremo 3' del tRNA. Los tRNA contienen algunas bases poco frecuentes, generadas por modificación química cuando el tRNA se ha sintetizado. Por ejemplo, las bases denominadas ψ (pseudouridina –véase la Figura 6–43) y D (desoxiuridina –véase la Figura 6–55) derivan de la modificación química del uracilo. (B y C) Dos vistas de la estructura de la molécula, en forma de L, basadas en la difracción de rayos X. Aunque este diagrama representa el tRNA del aminoácido fenilalanina, todos los demás tRNA tienen unas estructuras similares. <CGCA> (D) Secuencia lineal de nucleótidos de la molécula, con las regiones coloreadas correspondientes a los esquemas (A), (B) y (C). (E) Icono utilizado en este libro para representar el tRNA.

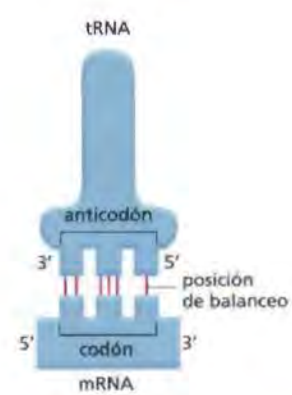
unida en el extremo 3' de la molécula; éste es el sitio donde se une al tRNA el aminoácido que se corresponde con el codón.

En la sección anterior se indicó que el código genético es redundante; es decir, que varios codones diferentes especifican el mismo aminoácido (véase la Figura 6–50). Esta redundancia implica que existe más de una molécula de tRNA para muchos aminoácidos o que algunas moléculas de tRNA se pueden aparear con más de un codón. De hecho, ambas situaciones son ciertas. Algunos aminoácidos tienen más de un tRNA y algunos tRNA están construidos de tal manera que sólo requieren un apareamiento de bases correcto entre las dos primeras posiciones del codón, tolerando un desapareamiento (o *balanceo*) en la tercera posición (**Figura 6–53**). Este balanceo en el apareamiento de bases explica por qué ocurre con tanta frecuencia que varios codones alternativos para un mismo aminoácido sólo se diferencien entre sí en el nucleótido situado en la tercera posición (véase la Figura 6–50). En las bacterias, el balanceo del apareamiento de bases hace posible encajar los 20 aminoácidos en los 61 codones con tan sólo 31 moléculas diferentes de tRNA. Sin embargo, el número exacto de tipos diferentes de tRNA difiere entre especies. Por ejemplo, los seres humanos tenemos alrededor de 500 genes de tRNA pero, entre todos ellos, sólo hay representados 48 anticodones diferentes.

Los tRNA son modificados covalentemente antes de salir del núcleo

Como la mayoría de los otros RNA eucariotas, los tRNA son modificados covalentemente antes de poder salir del núcleo. Los tRNA eucariotas son sintetizados por la RNA polimerasa III. Tanto los tRNA bacterianos como los eucariotas suelen ser sintetizados en forma de precursores más largos que van siendo recortados hasta fabricar los tRNA maduros. Además, algunos precursores de tRNA (tanto en bacterias como en eucariotas) contienen intrones que deben ser eliminados. Esta reacción de maduración es químicamente diferente de la de la maduración de los pre-mRNA; en lugar de generarse un lazo, la maduración del tRNA utiliza un mecanismo de "cortar y pegar" catalizado por proteínas (**Figura 6–54**). Tanto el proceso de recorte como el de la maduración requieren que el tRNA precursor esté plegado correctamente en su configuración de hoja de trébol. Los tRNA precursores mal plegados no pueden ser procesados de forma correcta, por lo que las reacciones de recorte y de maduración actúan como pasos de control de calidad en la generación de los tRNA.

Además, todos los tRNA están modificados químicamente –cerca de uno de cada 10 nucleótidos de la molécula de tRNA madura es una versión alterada del ribonucleótido estándar de G, U, C o A. Se conocen más de 50 tipos diferentes de modificaciones de los nucleótidos del tRNA; en la **Figura 6–55** se muestran algunas de ellas. Algunos de los nucleótidos modificados –el más notable, la inosina, procedente de la desaminación de la adenosina– afectan la conformación y apareamiento de bases del anticodón, por lo que facilitan el reconocimiento por parte de la molécula de tRNA, del codón de mRNA apropiado (véase la Figura 6–53). Otros afectan a la precisión con la que el tRNA se une al aminoácido correcto.



bacterias

base del codón en posición de balanceo	posibles bases del anticodón
U	A, G o I
C	G o I
A	U o I
G	C o U

eucariotas

base del codón en posición de balanceo	posibles bases del anticodón
U	A, G o I
C	G o I
A	U
G	C

Figura 6–53 **Balanceo en el apareamiento de bases entre los codones y los anticodones.** Si el nucleótido de la primera columna está presente en la tercera posición del codón, o posición de balanceo, puede aparearse con cualquiera de los nucleótidos de la segunda columna. Así, por ejemplo, cuando en la posición de balanceo del anticodón del tRNA hay una inosina (I), el tRNA puede reconocer a tres codones diferentes en bacterias y dos codones diferentes en eucariotas. La inosina de los tRNA se forma por desaminación de la guanina (véase la Figura 6–55), una modificación química que tiene lugar después de la síntesis del tRNA. Los pares de bases no estándar, incluyendo aquellos en los que participa la inosina, suelen ser más débiles que los pares de bases convencionales. Cabe destacar que el apareamiento de bases entre el codón y el anticodón es más estricto en las posiciones 1 y 2 del codón, en las que sólo se permiten apareamientos de bases convencionales. Probablemente las diferencias en las interacciones entre pares de bases con balanceo entre bacterias y eucariotas son resultado de pequeñas diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos y los eucariotas, las máquinas moleculares que llevan a cabo la síntesis de las proteínas. (Adaptado de C. Guthrie y J. Abelson, en The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Metabolism and Gene Expression, pp. 487-528. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.)



Figura 6–54 Estructura de una endonucleasa de maduración de tRNA anclada a un tRNA precursor. La endonucleasa (una enzima de cuatro subunidades) elimina el intrón del tRNA (*azul*). Una segunda enzima, una tRNA ligasa multifuncional (no mostrada), vuelve a unir las dos partes del tRNA. (Cortesía de Hong Li, Christopher Trotta y John Abelson.)

Unas enzimas específicas acoplan cada aminoácido con la molécula de tRNA apropiada

Para leer el código genético, la célula fabrica una serie de tRNA diferentes. Consideraremos, ahora, de qué manera se une cada molécula de tRNA con el único de los 20 aminoácidos que constituye su pareja adecuada. El reconocimiento y la unión del aminoácido correcto depende de unas enzimas llamadas **aminoacil-tRNA sintetasas**, que unen covalentemente cada aminoácido con el tRNA apropiado (**Figura 6–56** y **Figura 6–57**). La mayoría de las células tienen una sintetasa diferente para cada aminoácido (es decir, 20 sintetasas en total); una de ellas une la glicina a todos los tRNA que reconocen la glicina, otra une la alanina a todos los tRNA que reconocen codones de alanina, etc. Sin embargo, muchas bacterias tienen menos de 20 sintetasas, de forma que una misma sintetasa es capaz de acoplar más de un aminoácido a sus tRNA apropiados. En estos casos, una misma sintetasa coloca aminoácidos idénticos en dos tipos diferentes de tRNA, sólo uno de los cuales tiene el anticodón que corresponde al aminoácido. Una segunda enzima modifica químicamente cada aminoácido unido de forma incorrecta, de modo que corresponda al anticodón del tRNA al que se encuentra unido covalentemente.

La reacción catalizada por la sintetasa que une el aminoácido al extremo 3' del tRNA es una de las muchas reacciones que están acopladas a la liberación de energía producida en la

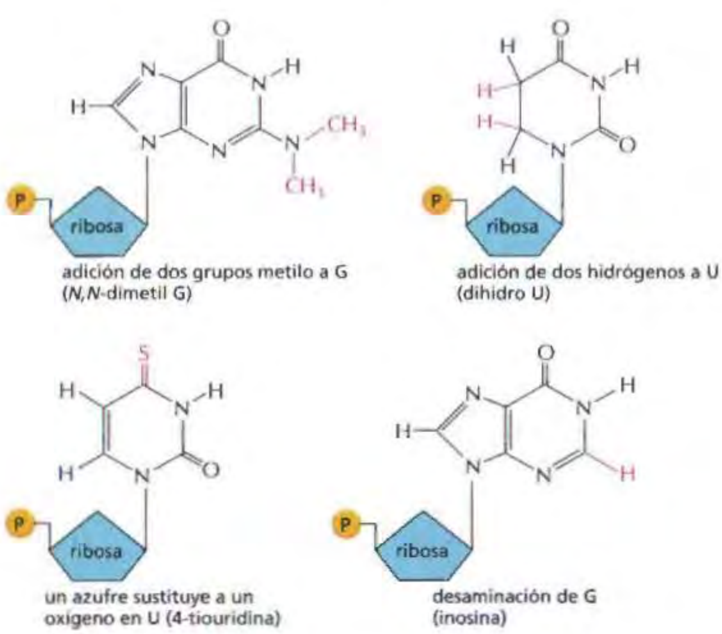


Figura 6–55 Algunos de los nucleótidos poco comunes hallados en las moléculas de tRNA. Estos nucleótidos se fabrican por modificación covalente de un nucleótido normal, después de que éste haya sido incorporado a la cadena de RNA. En la Figura 6–43 se muestran otros dos tipos de nucleótidos modificados. En la mayoría de las moléculas de tRNA, aproximadamente el 10% de los nucleótidos está modificado (véase la Figura 6–52).

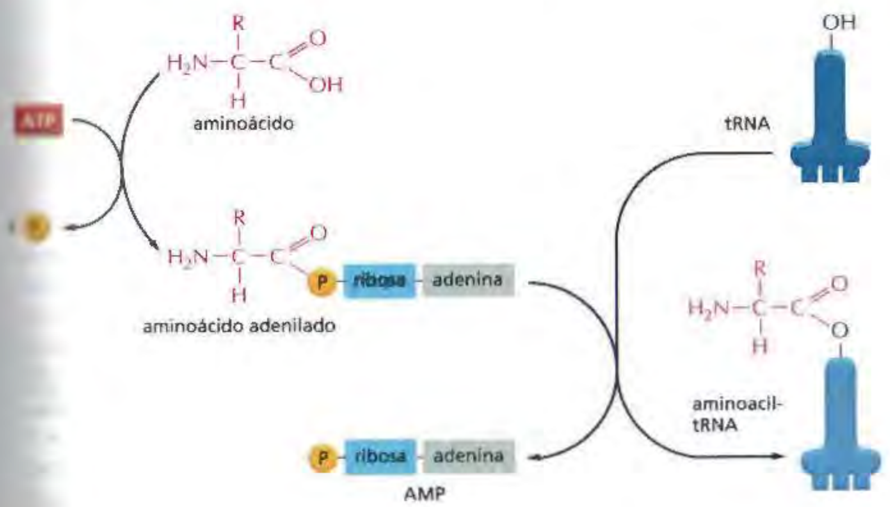


Figura 6–56 Activación de los aminoácidos. Proceso, en dos etapas, por el cual un aminoácido es activado mediante una aminoacil-tRNA sintetasa para la síntesis proteica. Como se indica, se utiliza la energía de la hidrólisis del ATP para unir cada aminoácido a su correspondiente molécula de tRNA mediante un enlace de alta energía. En primer lugar, el aminoácido es activado mediante la unión de su grupo carboxilo directamente a un grupo AMP, formando un *aminoácido adenilado*; la unión del AMP, por lo general una reacción desfavorable, se consigue mediante la hidrólisis de la molécula de ATP que aporta el AMP. Sin abandonar la sintetasa, el grupo carboxilo del aminoácido unido al AMP es transferido al grupo hidroxilo del azúcar del extremo 3' de la molécula de tRNA. Esta transferencia une el aminoácido al tRNA mediante un éster activado y genera la molécula final de aminoacil-tRNA. La sintetasa no se muestra en este esquema.

hidrólisis del ATP (véase pp. 79–81) y permite fabricar un enlace de alta energía entre el tRNA y el aminoácido. La energía de este enlace se utilizará más tarde para unir covalentemente el aminoácido a la cadena polipeptídica que se está fabricando durante la síntesis de proteínas.

Las aminoacil-tRNA sintetasas y los tRNA tienen la misma importancia en el proceso de decodificación (**Figura 6–58**). Esta importancia se estableció mediante un experimento en el que un aminoácido (cisteína) era convertido químicamente en otro aminoácido (alanina) una vez incorporado ya a su tRNA específico. Cuando se utilizaban estas moléculas de aminoacil-tRNA "híbridas" en la síntesis de proteínas en un sistema libre de células, se insertaba siempre el aminoácido equivocado en cada punto de la cadena polipeptídica en el que se tenía que utilizar ese tRNA. Aunque, como veremos, las células tienen varios mecanismos de control de calidad para evitar este tipo de error, el experimento demuestra que el código genético es traducido por dos series de adaptadores que actúan de forma secuencial. Cada uno encaja en la superficie molecular del otro con gran especificidad, y es su acción combinada la que asocia cada secuencia de tres nucleótidos de la molécula de mRNA –es decir, cada codón– con su aminoácido particular.

La edición mediante RNA sintetasas asegura la precisión

Existen varios mecanismos complementarios que aseguran que la tRNA sintetasa une el aminoácido correcto a cada tRNA. En primer lugar, cada sintetasa debe seleccionar el aminoácido correcto. Muchas de ellas lo hacen mediante un mecanismo que consta de dos pasos. Primero, el aminoácido apropiado es el que presenta mayor afinidad por el "bolsillo" del centro activo de su sintetasa y, por lo tanto, su unión es más favorable que la de los otros 19 aminoácidos. En particular, aquellos aminoácidos mayores que el correcto son excluidos con toda eficacia del centro activo. Sin embargo, este mecanismo de un solo paso tiene gran-

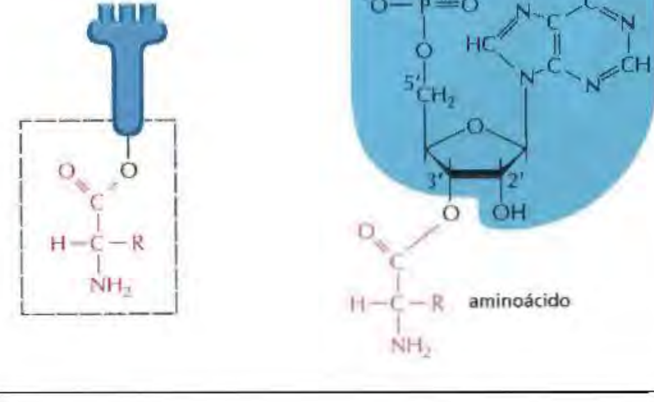


Figura 6–57 Estructura de la unión del aminoacil-tRNA. El extremo carboxilo del aminoácido forma un enlace éster con la ribosa. Dado que la hidrólisis de este enlace éster está asociado con un gran cambio favorable de energía libre, se dice que un aminoácido unido de esta manera está activado. (A) Esquema de la estructura. El aminoácido está unido al nucleótido del extremo 3' del tRNA (véase la Figura 6–52). (B) Estructura real correspondiente a la región recuadrada en (A). Hay dos grandes clases de sintetasas: una une el aminoácido directamente al grupo 3'-OH de la ribosa y la otra lo une inicialmente al grupo 2'-OH. En este segundo caso, tiene lugar una reacción de transesterificación posterior, que lo desplaza a la posición 3'. Al igual que en la Figura 6–56, el "grupo R" señala la cadena lateral del aminoácido.

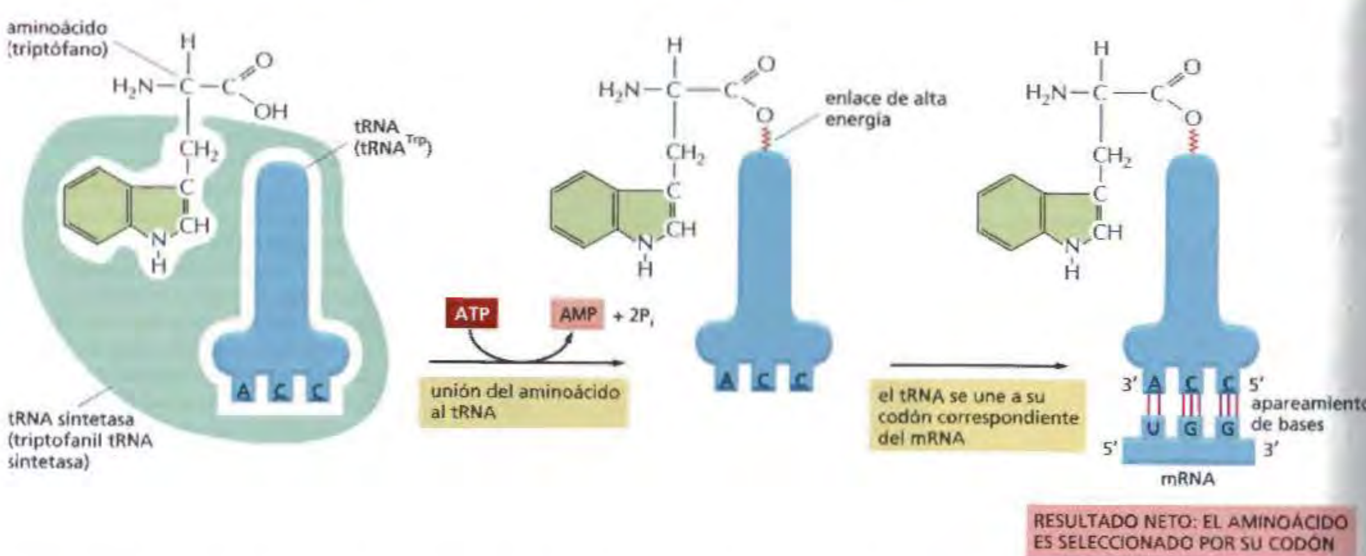


Figura 6–58 La información genética del mRNA se traduce mediante dos adaptadores que actúan uno a continuación del otro. El primer adaptador es la aminoacil-tRNA sintetasa, que acopla un aminoácido a su correspondiente tRNA; el segundo adaptador es la propia molécula de tRNA, cuyo *anticodón* se une mediante apareamiento de bases con el *codón* apropiado del mRNA. Un error en cualquiera de los dos pasos provocaría la incorporación de un aminoácido erróneo en la cadena proteica. En la secuencia mostrada en la figura, el aminoácido triptófano (Trp) es seleccionado por el codón UGG del mRNA.

des dificultades para discriminar adecuadamente entre dos aminoácidos muy similares, como la isoleucina y la valina (que se diferencian en un solo grupo metilo). Por ello, existe un segundo paso de discriminación que tiene lugar una vez el aminoácido se ha unido covalentemente al AMP (véase la Figura 6–56). Cuando el tRNA se une a la sintetasa, intenta forzar al aminoácido a que entre en un segundo "bolsillo" de la enzima, cuyas dimensiones precisas impiden la entrada del aminoácido correcto pero no la de aminoácidos muy similares. Una vez ha entrado el aminoácido en este segundo "bolsillo", se hidroliza su unión al AMP (o al tRNA si el enlace del aminoacil-tRNA ya se había formado) y se expulsa de la enzima. La edición hidrolítica, análoga a la corrección de pruebas exonucleotídica que llevan a cabo las DNA polimerasas (**Figura 6–59**), incrementa la precisión global de la carga de los tRNA a aproximadamente un error cada 40.000 reacciones de acoplamiento.

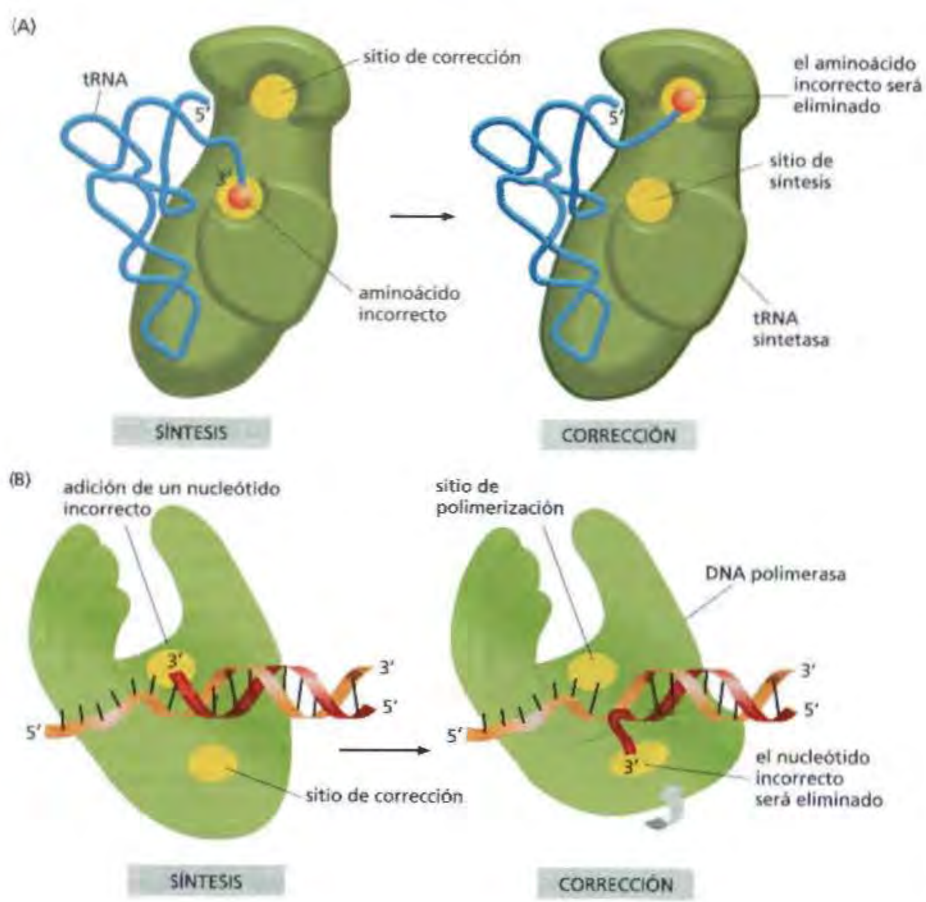


Figura 6–59 Edición hidrolítica. (A) Las tRNA sintetasas corrigen sus propios errores mediante la edición hidrolítica de los aminoácidos incorporados incorrectamente. Como se describe en el texto, el aminoácido correcto es expulsado del sitio de corrección. (B) El proceso de corrección de errores realizado por las DNA polimerasas muestra algunas similitudes; sin embargo, la principal diferencia consiste en que el proceso de eliminación depende sobre todo del mal apareamiento con la hebra molde (véase la Figura 5–8).

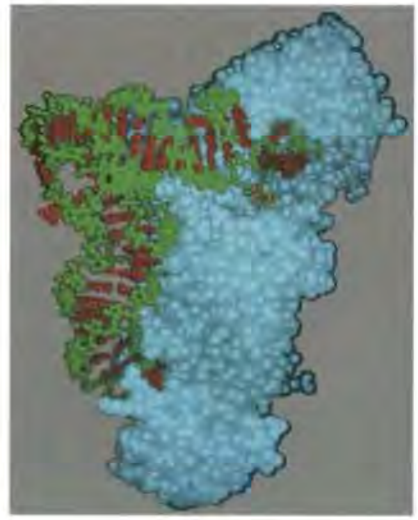


Figura 6–60 Reconocimiento de una molécula de tRNA por parte de su aminoacil-tRNA sintetasa. En el caso de este tRNA ($tRNA^{Gln}$), los rasgos del tRNA reconocidos por la sintetasa (*azul*) son ciertos nucleótidos específicos del anticodón (*abajo*) y el brazo aceptor del aminoácido. Una molécula de ATP unida se representa en *amarillo*. (Cortesía de Tom Steiz.)

La tRNA sintetasa también puede reconocer el grupo correcto de moléculas de tRNA gracias a que la extensa complementariedad estructural y química entre la sintetasa y el tRNA permite que la sintetasa identifique varias características del tRNA (**Figura 6–60**). La mayoría de las tRNA sintetasas reconocen directamente el anticodón del tRNA correspondiente; estas sintetasas contienen tres "bolsillos" adyacentes de unión a nucleótidos, cada uno de los cuales es complementario en estructura y carga eléctrica a uno de los nucleótidos del anticodón. En otras sintetasas, la secuencia de nucleótidos del brazo aceptor del tRNA resulta clave en el reconocimiento. De todas formas, en la mayoría de los casos, la sintetasa "lee" varios nucleótidos diferentes situados en distintas posiciones del tRNA.

Los aminoácidos se añaden al extremo C-terminal de la cadena polipeptídica en crecimiento

Ahora que ya hemos visto cómo se unen los aminoácidos a las moléculas de tRNA, describiremos el mecanismo que une los aminoácidos entre sí formando proteínas. La reacción fundamental de la síntesis de proteínas es la formación del enlace peptídico entre el grupo carboxilo de un extremo de la cadena polipeptídica en crecimiento y el grupo amino libre del aminoácido siguiente que va a incorporarse a la proteína. Por lo tanto, la proteína se sintetiza paso a paso desde su extremo N-terminal hacia su extremo C-terminal. A lo largo de todo el proceso, el extremo carboxilo de la cadena polipeptídica permanece activado gracias a su unión covalente a una molécula de tRNA (formando una molécula de peptidil-tRNA). Cada adición rompe este eulace covalente de alta energía pero es inmediatamente reemplazado por un enlace idéntico en el último aminoácido añadido (**Figura 6–61**). De esta forma, cada aminoácido añadido aporta la energía de activación necesaria, más que para su propia adición, para la adición del siguiente aminoácido –un ejemplo del tipo de polimerización de "crecimiento por la cabeza" descrito en la Figura 2–68.

El mensaje del RNA es descodificado en los ribosomas

La síntesis de proteínas está guiada por la información contenida en las moléculas de mRNA. Para mantener la pauta de lectura correcta y asegurar la precisión de la traducción (aproximadamente 1 error cada 10.000 aminoácidos), la síntesis de proteínas se lleva a cabo en el **ribosoma**, una compleja máquina catalítica compuesta por más de 50 proteínas diferentes (las *proteínas ribosómicas*) y varias moléculas de RNA, los **RNA ribosómicos (rRNA)**. <CGCC> Una célula eucariota típica tiene millones de ribosomas en su citoplasma (**Figura 6–62**). Las subunidades de los ribosomas eucariotas se ensamblan en el nucleolo, donde los nuevos

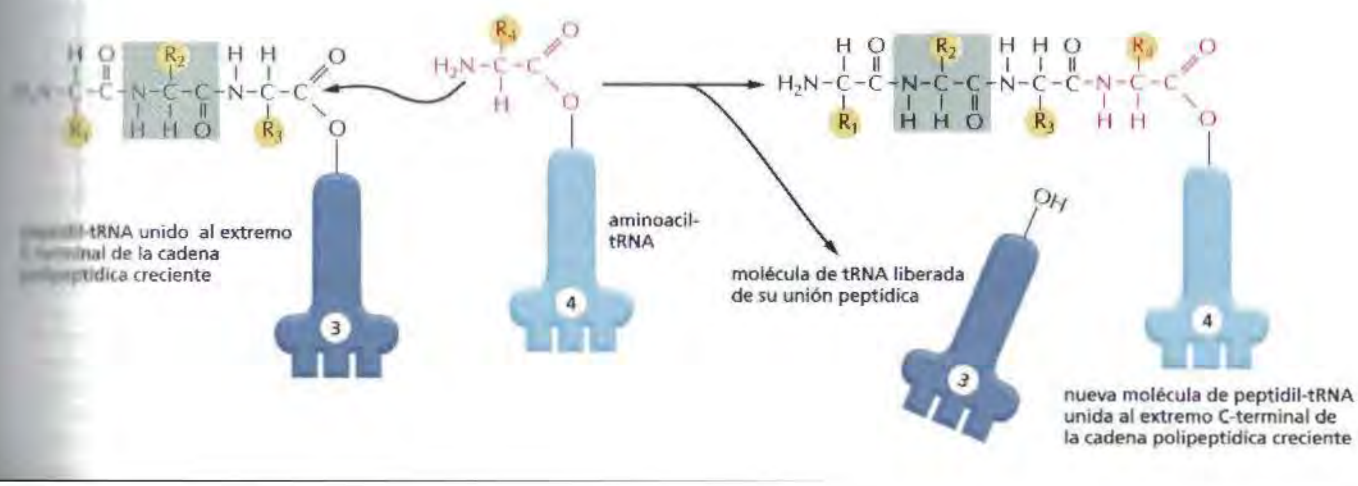


Figura 6–61 Incorporación de un aminoácido a una proteína. Una cadena polipeptídica crece mediante la adición secuencial de aminoácidos a su extremo C-terminal. La formación de cada enlace peptídico es energéticamente favorable, ya que el extremo C-terminal está activado mediante la unión covalente a una molécula de tRNA. El enlace del peptidil-tRNA que activa el extremo C-terminal se regenera durante cada adición. Las cadenas laterales de los aminoácidos han sido abreviadas como R_1, R_2, R_3 y R_4; como punto de referencia, todos los átomos del segundo aminoácido de la cadena polipeptídica han sido sombreados en *gris*. La figura muestra la adición del cuarto aminoácido (*rojo*) a la cadena.

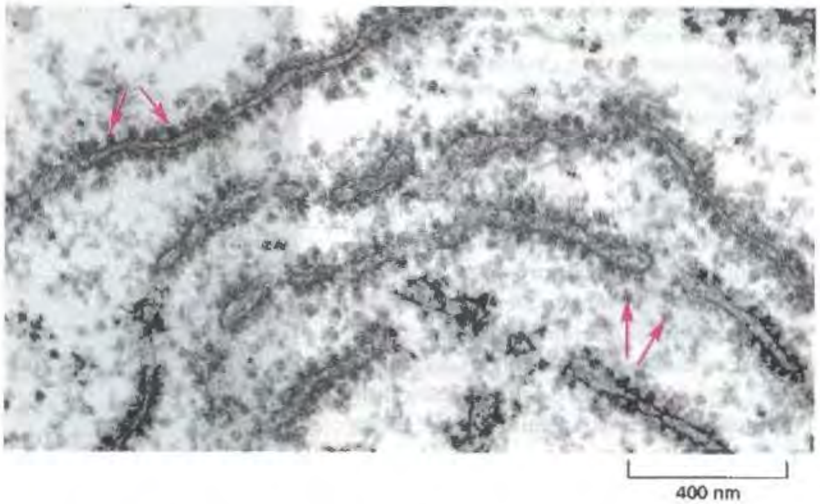


Figura 6-62 Ribosomas en el citoplasma de una célula eucariota. La electromicrografía muestra una sección ultrafina de una pequeña región del citoplasma. Los ribosomas aparecen como puntos negros (*flechas rojas*). Algunos de ellos están libres en el citosol; otros están unidos a la membrana del retículo endoplasmático. (Cortesía de Daniel S. Friend.)

rRNA transcritos y modificados se asocian con las proteínas ribosómicas, que han sido importadas al núcleo tras su síntesis en el citoplasma. Una vez ensambladas, las dos subunidades ribosómicas son exportadas al citoplasma, donde se unen entre sí y llevan a cabo la síntesis de proteínas.

Los ribosomas de los eucariotas son muy parecidos en cuanto a diseño y función a los de los procariotas. Ambos están formados por una subunidad mayor y una menor que encajan una en la otra, formando el ribosoma completo, con una masa molecular de varios millo-

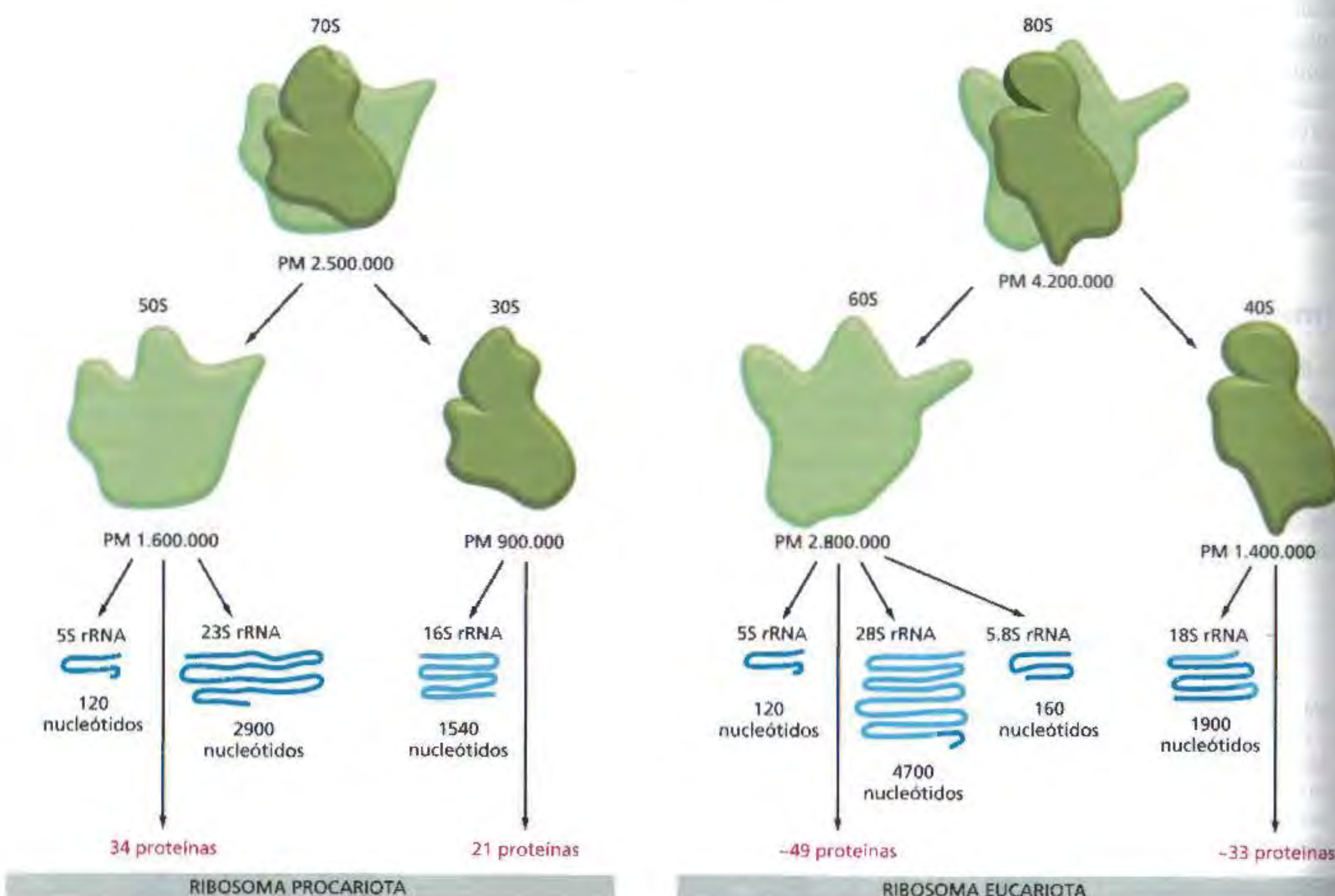
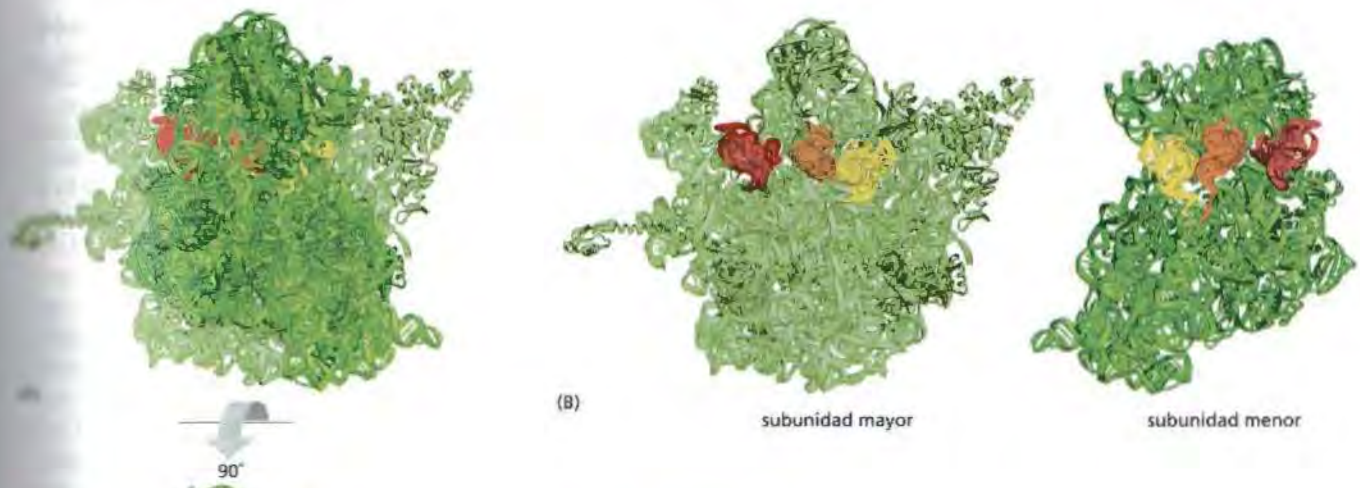


Figura 6-63 Comparación de las estructuras de los ribosomas procariotas y eucariotas. A pesar de las diferencias en el número y tamaño de sus componentes de RNA y de proteína, los ribosomas tanto procariotas como eucariotas tienen prácticamente la misma estructura y actúan de forma similar. Aunque los rRNA 18S y 28S de los ribosomas eucariotas contienen muchos nucleótidos que no están presentes en los ribosomas bacterianos, estos nucleótidos están presentes en forma de muchas inserciones que forman dominios extra y dejan la estructura básica de cada rRNA prácticamente inalterada.



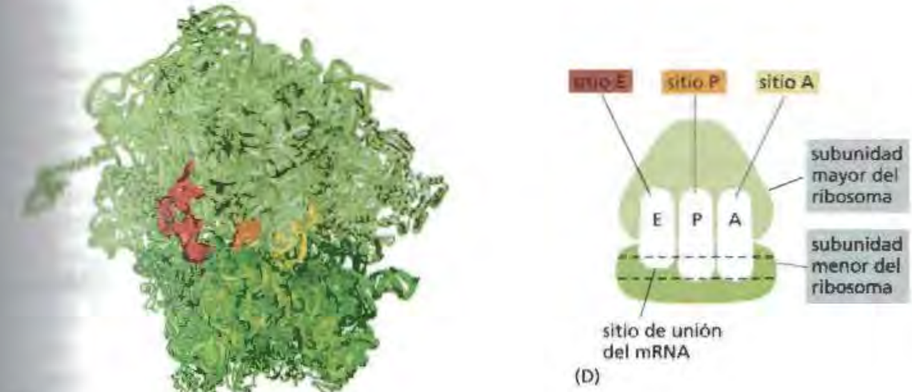


Figura 6–64 Sitios de unión al RNA en el ribosoma. Cada ribosoma tiene un sitio de unión para el mRNA y tres sitios de unión al tRNA, los sitios A, P y E (abreviaturas de aminoacil-tRNA, peptidil-tRNA y expulsión, respectivamente). (A) Un ribosoma bacteriano visto con la subunidad menor al frente (*verde oscuro*) y la subunidad mayor al fondo (*verde claro*). Se muestran tanto los rRNA como las proteínas. Se muestran tres tRNA unidos al sitio E (*rojo*), al sitio P (*naranja*) y al sitio A (*amarillo*). Aunque se muestran ocupados los tres sitios de unión, durante el proceso de síntesis proteica sólo están ocupados simultáneamente dos de ellos (véase la Figura 6–66). (B) Subunidades mayor y menor dispuestas como si el ribosoma de (A) estuviera abierto como un libro. (C) Ribosoma representado en (A) girado 90° y colocado con la subunidad mayor en la parte superior y la subunidad menor en la parte inferior. (D) Representación esquemática de un ribosoma (en la misma orientación que en C), que será utilizada en las demás figuras. (A, B y C, adaptado de M.M. Yusupov et al., *Science* 292:883-896, 2001. Con la autorización de AAAS; cortesía de Albion Baucom y Harry Noller.)

de dalton (**Figura 6–63**). La subunidad menor constituye el soporte sobre el que los tRNA pueden aparearse correctamente con los codones del mRNA (véase la Figura 6–58), mientras que la subunidad mayor cataliza la formación de los enlaces peptídicos que unen los aminoácidos en una cadena polipeptídica (véase la Figura 6–61).

Cuando no están fabricando una proteína, las dos subunidades del ribosoma están disociadas. Se unen sobre una molécula de mRNA, generalmente cerca de su extremo 5', e inician la síntesis de una proteína. A continuación, el mRNA va siendo empujado a través del ribosoma; a medida que sus codones entran en el centro del ribosoma, la secuencia de nucleótidos del mRNA se traduce a la secuencia de aminoácidos utilizando los tRNA como adaptadores para añadir cada aminoácido, en la secuencia correcta, al extremo de la cadena polipeptídica creciente. Cuando se encuentra un codón de paro, el ribosoma libera la proteína terminada y sus dos subunidades se disocian de nuevo, con lo que pueden ser utilizadas para sintetizar otra proteína a partir de otra molécula de mRNA.

Los ribosomas actúan con una eficiencia destacable: en un segundo, un ribosoma de una célula eucariota añade 2 aminoácidos a la cadena polipeptídica; los ribosomas bacterianos actúan incluso más deprisa, a una velocidad de unos 20 aminoácidos por segundo. ¿Cómo puede el ribosoma dirigir la coreografía coordinada de tantos movimientos necesarios para realizar eficazmente una traducción? Cada ribosoma contiene cuatro centros de unión para las moléculas de RNA: uno de ellos es el centro de unión del mRNA y los otros tres (llamados los centros A, P y E) son los centros de unión de los tRNA (**Figura 6–64**). En los centros A y P se puede unir una molécula de tRNA con fuerza suficiente, sólo si su anticodón está apareado con el codón complementario (aunque en algunos casos se tolera un cierto balanceo de la molécula de mRNA que está ensartada en el ribosoma (**Figura 6–65**). Los centros A y P están lo suficientemente próximos como para que sus dos moléculas de tRNA se vean obligadas a aparearse con dos codones adyacentes de la molécula de mRNA. Esta característica del ribosoma permite mantener correcta la pauta de lectura del mRNA.

Cuando se ha iniciado la síntesis de proteínas, cada nuevo aminoácido es añadido a la cadena polipeptídica mediante un ciclo de reacciones constituido por cuatro etapas principales: la unión del tRNA, la formación del enlace peptídico y la translocación de la subunidad mayor y de la subunidad menor. Como resultado de las dos etapas de translocación, el



Figura 6–65 Trayectoria del mRNA (*azul*) a través de la subunidad pequeña del ribosoma. La orientación es la misma que en el panel derecho de la Figura 6–64B. (Cortesía de Harry F. Noller, basado en datos de G.Z. Yusopova et al., *Cell* 106:233-241, 2001. Con la autorización de Elsevier.)

ribosoma completo se desplaza tres nucleótidos a lo largo del mRNA y se coloca de forma adecuada para iniciar el nuevo ciclo (**Figura 6–66**). Nuestra descripción del proceso de elongación empieza en el momento en que ya se han incorporado algunos aminoácidos a la cadena polipeptídica, que está unida covalentemente a una molécula de tRNA situada en el centro P del ribosoma. En el paso 1, un tRNA que transporta el próximo aminoácido que se debe incorporar a la proteína, se une al centro A mediante el apareamiento de su anticodón con el codón del mRNA situado frente a él, de manera que tanto el centro P como el A tienen unido un tRNA. En el paso 2, el extremo carboxilo de la cadena polipeptídica se desprende de su tRNA en el centro P (mediante la rotura del enlace de alta energía entre el tRNA y la cadena polipeptídica) y se une al grupo amino libre del aminoácido unido al tRNA del centro A, formándose un nuevo enlace peptídico. Esta reacción, central en la síntesis de proteínas, está catalizada por una *peptidil transferasa* contenida en la subunidad mayor del ribosoma. En el paso 3, la subunidad mayor se desplaza en relación al mRNA que está unido a la subunidad pequeña, cambiando así los lugares aceptores de los dos tRNA a los lugares E y P de la subunidad mayor. En el paso 4, otra serie de cambios conformacionales desplaza la subunidad menor y el mRNA al que está unido, exactamente tres nucleótidos, y deja al ribosoma preparado para recibir el siguiente aminoacil-tRNA. Entonces se repite el paso 1 con el aminoacil-tRNA recién llegado y así sucesivamente. <CGTT>

Este ciclo de cuatro etapas se repite cada vez que se añade un nuevo aminoácido a la cadena polipeptídica, de forma que la cadena va creciendo por su extremo carboxilo terminal.

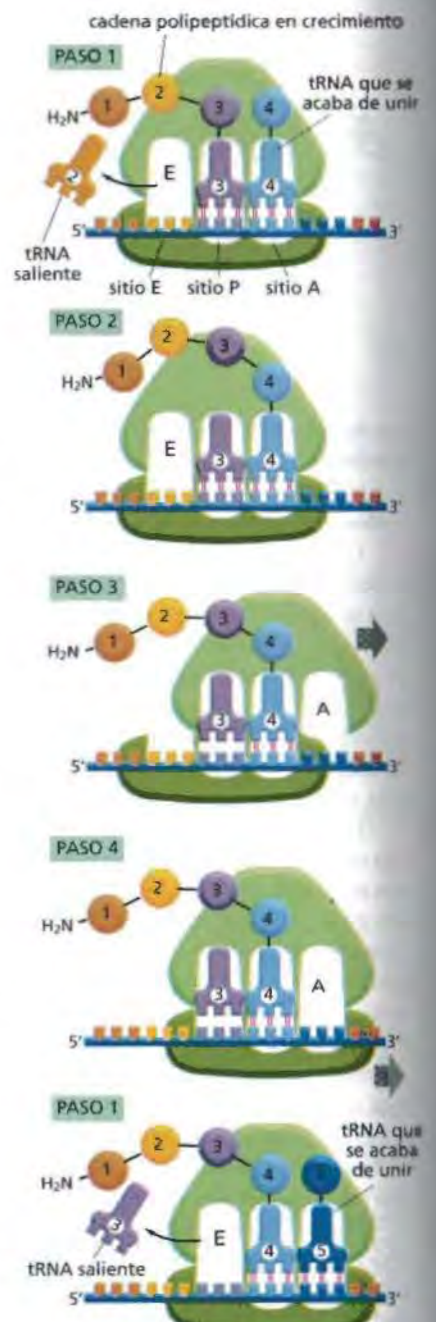


Figura 6–66 Traducción de una molécula de mRNA. Cada aminoácido que se incorpora a la cadena polipeptídica en crecimiento se selecciona por la complementariedad de bases entre el anticodón de la molécula de tRNA a la que se halla unido y el siguiente codón de la cadena de mRNA. A cada codón sólo se le puede unir por complementariedad de bases una de las muchas moléculas de tRNA de la célula, por lo que el codón determina qué aminoácido específico será incorporado a la cadena polipeptídica. El ciclo de cuatro pasos mostrado en esta figura se repite una y otra vez durante la síntesis de una proteína. En el paso 1, una molécula aminoacil-tRNA se une a un sitio A vacío del ribosoma y se elimina del sitio E una molécula de tRNA ya utilizada. En el paso 2 se forma un nuevo enlace peptídico. En el paso 3, la subunidad mayor se desplaza respecto a la subunidad menor, dejando los dos tRNA en sitios híbridos: uno formado por P de la subunidad mayor y A de la subunidad menor, y el otro formado por E de la subunidad mayor y P de la subunidad menor. En el paso 4, la subunidad menor se desplaza llevándose el mRNA a una distancia equivalente a tres nucleótidos a través del ribosoma. Esto "resetea" el ribosoma con una posición A completa y vacía, preparada para aceptar la siguiente molécula de aminoacil-tRNA. Tal como se indica, el mRNA se traduce en dirección 5' a 3' y al principio del proceso se fabrica el extremo N-terminal de la proteína, mientras que el aminoácido que se incorpora en cada ciclo lo hace al extremo C-terminal de la cadena polipeptídica.

Los factores de elongación impulsan la traducción y mejoran su precisión

El ciclo básico de la elongación del péptido que se muestra en la Figura 6–66 presenta una característica adicional que hace la traducción especialmente eficiente y precisa. Durante cada ciclo entran y salen del ribosoma dos *factores de elongación*, cada uno de los cuales hidrolizan GTP a GDP sufriendo cambios conformacionales durante el proceso. Estos factores se denominan EF-Tu y EF-G en las bacterias, y EF1 y EF2 en los eucariotas. Bajo ciertas condiciones *in vitro* los ribosomas pueden ser forzados a sintetizar proteínas sin la ayuda de estos factores de elongación y la hidrólisis de GTP, pero esta síntesis es muy lenta, ineficiente y poco precisa. Acoplando los cambios dirigidos por la hidrólisis de GTP en los factores de elongación con las transiciones entre los diferentes estados del ribosoma, el proceso de síntesis de proteínas se acelera enormemente. Aunque estos estados del ribosoma aún no se comprenden con detalle, casi con toda seguridad implican reorganizaciones de la estructura del RNA del centro del ribosoma. Los ciclos de asociación de los factores de elongación, hidrólisis del GTP y disociación aseguran que todos estos cambios ocurren en el sentido "hacia adelante" de forma que la traducción puede producirse de una manera eficiente (**Figura 6–67**).

Como hemos visto, los EF-Tu se unen simultáneamente a GTP y a un aminoacil-tRNA (véase Figura 3–74). Además de impulsar la traducción, EF-Tu (EF1 en eucariotas) aumenta la precisión de la traducción de diferentes maneras. Primero, al escoltar hasta el ribosoma los aminoacil-tRNA entrantes, EF-Tu comprueba si la pareja tRNA-aminoácido es la correcta. Se desconoce cómo se realiza exactamente esta función. Una teoría propone que las parejas tRNA-aminoácido correctas tienen una afinidad definida por EF-Tu, lo cual permite a EF-Tu discriminar, al menos de forma grosera, entre muchas combinaciones aminoácido-tRNA, uniendo selectivamente al ribosoma las correctas. En segundo lugar, EF-Tu sigue la interacción inicial entre el anticodón de un aminoacil-tRNA entrante y el codón del mRNA en el lugar A. Los aminoacil-tRNA son doblados cuando se unen a la forma de EF-Tu; esta conformación doblada permite emparejarse con el codón, pero impide la incorporación del aminoácido a la cadena polipeptídica en crecimiento. Sin embargo, si el emparejamiento codón-anticodón es correcto, el ribosoma rápidamente dispara la hidrólisis de la molécula de GTP; a continuación EF-Tu libera su unión sobre el tRNA y se disocia del ribosoma permitiendo que el tRNA aporte su aminoácido a la síntesis de la proteína. Sin embargo, ¿cómo se determina que la unión codón-anticodón es o no correcta? Esta hazaña la lleva a cabo el ribosoma a través de un mecanismo que se basa en RNA. El rRNA de la subunidad pequeña del ribosoma forma una serie de enlaces de hidrógeno con la pareja codón-anticodón que le permite determinar si es o no correcta (**Figura 6–68**). En esencia, el rRNA se pliega alrededor de la pareja codón-anticodón y su plegamiento final –que sólo ocurre cuando está colocado un anticodón correcto– dispara la hidrólisis del GTP. Hay que destacar que este mecanismo de unión inducida puede distinguir interacciones codón-anticodón correctas de interacciones incorrectas a pesar de las reglas de balanceo de apareamiento de bases resumidas en la Figura 6–53. A partir de este ejemplo, como en el caso de la maduración del RNA, se percibe la sofisticación extraordinaria de las formas de reconocimiento molecular que son capaces de realizar las moléculas de RNA.

Las interacciones que acabamos de describir entre los EF-Tu, los tRNA y los ribosomas presentan etapas críticas de corrección de pruebas en la síntesis de proteínas durante la selección inicial del tRNA. Sin embargo, después de que el GTP es hidrolizado y el EF-Tu se ha disociado del ribosoma, existe otra oportunidad para el ribosoma de impedir que un aminoácido incorrecto sea añadido a la cadena. Tras la hidrólisis del GTP existe un corto intervalo de tiempo antes de que el aminoácido transportado por el tRNA se desplace a su posición en el ribosoma. Este intervalo es más corto para un apareamiento codón-anticodón correcto que para uno incorrecto. Además, los tRNA colocados de forma incorrecta se disocian con más rapidez que los colocados de forma correcta porque su interacción con el codón es más débil. Así, la mayoría de las moléculas de tRNA unidas de forma incorrecta (así como un

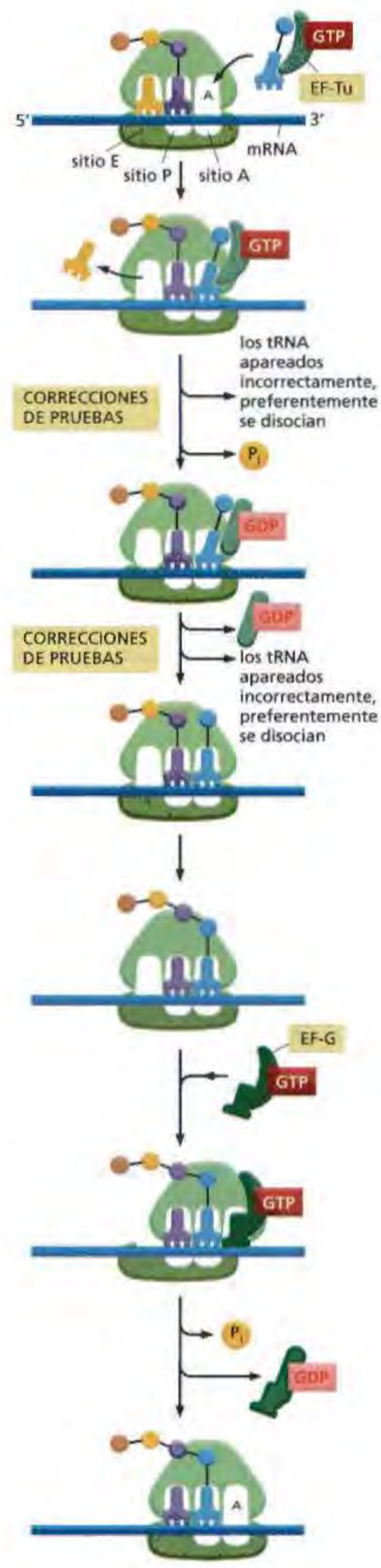


Figura 6–67 Vista detallada del ciclo de traducción. Se ha ampliado el esquema de traducción representado en la Figura 6–66 para mostrar el papel de dos factores de elongación EF-Tu y EF-G, que dirigen el proceso hacia adelante. Como se explica en el texto, EF-Tu además proporciona dos oportunidades de corrección en la correspondencia codón-anticodón. De esta manera, el emparejamiento incorrecto de tRNA es rechazado selectivamente y aumenta la exactitud de la traducción.

número significativo de moléculas unidas correctamente) abandonarán el ribosoma sin haber sido utilizadas para la síntesis de proteínas. Todas estas etapas de corrección de pruebas, en su conjunto, son responsables del 99,99% de la precisión del ribosoma al traducir RNA a proteína.

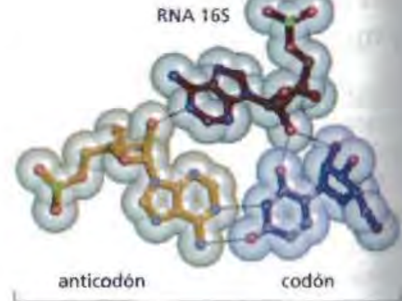


Figura 6-68 Reconocimiento de los apareamientos correctos entre codón y anticodón por el rRNA de la subunidad pequeña del ribosoma. Se muestra la interacción entre un nucleótido del rRNA de la subunidad pequeña y el primer par de nucleótidos de una unión correcta codón-anticodón; interacciones similares a esta ocurren entre otros nucleótidos del rRNA y la segunda y la tercera posiciones de pares codón-anticodón. El rRNA de la subunidad pequeña únicamente puede formar esta red de enlaces de hidrógeno con parejas codón-anticodón correctas. Como se explica en el texto, este seguimiento de apareamientos codón-anticodón que realiza el rRNA de la subunidad pequeña incrementa la fidelidad de la síntesis de proteínas. (De J.M. Ogle et al., *Science* 292:897-902, 2001. Con la autorización de la AAAS.)

El ribosoma es una ribozima

El ribosoma es grande y complejo, compuesto por dos terceras partes de RNA y una tercera parte de proteína. La determinación, en el 2000, de la conformación tridimensional completa de sus subunidades grande y pequeña es el mayor triunfo de la biología estructural moderna. Los hallazgos confirman la evidencia previa de que son los rRNA –y no las proteínas– los responsables de la estructura global del ribosoma, de su habilidad para ubicar los tRNA sobre el mRNA y de su actividad catalítica para formar enlaces peptídicos covalentes. Los RNA ribosómicos están empaquetados en estructuras tridimensionales muy compactas y precisas que forman el núcleo compacto del ribosoma, determinando de este modo su forma global (**Figura 6-69**).

En marcado contraste con las posiciones centrales de los rRNA, las proteínas ribosómicas están localizadas por lo general en la superficie y rellenan los huecos y grietas del RNA empaquetado (**Figura 6-70**). Algunas de estas proteínas de la superficie del ribosoma emiten prolongaciones de su cadena polipeptídica que penetran a una cierta profundidad entre las hendiduras del núcleo de RNA (**Figura 6-71**). El principal papel de las diferentes proteínas ribosómicas parece ser el de estabilizar el núcleo de RNA, permitiendo los cambios de conformación del rRNA que son necesarios para que este RNA pueda catalizar eficientemente la síntesis proteica. Es probable que las proteínas también colaboren en el ensamblaje inicial de los rRNA que forman el núcleo del ribosoma.

No son sólo los sitios A, P y E de unión a los tRNA los que están formados básicamente por RNA ribosómico, sino que también lo está el sitio catalítico para la formación del enlace peptídico, con el aminoácido más cercano situado a más de 1,8 nm de distancia. Este descu-

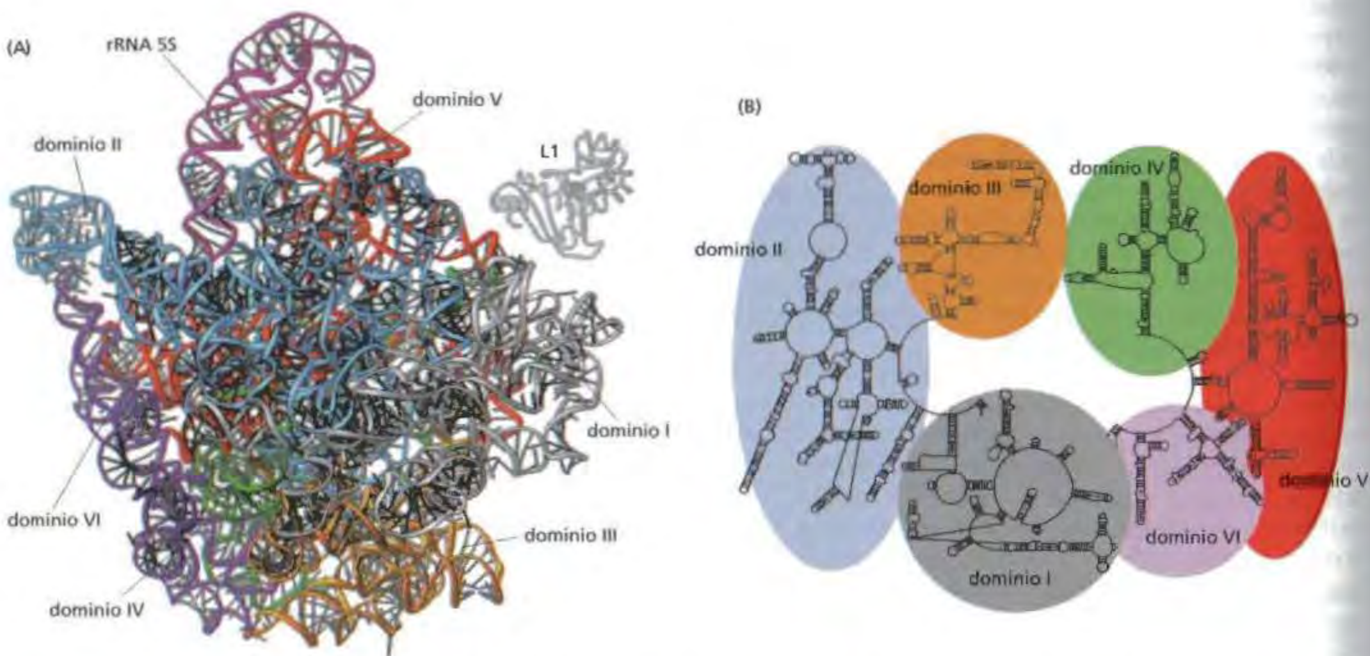


Figura 6-69 Estructura de los rRNA de la subunidad mayor del ribosoma bacteriano determinada por cristalografía de rayos X. (A) Conformaciones tridimensionales de los rRNA de la subunidad mayor (5S y 23S) como aparecen en el ribosoma. También se muestra una de las proteínas del ribosoma (L1) como punto de referencia, ya que forma una protuberancia característica del ribosoma. (B) Esquema de la estructura secundaria del rRNA 23S en el que se muestran las extensas zonas de complementariedad interna de las bases. La estructura se ha dividido en seis "dominios" cuyos colores se corresponden con (A). Este esquema de la estructura secundaria intenta representar el mayor número posible de aspectos estructurales, en la medida que lo permite una representación bidimensional. Para ello, se han introducido algunas discontinuidades en la cadena del RNA, aunque en realidad el rRNA 23S es una única molécula. Por ejemplo, la base del dominio III se continúa con la base del dominio IV, aunque en el diagrama aparezca una discontinuidad. (Adaptado de N. Ban et al., *Science* 289:905-920, 2000. Con autorización de la AAAS.)

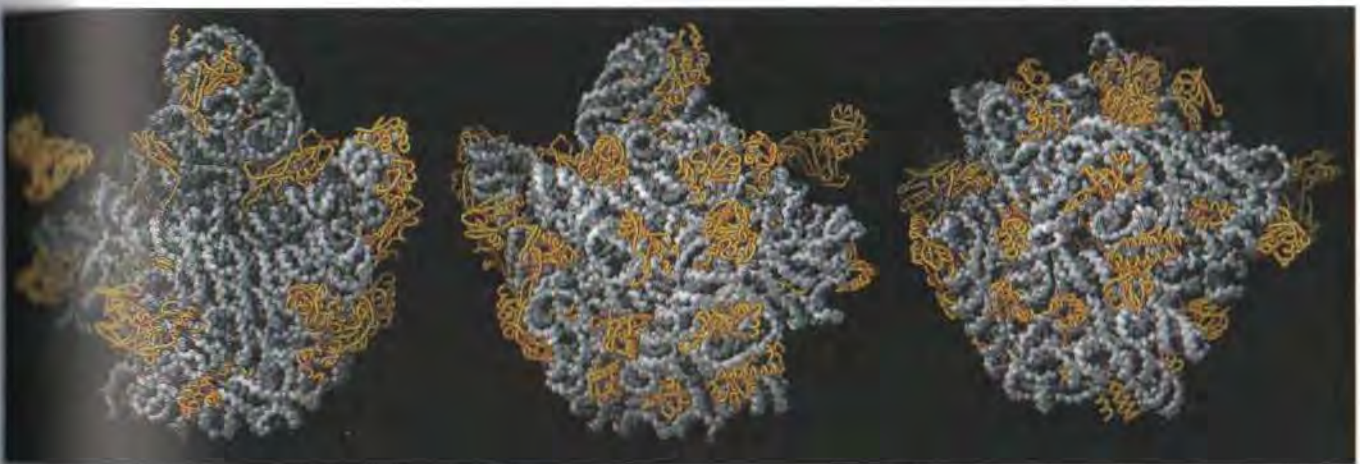


Figura 6-70 Localización de los componentes proteicos de la subunidad mayor del ribosoma bacteriano. Los rRNA (5S y 23S) se presentan en *gris* y las proteínas de la subunidad mayor (27 de un total de 31), en *dorado*. Para simplificar, las estructuras de las proteínas sólo contienen el esqueleto peptídico. (A) Superficie que entra en contacto con la subunidad menor, la misma vista que en la Figura 6-64B. (B) Vista de la cara opuesta a la mostrada en (A), obtenida mediante una rotación de 180º en torno a su eje vertical. (C) Una rotación menor que en (B) sobre el eje diagonal, permite mostrar el canal de salida del péptido en el centro de la estructura. (De N. Ban et al., *Science* 289:905-920, 2000. Con la autorización de AAAS.)

Este descubrimiento resultó ser sorprendente para los biólogos porque, a diferencia de las proteínas, el RNA no contiene grupos funcionales fácilmente ionizables que puedan ser utilizados para catalizar reacciones sofisticadas como lo es la formación de un enlace peptídico. Además, los iones metálicos, utilizados por las moléculas de RNA para catalizar reacciones químicas (como se describe más adelante en este capítulo) no se detectan en el lugar activo del ribosoma. En lugar de ello, parece que el rRNA 23S forma un bolsillo muy estructurado que, a través de una red de enlaces de hidrógeno, orienta de forma precisa las dos moléculas que reaccionan (la cadena polipeptídica y un aminoacil-tRNA) acelerando así en gran medida su unión covalente. Además, el tRNA del lugar P contribuye con el lugar activo quizá suplementando un grupo OH funcional que participa directamente en la catálisis. Este mecanismo puede asegurar que la catálisis sólo ocurra cuando el tRNA está colocado en la posición adecuada en el ribosoma.

Las moléculas de RNA que tienen actividad catalítica se denominan **ribozimas**. Ya hemos visto en este capítulo cómo actúan otras ribozimas en las reacciones de automaduración (p. ej., véase la Figura 6-36). En la sección final de este capítulo consideraremos que la capacidad de las moléculas de RNA para actuar como catalizadores, en una amplia variedad de reacciones diferentes, apunta a una etapa temprana en la evolución de las células. Por ahora destacamos que existen buenas razones para sospechar que fueron las moléculas de RNA, más que las de proteína, las que actuaron como los primeros catalizadores en las células primitivas. Si la hipótesis se confirma, significaría que el ribosoma con su núcleo de RNA podría constituir una reliquia de un tiempo anterior en la historia de la vida –cuando la síntesis de las proteínas evolucionó en unas células gobernadas casi totalmente por ribozimas.



Figura 6-71 Estructura de la proteína L15 de la subunidad mayor del ribosoma bacteriano. El dominio globular de la proteína se encuentra en la superficie del ribosoma y una región extendida penetra profundamente en el núcleo de RNA del ribosoma. La proteína L15 se muestra en *amarillo* y un fragmento del núcleo de RNA del ribosoma, en *rojo*. (De D. Klein, P.B. Moore y T.A. Steitz, *J. Mol. Biol.* 340:141-147, 2004. Con la autorización de Academic Press.)

Unas secuencias de nucleótidos del mRNA indican dónde debe empezar la síntesis de las proteínas

El inicio y la finalización de la traducción comparten características con el ciclo de elongación descrito. El lugar del mRNA donde empieza la síntesis de proteínas es especialmente crucial, ya que establece la pauta de lectura que se utilizará para traducir todo el mensaje. Un error de un nucleótido arriba o abajo de este punto supone que cada codón del mensaje sea leído de forma errónea, dando lugar a una proteína no funcional con una secuencia de aminoácidos incoherente. El proceso de inicio de la traducción también es importante, ya que para la mayoría de los genes es el último punto en el que la célula puede decidir si el mRNA debe ser traducido y la proteína sintetizada, o no. Así, la tasa de inicio es un determinante de la tasa a la que se sintetiza cualquier proteína. En el Capítulo 7 se descubrirá cómo las células utilizan diferentes mecanismos para regular el inicio de la traducción.

La traducción de un mRNA empieza con el codón AUG y se requiere un tRNA especial para empezar la traducción. Este **tRNA iniciador** siempre lleva el aminoácido metionina (las bacterias usan una forma modificada de la metionina: la formilmetionina), de manera que todas la proteínas formadas *de novo* tienen metionina como su primer aminoácido en el extremo N-terminal, que es el extremo por el que empieza a sintetizarse una proteína. Por lo general, esta metionina es eliminada más tarde por una proteasa específica. El tRNA iniciador puede ser reconocido por factores de iniciación porque tiene una secuencia de nucleótidos diferente a la del tRNA que normalmente lleva la metionina.

En eucariotas, el complejo tRNA iniciador-metionina (Met-tRNAi) se carga primero sobre la subunidad menor del ribosoma, acompañado de unas proteínas adicionales llamadas **factores eucariotas de inicio** o **eIF** (*eucaryotic initiation factors*, **Figura 6–72**). De todos los aminoacil-tRNA de la célula, sólo el tRNA iniciador cargado con metionina es capaz de unirse con suficiente fuerza a la subunidad menor del ribosoma sin que esté presente el ribosoma completo; el punto de unión directo es el lugar P. A continuación, la subunidad menor del ribosoma se une al extremo 5' de una molécula de mRNA, que es reconocida mediante su caperuza 5' y los dos factores de inicio que lleva unidos, el eIF4E (que se une directamente a la caperuza) y el eIF4G (véase la Figura 6–40). Entonces, la subunidad menor del ribosoma se desplaza hacia delante (en sentido 5' a 3') a lo largo del mRNA, buscando el primer codón AUG. Otros factores de inicio adicionales, que actúan como helicasas alimentadas por ATP, facilitan el desplazamiento del ribosoma a través de la estructura secundaria del RNA. En el 90% de los mRNA, la traducción empieza en el primer AUG hallado por la subunidad menor. En este punto, los factores de inicio se disocian permitiendo que la subunidad mayor se ensamble con el complejo y complete el ribosoma. El tRNA iniciador todavía está unido al sitio P y deja el sitio A vacante. Por tanto, la síntesis de proteínas está lista para comenzar (véase la Figura 6–72).

Los nucleótidos que flanquean el sitio de inicio de los mRNA eucariotas ejercen una gran influencia sobre la eficiencia del reconocimiento del codón AUG durante el proceso de exploración descrito. Si este sitio de reconocimiento difiere sustancialmente de la secuencia consenso de reconocimiento (5'-ACCAUGG-3'), a veces la subunidad menor del ribosoma puede ignorar el primer codón AUG del mRNA y, en su lugar, saltar al segundo o tercer codón AUG. Las células usan con frecuencia este fenómeno, conocido como "exploración poco exhaustiva", para fabricar dos o más proteínas que se diferencian en sus extremos N-terminales a partir de una misma molécula de mRNA. Ello permite a algunos genes producir la misma proteína, por ejemplo, con una determinada secuencia señal unida a su extremo N-terminal o sin ella, de manera que cada forma de esa proteína se dirigirá hacia compartimientos celulares diferentes.

El mecanismo utilizado para seleccionar un codón de inicio en bacterias es diferente. Los mRNA bacterianos no tienen caperuzas 5' que indiquen al ribosoma dónde tiene que empezar a buscar el inicio de la traducción. En lugar de ello, cada mRNA bacteriano tiene un sitio de unión específico para el ribosoma (llamado secuencia de Shine-Dalgarno, nombrada así en honor a sus descubridores) que está ubicada unos cuantos nucleótidos por delante del codón AUG en el que debe empezar la traducción. Este elemento de reconocimiento, caracterizado por la secuencia consenso 5'-AGGAGGU-3', forma pares de bases con el rRNA 16S de la subunidad menor del ribosoma y ubica el codón AUG de inicio en el ribosoma. Un conjunto de factores iniciadores de la traducción dirigen esta interacción, así como el ensamblaje posterior de la subunidad mayor, hasta completar el ribosoma.

Así pues, a diferencia del ribosoma eucariota, un ribosoma bacteriano puede ensamblarse de forma directa a un codón de inicio situado en el interior de una molécula de mRNA, siempre que el sitio de unión al ribosoma lo preceda en varios nucleótidos. Como resultado de ello, a menudo los mRNA bacterianos son *policistrónicos*, es decir, codifican diferentes proteínas que serán traducidas a partir de una misma molécula de mRNA (**Figura 6–73**). Por el contrario, un mRNA eucariota generalmente codifica una sola proteína.



Figura 6–72 Fase de inicio de la síntesis de proteínas en eucariotas. Sólo se muestran tres de los muchos factores iniciadores de la traducción necesarios. Un inicio eficiente de la traducción también requiere que el poli-A del mRNA esté unido a las proteínas de unión al poli-A que, a su vez, interaccionan con el factor eIF4G. De esta forma, la maquinaria de traducción reconoce que ambos extremos del mRNA están intactos antes de empezar la síntesis de proteínas (véase la Figura 6–40). Aunque en la figura sólo se muestra la hidrólisis de un GTP, se sabe que tiene lugar la hidrólisis de una segunda molécula justo antes de que se unan las subunidades mayor y menor del ribosoma.

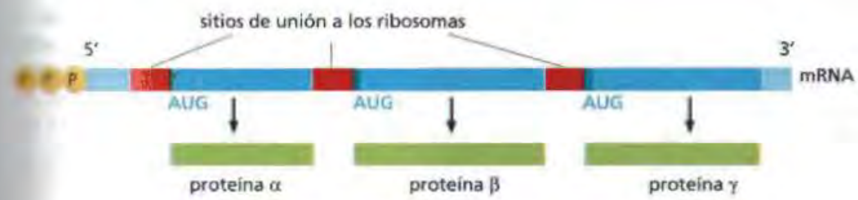


Figura 6–73 Estructura de una molécula de mRNA bacteriano típica. Al contrario que los ribosomas eucariotas, que suelen requerir un extremo 5' provisto de una caperuza, los ribosomas procariotas inician la traducción en las secuencias de unión a los ribosomas (llamadas secuencias de Shine-Dalgarno), que pueden estar localizadas en diferentes puntos de la molécula de mRNA. Esta propiedad de los ribosomas permite a las bacterias sintetizar más de un tipo de proteína a partir de una misma molécula de mRNA.

Los codones de paro marcan el fin de la traducción

El fin del mensaje que codifica una proteína está señalado por la presencia de uno de los tres codones UAA, UAG o UGA, llamados *codones de paro* (véase la Figura 6–50). Estos codones no son reconocidos por ningún tRNA por lo que no especifican ningún aminoácido, sino que indican al ribosoma que debe detener la traducción. Unas proteínas, conocidas como *factores de liberación*, se unen a cualquier ribosoma que tenga un codón de paro situado en el sitio A, forzando a la peptidil transferasa del ribosoma a catalizar la adición de una molécula de agua al peptidil-tRNA en lugar de un aminoácido (**Figura 6–74**). Esta reacción libera el extremo carboxilo de la cadena polipeptídica en crecimiento de su unión a la molécula de tRNA y, dado que normalmente el polipéptido en crecimiento sólo está unido al ribosoma por esta unión, la cadena proteica, ya completada, se libera de inmediato al citoplasma. A continuación, el ribosoma libera el mRNA y se separan las subunidades del ribosoma, que pueden volver a ensamblarse sobre ésta u otra molécula de mRNA, iniciando una nueva ronda de síntesis proteica.

Los factores de liberación constituyen un ejemplo diáfano de *mimetismo molecular*, fenómeno mediante el cual un tipo de macromolécula imita la forma de una molécula no relacionada químicamente con ella. En este caso, la estructura tridimensional de los factores de liberación (constituidos de proteína) se parecen a la forma y la distribución de carga de una molécula de tRNA (**Figura 6–75**). Este mimetismo de forma y de carga facilita la entrada en el sitio A del ribosoma y el fin de la traducción.

Durante la traducción, el polipéptido naciente se desplaza a través de un largo túnel hidrófilo (aproximadamente de 10 nm × 1,5 nm), situado en la subunidad mayor del ribosoma (véase la Figura 6–70C). Las paredes de este túnel, formado sobre todo por el rRNA 23S, son un entramado de minúsculas superficies hidrófobas fijadas en una superficie hidrófila más extensa. Esta estructura, no es complementaria a ningún péptido, por lo que proporciona un revestimiento de "teflón" a través del cual se puede deslizar con facilidad una cadena polipeptídica. Las dimensiones del túnel sugieren que las proteínas nacientes tienen un grado de complejidad estructural muy bajo cuando atraviesan el ribosoma, aunque antes de que la proteína abandone el túnel ribosómico se pueden haber formado algunas regiones de hélice α. Mientras va saliendo del ribosoma, una proteína recién formada debe plegarse y adquirir la conformación tridimensional adecuada para ser útil a la célula. En este mismo capítulo describiremos cómo tiene lugar este plegamiento. En primer lugar, señalaremos algunos aspectos adicionales del proceso de traducción en sí.

Las proteínas se fabrican en los polirribosomas

La síntesis de la mayor parte de las moléculas de proteína tarda entre 20 segundos y algunos minutos. Durante este corto periodo, sin embargo, es habitual que una misma molécula de mRNA, que está siendo traducida, puede ser objeto de muchos inicios de traducción. En cuanto el ribosoma precedente ha traducido un segmento de la secuencia de nucleótidos que deja libre un trozo suficiente de mRNA, el extremo 5' de este mRNA es capturado por un nuevo ribosoma. Por lo tanto, las moléculas de mRNA que se están traduciendo se encuentran habitualmente en forma de *polirribosomas* (o *polisomas*), largos ensamblajes citoplasmáticos formados por varios ribosomas separados entre sí únicamente 80 nucleótidos,

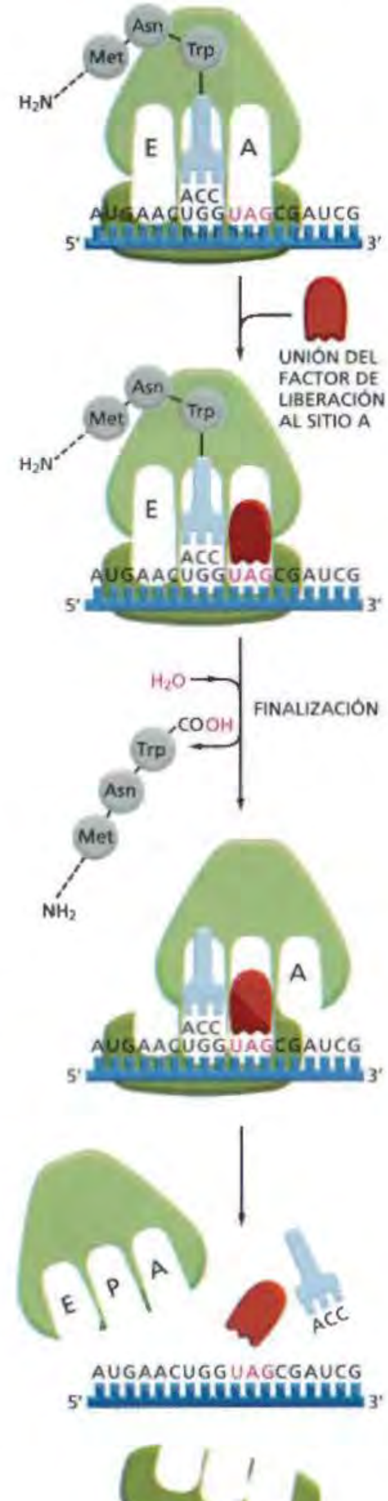


Figura 6–74 Fase final de la síntesis de proteínas. La unión de un factor de liberación al sitio A cuando éste presenta un codón de paro, finaliza la traducción. El polipéptido completo es liberado y, tras una serie de reacciones que requieren la participación de proteínas adicionales y la hidrólisis del GTP (que no se muestran), el ribosoma se disocia en sus dos subunidades individuales.



Figura 6-75 Estructura de un factor de liberación de la traducción humano (eRFI) y su semejanza con una molécula de tRNA. La proteína está a la *izquierda* y el tRNA, a la *derecha*. (De H. Song et al., *Cell* 100:311-321, 2000. Con la autorización de Elsevier.)

situados a lo largo de una misma molécula de mRNA (**Figura 6-76**). Estos inicios múltiples permiten a la célula fabricar muchas más moléculas de proteína en un tiempo determinado de lo que sería posible si antes de poderse empezar a sintetizar la siguiente, tuviera que haberse completado la anterior. <GAAG>

Tanto las bacterias como los organismos eucariotas usan polisomas y ambos emplean estrategias adicionales para acelerar la velocidad global de síntesis proteica. Debido a que el mRNA bacteriano no debe ser procesado y es accesible a los ribosomas mientras se fabrica, los ribosomas pueden unirse al extremo libre de la molécula de mRNA bacteriano y empezar a traducirla incluso antes de que se complete la trascripción del RNA, siguiendo de cerca a la RNA polimerasa mientras ésta se desplaza a lo largo del DNA. En los eucariotas, tal como hemos visto, los extremos 5' y 3' del mRNA tienen que entrar en contacto entre sí (véase las Figuras 6-40 y 6-76A); así pues, en cuanto un ribosoma se disocia del mRNA, sus dos subunidades están en posición óptima para reiniciar la traducción sobre la misma molécula de mRNA.

Existen pequeñas variaciones del código genético estándar

Como se expuso en el Capítulo 1, el código genético (mostrado en la Figura 6-50) es el mismo en las tres ramas de la vida, lo cual proporciona evidencias importantes sobre el origen

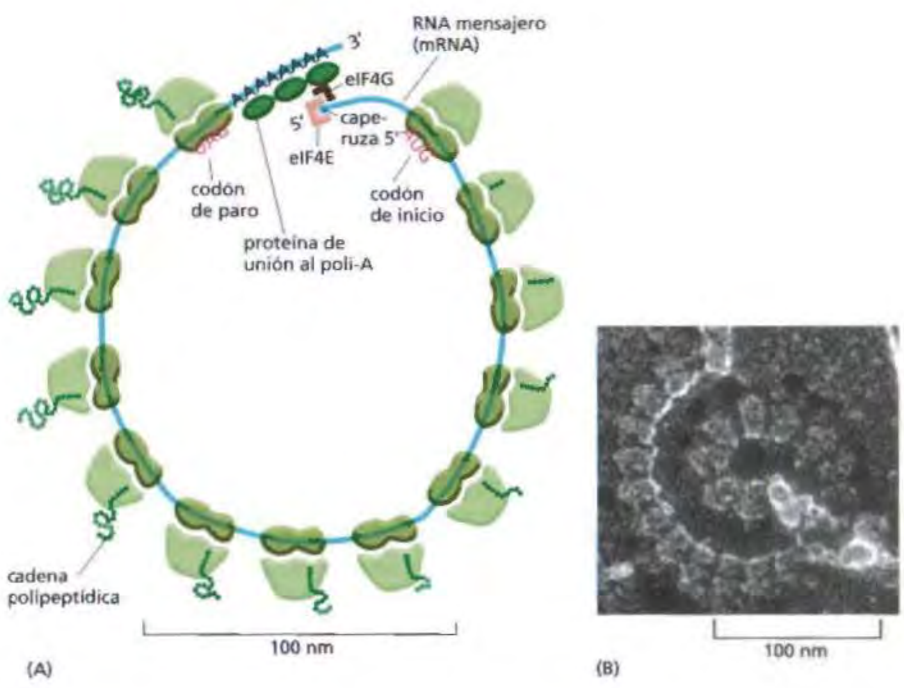


Figura 6-76 Un polirribosoma. (A) Esquema que muestra una serie de ribosomas traduciendo de forma simultánea la misma molécula de mRNA. (B) Electromicrografía de un polirribosoma de una célula eucariota. (B, cortesía de John Heuser.)

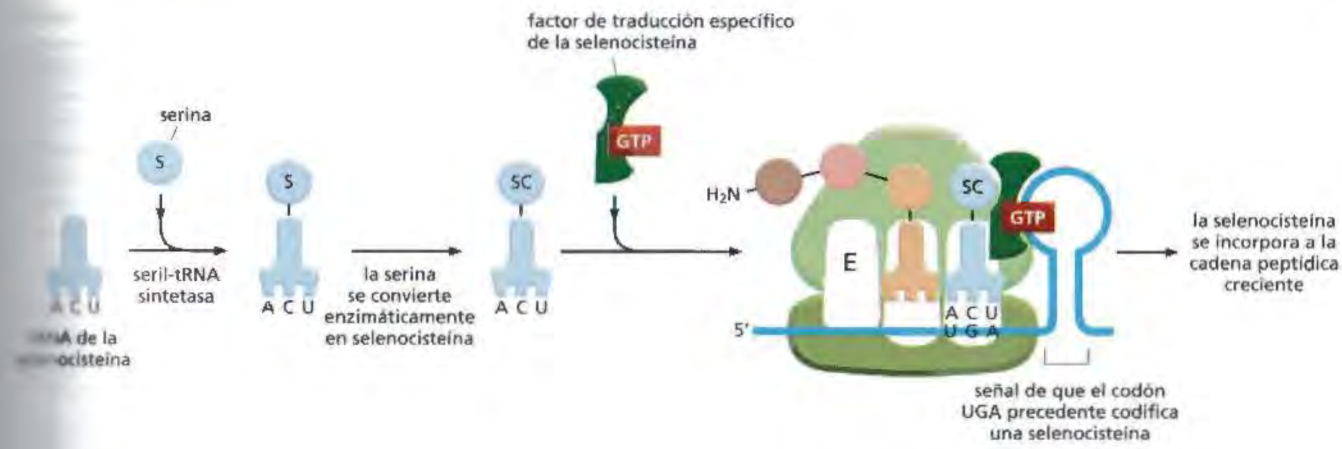


Figura 6–77 Incorporación de selenocisteína a una cadena polipeptídica en crecimiento. La seril-tRNA sintetasa carga una serina a un tRNA especializado. Posteriormente, esta serina es transformada por vía enzimática a selenocisteína. Una estructura específica del mRNA (en forma de horquilla con una determinada secuencia de nucleótidos) indica que se debe incorporar selenocisteína en el codón UGA anterior. Tal como se indica, este paso requiere la participación de un factor de traducción específico de la selenocisteína.

...n de toda la vida sobre la Tierra. Aunque muy poco frecuentes, existen variaciones de ... código. Por ejemplo, *Candida albicans*, el patógeno fúngico con mayor prevalencia en ... seres humanos, traduce el codón CUG como serina, mientras casi todos los demás orga... lo traducen como leucina. Las mitocondrias (que tienen sus propios genomas y co... la mayor parte de su aparato traduccional) a menudo muestran desviaciones del ... estándar. Por ejemplo, en las mitocondrias de los mamíferos, AUA se traduce como ...nina, mientras que en el citosol de la célula es traducido como isoleucina (véase la Ta... 14–3, p. 862). Este tipo de desviaciones del código genético están confinadas en los orga...o en los orgánulos en los que tiene lugar.

...iste un tipo diferente de variación, a veces denominada *traducción recodificada*, que ... lugar en muchas células. En este caso, cierta información contenida en la secuencia de ...ótidos de un mRNA puede cambiar el significado del código genético en un punto par... de la molécula de mRNA. El código estándar permite a las células fabricar proteínas ...ndo sólo 20 aminoácidos. Sin embargo, las bacterias, las arqueas y los eucariotas tie... disponibles un vigésimo primer aminoácido que puede ser incorporado directamente a ... cadena polipeptídica en crecimiento por traducción recodificada. La selenocisteína, ...al para el correcto funcionamiento de una gran variedad de enzimas, contiene un áto... de selenio en vez del átomo de azufre de la cisteína. La selenocisteína se produce enzi...mente a partir de una serina unida a una molécula especial de tRNA que se aparea ... el codón UGA, un codón que por lo general se utiliza para señalar un paro en la traduc... Los mRNA de las proteínas en las que se tiene que insertar la selenocisteína en un co... UGA, tienen una secuencia especial de nucleótidos próxima a ese codón que provoca ... recodificación (**Figura 6–77**).

...a forma de recodificación es el *cambio de la pauta de lectura* que permite sintetizar ... de una proteína a partir de un solo mRNA. Los retrovirus, miembros de un amplio gru... de patógenos que infectan eucariotas, utilizan habitualmente el cambio de la pauta de ... para fabricar tanto las proteínas de la cápside (*proteínas Gag*) como la transcriptasa y ...grasa (*proteínas Pol*) a partir del mismo transcrito de RNA (véase la Figura 5–73). Los ... necesitan muchas más copias de las proteínas Gag que de las proteínas Pol. Este ajuste ...tivo se consigue codificando los genes *Pol* justo después de los genes *Gag* pero con ... pauta de lectura diferente. Se sintetizan pequeñas cantidades de los productos de los ge... Pol porque un cambio de la pauta de lectura de la traducción corriente arriba (en sentido ...) permite saltar el codón de paro de la secuencia que codifica la proteína Gag. Este ... en la pauta de lectura ocurre en un codón determinado del mRNA, antes de alcanzar ...n de paro que debe evitarse, y requiere una *señal de recodificación* específica, una es...ura especial de la secuencia del RNA situada unos nucleótidos después del punto de ... de la pauta de lectura (**Figura 6–78**).

...chos inhibidores de la síntesis de proteínas en procariotas ...ultan útiles como antibióticos

... de los antibióticos más efectivos utilizados en la medicina moderna son compues... producidos por hongos, que inhiben la síntesis proteica bacteriana. Los hongos y las

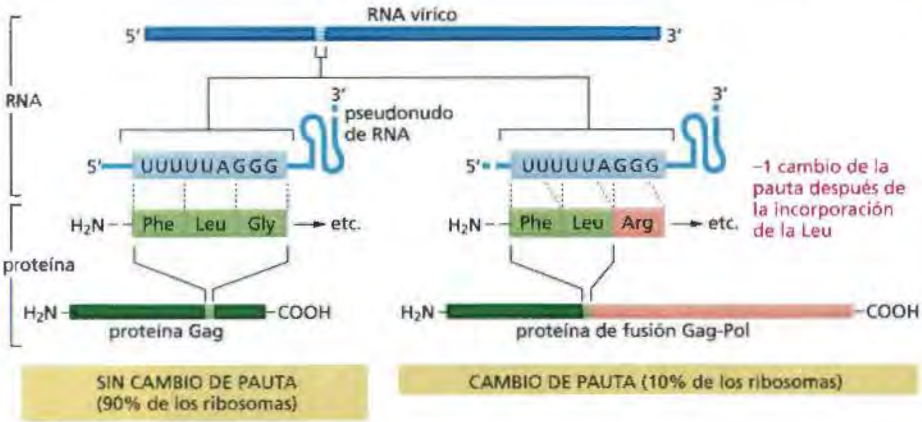


Figura 6–78 Cambio de la pauta de lectura que produce la transcriptasa inversa y la integrasa de un retrovirus. La transcriptasa inversa y la integrasa víricas se fabrican por el procesamiento proteolítico de una gran proteína (la proteína de fusión Gag-Pol) que consiste en la secuencias de aminoácidos de Gag y Pol. El procesamiento proteolítico de la proteína Gag más abundante produce las proteínas de la cápside vírica. Las proteínas Gag y Gag-Pol comienzan con un mRNA idéntico, pero mientras que la proteína Gag termina en un codón de paro corriente abajo (es decir, en sentido 3') de la secuencia mostrada, la traducción de la proteína de fusión Gag-Pol se salta este codón de paro y, por lo tanto, prosigue la síntesis de la larga proteína de fusión Gag-Pol. El salto del codón de paro es posible gracias a un cambio controlado de la pauta de lectura, como se ilustra. Algunas características estructurales del RNA (como el lazo de RNA que se muestra en la figura) provocan que el $tRNA^{Leu}$, unido al extremo C-terminal de la cadena polipeptídica en crecimiento, se desplace ocasionalmente un nucleótido hacia 5' en su apareamiento con el mRNA en el ribosoma, de modo que se aparee con un codón UUU en vez de con el codón UUA que se había especificado al inicio de su incorporación; el siguiente codón (AGG) de la nueva pauta de lectura codifica una arginina en lugar de una glicina. Este deslizamiento controlado se debe en parte a la estructura en *pseudonudo* que se forma en el mRNA vírico (véase la Figura 6–102). La secuencia que se muestra corresponde al virus humano del sida, el HIV. (Adaptado de T. Jacks et al., *Nature* 331:280-283, 1988. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd).

bacterias compiten por muchos nichos ambientales y millones de años de coevolución han hecho que los hongos produzcan potentes inhibidores bacterianos. Algunos de estos compuestos aprovechan las diferencias estructurales y funcionales que existen entre los ribosomas bacterianos y eucariotas, de modo que interfieran preferentemente con la función de los ribosomas bacterianos. Así, los humanos podemos tomar elevadas dosis de algunos de estos compuestos sin padecer ninguna toxicidad. Muchos antibióticos se unen a bolsillos de los RNA ribosómicos interfiriendo en la delicada función del ribosoma (**Figura 6–79**). En la **Tabla 6–4** se presenta un listado de algunos de los antibióticos más comunes de este tipo junto con otros inhibidores de la síntesis proteica, algunos de los cuales actúan en células eucariotas y, por lo tanto, no se pueden utilizar como antibióticos.

Al bloquear algunos de los pasos específicos que llevan del DNA a la proteína, muchos de los compuestos listados en la Tabla 6–4 son útiles también para estudios de biología celular. Entre los fármacos utilizados más habitualmente en este tipo de investigaciones, encontramos el *cloranfenicol*, la *cicloheximida* y la *puromicina*, todas ellas inhibidoras de la síntesis proteica. En una célula eucariota, por ejemplo, el cloranfenicol sólo inhibe la síntesis proteica en los ribosomas de las mitocondrias (y en los cloroplastos de las plantas), lo cual probablemente refleja el origen procariota de estos orgánulos (tratado el Capítulo 14). La cicloheximida, por el contrario, sólo afecta a los ribosomas del citosol. La puromicina es en especial interesante porque es un análogo estructural de una molécula de tRNA unida a un aminoácido, por lo que constituye otro ejemplo de mimetismo molecular: el ribosoma la toma por error como un aminoácido auténtico y la incorpora covalentemente al extremo C-terminal de la cadena peptídica en crecimiento, provocando así la finalización y la liberación prematura del polipéptido. Como era de esperar, la puromicina inhibe la síntesis proteica tanto en procariotas como en eucariotas.

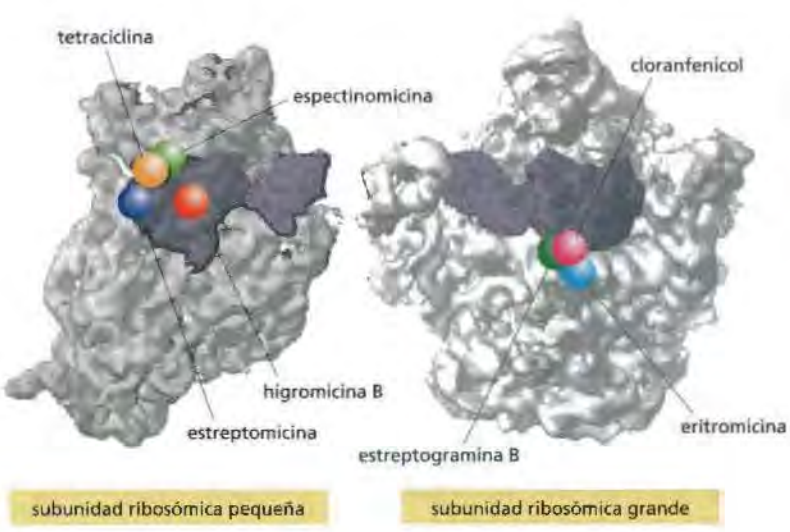


Figura 6–79 Lugares de unión a antibióticos en el ribosoma bacteriano. Las dos subunidades del ribosoma, pequeña (*izquierda*) y grande (*derecha*), están dispuestas como si el ribosoma fuera un libro abierto; la unión del tRNA se muestra en *púrpura* (véase la Figura 6–64). La mayoría de los antibióticos se unen directamente a los pliegues formados por las moléculas de RNA ribosómico. La higromicina B induce errores en la traducción; la estreptomicina bloquea la translocación del peptidil-tRNA del sitio A al sitio P, y la estreptogramina B evita la elongación de péptidos incipientes. En la Tabla 6–4 se recoge una lista de mecanismos inhibidores de los otros antibióticos de la figura. (Adaptado de J. Poehlsgaard y S. Douthwaite, *Nat. Rev. Microbiol.* 3:870-881, 2005. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

Tabla 6–4 Inhibidores de la síntesis de RNA o de la síntesis de proteínas

INHIBIDOR	EFECTO ESPECÍFICO
Efectivo sólo en bacterias	
Tetraciclina	bloquea la unión del aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma
Estreptomicina	evita la transición del complejo de inicio a la fase de elongación de cadena en el ribosoma y también causa mal apareamiento
Cloranfenicol	bloquea la reacción de la peptidil transferasa de los ribosomas (paso 2 de la Figura 6-66)
Eritromicina	se une a la salida del túnel de los ribosomas y así, evita la elongación de la cadena peptídica
Rifamicina	bloquea el inicio de las cadenas de RNA mediante su unión a la RNA polimerasa (evita la síntesis de RNA)
Efectivo en bacterias y eucariotas	
Puromicina	provoca la liberación prematura de las cadenas polipeptídicas nacientes al incorporarse al extremo de crecimiento de la cadena
Actinomicina D	se une al DNA y bloquea el desplazamiento de la RNA polimerasa (evita la síntesis de RNA)
Efectivo en eucariotas pero no en bacterias	
Cicloheximida	bloquea la reacción de translocación en los ribosomas (paso 3 de la Figura 6-66)
Anisomicina	bloquea la reacción de la peptidil transferasa de los ribosomas (paso 2 de la Figura 6-66)
α-Amanitina	bloquea la síntesis de mRNA mediante su unión preferencial a la RNA polimerasa II

Los ribosomas de las mitocondrias de los eucariotas (y de los cloroplastos), a menudo se parecen a los de las bacterias en su sensibilidad a los inhibidores. Por tanto, algunos de estos antibióticos pueden tener efectos nocivos en las mitocondrias de humanos.

La precisión del proceso de traducción requiere el gasto de energía libre

La traducción por el ribosoma es un compromiso entre los condicionantes opuestos de precisión y velocidad. Hemos visto, por ejemplo, que la precisión de la traducción (1 error por cada 10^4 aminoácidos incorporados) requiere intervalos de tiempo después de que cada aminoácido ha sido incorporado a la cadena polipeptídica en crecimiento, dando lugar a una velocidad global de traducción en las bacterias de 20 aminoácidos incorporados por segundo. Bacterias mutantes con una alteración específica en la subunidad pequeña del ribosoma, tienen retrasos mayores y traducen mRNA a proteína con una precisión considerablemente mayor. Sin embargo, en estos mutantes la síntesis de proteína es tan lenta que la bacteria apenas es capaz de sobrevivir.

También se ha indicado que conseguir la precisión que alcanza la síntesis de proteínas requiere el aporte de una gran cantidad de energía libre; no es de extrañar porque, como se describe en el Capítulo 2, hay que pagar un precio por cualquier incremento de orden en la célula. En la mayoría de las células, la síntesis de proteínas consume más cantidad de energía que cualquier otro proceso biosintético. Para poder formar cada nuevo enlace peptídico se rompen como mínimo cuatro enlaces fosfato de alta energía: dos de ellos se consumen en cargar la molécula de tRNA con un aminoácido (véase Figura 6–56) y otros dos dirigen las etapas del ciclo de reacciones que tienen lugar sobre el ribosoma durante la síntesis propiamente dicha (véase Figura 6–67). Además, también se consume energía cada vez que se rompe la unión de un aminoácido incorrecto por una tRNA sintetasa (véase Figura 6–59) y cada vez que un tRNA incorrecto entra en el ribosoma, se dispara la hidrólisis de GTP y es descartado (Figura 6–67). Para ser eficientes, estos mecanismos de corrección de pruebas también deben permitir eliminar una fracción importante de interacciones correctas, por lo que la "corrección" supone un gasto de energía incluso mayor de lo que podría parecer.

Los mecanismos de control de calidad previenen la traducción de mRNA dañados

En los eucariotas, la producción de mRNA conlleva tanto la transcripción como una serie de elaboradas etapas de procesamiento del RNA; estas etapas se producen en el núcleo, segregadas del ribosoma y, sólo cuando el proceso se ha completado, el mRNA se transporta al citoplasma para ser traducido (véase Figura 6–40). Sin embargo, este esquema no es infalible y algunos mRNA procesados de forma incorrecta son enviados inadvertidamente al citoplasma. Además, los mRNA que eran perfectos cuando abandonaron el núcleo pueden romper-

se o dañarse en el citosol. Parece que el peligro de traducir mRNA dañados o procesados de forma incompleta (que daría lugar a proteínas truncadas o aberrantes de otra forma) es tan grande, que las células disponen de varias medidas de retroalimentación para prevenir que esto ocurra.

Para impedir la traducción de mRNA rotos, la maquinaria de iniciación de la traducción reconoce, antes de empezar la traducción, tanto la caperuza 5' como la cola poliA (véase Figura 6–72). Para ayudar a asegurar que los mRNA han madurado de forma adecuada antes de ser traducidos, el complejo de unión de exones (EJC: *exon junction complex*), que es depositado sobre el mRNA después de la maduración (véase Figura 6–40), estimula la traducción posterior del mRNA.

Pero el sistema de supervisión más potente del mRNA, denominado **destrucción del mRNA mediada por triplete sin sentido**, elimina los mRNA defectuosos antes de que puedan ser traducidos de forma eficiente a proteína. Este mecanismo actúa cuando la célula determina que una molécula de mRNA tiene un codón sin sentido (de paro) (UAA, UAG o UGA) en un lugar "erróneo"; una situación que se puede dar con facilidad en una molécula de mRNA que ha madurado de forma incorrecta. La maduración (ayuste) aberrante producirá la introducción aleatoria de codones sin sentido en la pauta de lectura del mRNA, especialmente en organismos en los que, como ocurre en humanos, el tamaño medio de los intrones es elevado (véase Figura 6–32B).

El mecanismo de vigilancia empieza en cuanto una molécula de mRNA es transportada desde el núcleo hasta el citosol. Cuando su extremo 5' emerge del poro nuclear, el mRNA es captado por un ribosoma, que empieza a traducirlo. A medida que se produce la traducción, los complejos de unión de exones (EJC), unidos al mRNA en cada lugar de maduración, son aparentemente desplazados por el ribosoma en movimiento. El codón de paro normal estará en el último exón, de forma que en el momento en el que el ribosoma lo alcanza y se para, ya no tiene que haber más EJC unidos al mRNA. Si éste es el caso, el mRNA "pasa la inspección" y es liberado al citosol donde puede ser traducido en serie (**Figura 6–80**). Sin embargo, si el ribosoma alcanza de forma prematura un codón de paro y se detiene, y detecta que todavía quedan EJC, la molécula de mRNA es rápidamente degradada. De esta forma, la primera ronda de traducción permite a la célula dar el certificado de idoneidad a cada molécula de mRNA en cuando sale del núcleo.

La destrucción del mRNA mediada por triplete sin sentido puede haber resultado especialmente importante a lo largo de la evolución, permitiendo a las células eucariota explorar más fácilmente genes formados por recombinaciones de DNA, por mutaciones o por patrones alternativos de maduración, seleccionando para su traducción sólo aquellos mRNA que eran capaces de dar lugar a una proteína completa. La destrucción del mRNA mediada por triplete sin sentido también es importante en células del sistema inmune en desarrollo, en las que la

Figura 6–80 Destrucción del mRNA mediada por triplete sin sentido. Como se muestra a la derecha, a menudo la incapacidad de madurar correctamente un pre-mRNA introduce un codón de paro prematuramente en la pauta de lectura para la síntesis de la proteína. La introducción de un codón de paro en la "línea de lectura" es fácil que ocurra en los mamíferos, en los que los intrones tienden a ser muy largos. Cuando estos mRNA anormales son traducidos, producen proteínas aberrantes, que pueden dañar la célula. Sin embargo, tal como se muestra en la parte inferior derecha de la figura, estos RNA anormales son destruidos por el mecanismo de destrucción de mRNA mediado por triplete sin sentido. De acuerdo con un modelo, una molécula de mRNA que presenta complejos de unión de exones (EJC: *exon junction complexes*) que marcan de forma eficiente los lugares de maduración, primero es reconocida por un ribosoma que realiza un "test" de traducción. A medida que el mRNA pasa a través del estrecho canal del ribosoma, las EJC van saltando y el mRNA correcto es finalmente liberado para poder seguir muchas rondas de traducción (*parte izquierda* de la figura). Sin embargo, si se encuentra un codón de paro antes de que se haya alcanzado el último complejo de unión de exones (*parte derecha*), el mRNA sufre una destrucción mediada por triplete sin sentido, iniciada por las proteínas Upf (*en verde*) que se unen a cada EJC. Nótese que, para disparar una destrucción mediada por triplete sin sentido, el prematuro codón de paro debe estar en la misma pauta de lectura que la de la proteína original. (Adaptado de J. Lykke-Andersen et al., *Cell* 103:1121-1131, 2000. Con la autorización de Elsevier.)

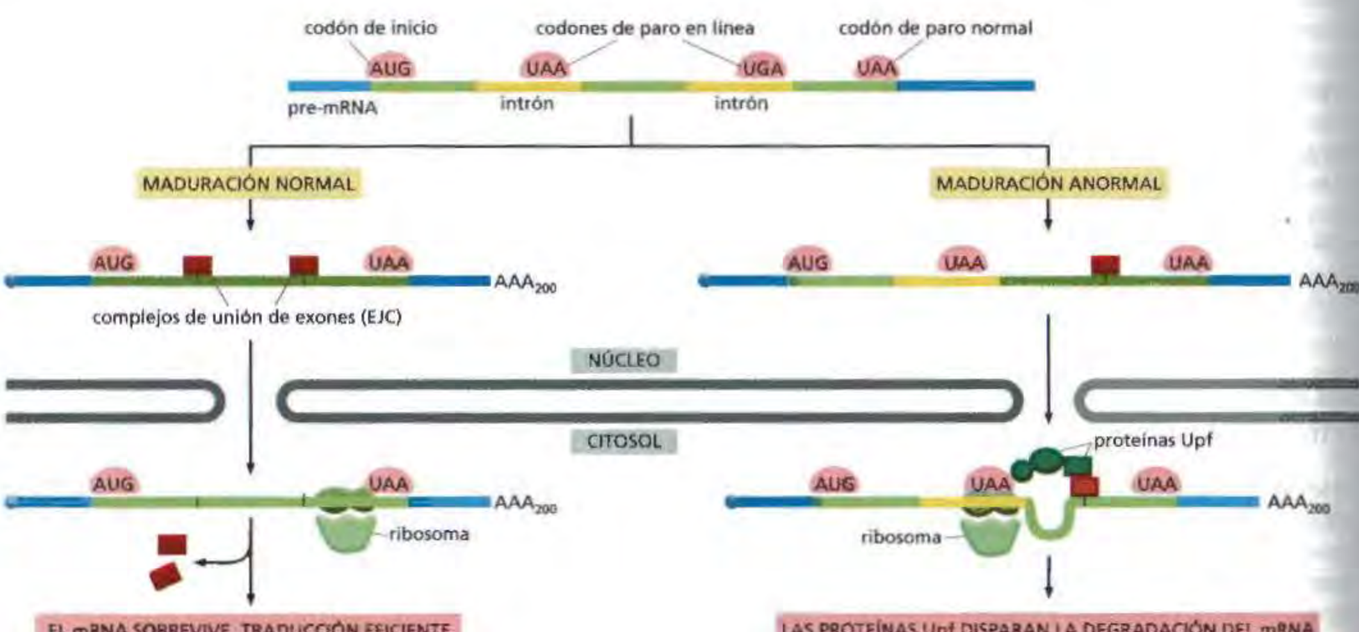
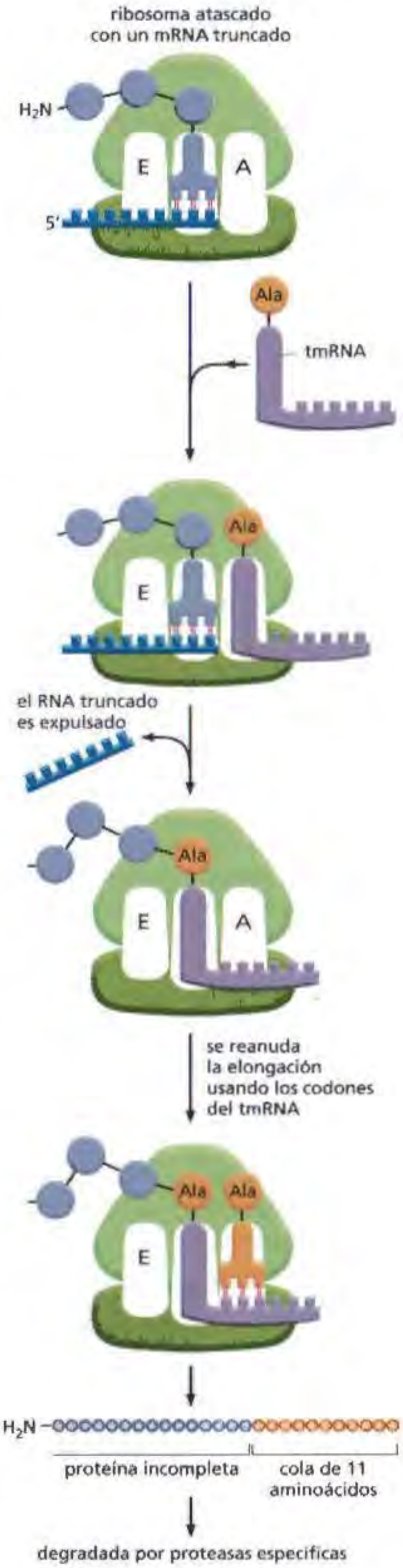


Figura 6–81 **Rescate de un ribosoma bacteriano atascado con una molécula de mRNA incompleta.** El tmRNA mostrado es una molécula de RNA de 363 nucleótidos, con funciones tanto de tRNA como de mRNA, de ahí su nombre. Es portador de una alanina y puede unirse al sitio A de un ribosoma atascado para añadir esta alanina a la cadena polipeptídica, como si fuera un tRNA, excepto que sin la necesidad de ningún codón para guiarle. El ribosoma traduce diez codones del tmRNA, completando la proteína que se estaba sintetizando con una cola de 11 aminoácidos. Esta cola es reconocida por ciertas proteasas celulares, que degradan toda la proteína. Aunque en la figura se representa un ejemplo de bacterias, los eucariotas utilizan una estrategia similar.



recombinación masiva de DNA (véase Figura 25-56) a menudo genera codones de terminación prematuros. El sistema de supervisión degrada los mRNA producidos por estos genes recombinados e impide los posibles efectos tóxicos de las proteínas truncadas.

Finalmente, el sistema de destrucción del mRNA mediado por triplete sin sentido tiene un importante papel mitigando los síntomas de muchas enfermedades hereditarias humanas. Como hemos visto, las enfermedades hereditarias están causadas por lo general por mutaciones que alteran la función de alguna proteína clave, como la hemoglobina o alguno de los factores de coagulación de la sangre. Alrededor de una tercera parte de todas las alteraciones genéticas en humanos es el resultado de mutaciones sin sentido o de mutaciones (como las mutaciones de cambio de pauta de lectura o de lugar de sitio de maduración) que generan mutaciones sin sentido en la pauta de lectura del gen. En individuos que tienen un gen mutado y el otro gen funcional, el sistema de destrucción del mRNA mediado por triplete sin sentido elimina los mRNA aberrantes y previene así que se sintetice una proteína potencialmente tóxica. Sin este mecanismo de salvaguarda, los individuos con un gen funcional y el otro gen "enfermo" por mutación podrían sufrir síntomas más graves.

Se ha indicado anteriormente en este capítulo que las bacterias carecen del elaborado procesado de mRNA que se presenta en los eucariotas y que a menudo la traducción empieza antes de que haya acabado la síntesis de la molécula de RNA. Cuando un ribosoma bacteriano traduce hacia el final de un RNA incompleto, se detiene y no libera el RNA. El rescate se produce en forma de un RNA especial (denominado tmRNA), que entra en el lugar A del ribosoma y es traducido, liberando el ribosoma. Los 11 aminoácidos especiales que se pueden añadir de esta forma al extremo C-terminal de una proteína truncada, señalan a la proteasa que la proteína completa debe ser degradada (**Figura 6–81**).

Algunas proteínas comienzan a plegarse cuando aún están siendo sintetizadas

El proceso de la expresión génica no concluye con la utilización del código genético para generar la secuencia de aminoácidos que constituye una proteína. Para que esta nueva cadena polipeptídica pueda ser útil para la célula, debe plegarse en su conformación tridimensional única, unirse a los posibles cofactores que requiera para su actividad, ser modificada de forma apropiada por proteínas quinasa u otras enzimas modificadoras de proteínas y, si es el caso, ensamblarse de forma correcta con las otras subunidades proteicas con las que tiene que actuar (**Figura 6–82**).

La información necesaria para todas las etapas que acabamos de mencionar está contenida, en último término, en las secuencias de aminoácidos que fabrica el ribosoma cuando traduce una molécula de mRNA en cadena polipeptídica. Como se describió en el Capítulo 3, cuando una proteína se pliega en una estructura compacta, esconde la mayor parte de sus residuos hidrofóbicos en una zona interior. Además, se forma un gran número de interacciones no-covalentes entre diferentes partes de la molécula. La suma de todas estas interacciones energéticamente favorables determina el patrón final de plegamiento de la cadena polipeptídica, es decir, su conformación de menor energía libre (véase p. 130).

A lo largo de muchos millones de años de evolución, la secuencia de aminoácidos de cada proteína se ha seleccionado no sólo por la conformación que adopta sino también por su capacidad de plegarse rápidamente. En el caso de algunas proteínas, este plegamiento comienza en cuanto la cadena polipeptídica va emergiendo del ribosoma a partir de su extremo N-terminal. En estos casos, a los pocos segundos de que cada dominio haya salido por completo del ribosoma, forma una estructura compacta que contiene una gran parte de la



Figura 6–82 Etapas en la generación de una proteína funcional. Como se indica, la traducción de una secuencia de mRNA en una secuencia de aminoácidos en el ribosoma no es el final del proceso de formación de una proteína. Para que ésta pueda ser útil para la célula, la cadena polipeptídica, una vez completada, debe plegarse correctamente adoptando su conformación tridimensional, tiene que unirse a todos los cofactores que necesite y, si es necesario, debe ensamblarse con otras cadenas proteicas. Estos cambios se llevan a cabo mediante enlaces no-covalentes. Además, muchas proteínas también necesitan modificaciones covalentes en algunos aminoácidos determinados. Aunque, entre estas modificaciones, las más comunes son la glucosilación y la fosforilación, se conocen más de 100 tipos diferentes de modificaciones covalentes (véase, p. ej., la Figura 3–81).

estructura secundaria final (hélices α y láminas β) alineadas aproximadamente del modo apropiado (**Figura 6–83**). En muchos casos, ese estado dinámico y flexible, denominado *glóbulo fundido*, es el punto de inicio para un proceso relativamente lento en el que se realizarán muchos ajustes de las cadenas laterales hasta que se alcance la estructura terciaria correcta. Para sintetizar una proteína de tamaño medio se tardan algunos minutos, y en el caso de muchas proteínas antes de que el ribosoma libere el extremo C-terminal de la proteína ya se ha completado una parte importante del proceso de plegamiento (**Figura 6–84**).

Las chaperonas moleculares ayudan a guiar el plegamiento de la mayoría de las proteínas

El plegamiento de la mayoría de proteínas probablemente no comienza durante su síntesis. En lugar de ello, se realiza mediante la intervención de una clase especial de proteínas llamadas **chaperonas moleculares**. Las chaperonas moleculares resultan útiles para las células porque existen muchas opciones para transformar una proteína desplegada o parcialmente plegada en una proteína en su conformación compacta final. En el caso de muchas proteínas, si no fuera por la intervención de una chaperona que reajuste el proceso de plegamiento, algunos de los intermediarios que se forma durante el proceso se agregarían y serían abandonados como estructuras inservibles (**Figura 6–85**).

Muchas chaperonas moleculares se denominan *proteínas de shock térmico* (*Hsp: **h**eat **s**hock **p**roteins*) porque se sintetizan en cantidades elevadas tras una breve exposición de las células a altas temperaturas (p. ej., 42 °C para células que normalmente viven a 37 °C). Esto refleja la participación de un sistema de retroalimentación que responde ante cualquier aumento en el número de proteínas mal plegadas (como las generadas por las altas temperaturas) acelerando la síntesis de chaperonas que contribuyen a recuperar el plegamiento correcto de estas proteínas.

Existen varias grandes familias de chaperonas moleculares eucariotas, incluidas las proteínas Hsp60 y Hsp70. En cada orgánulo participan diferentes miembros de estas fami-

(A) (B)

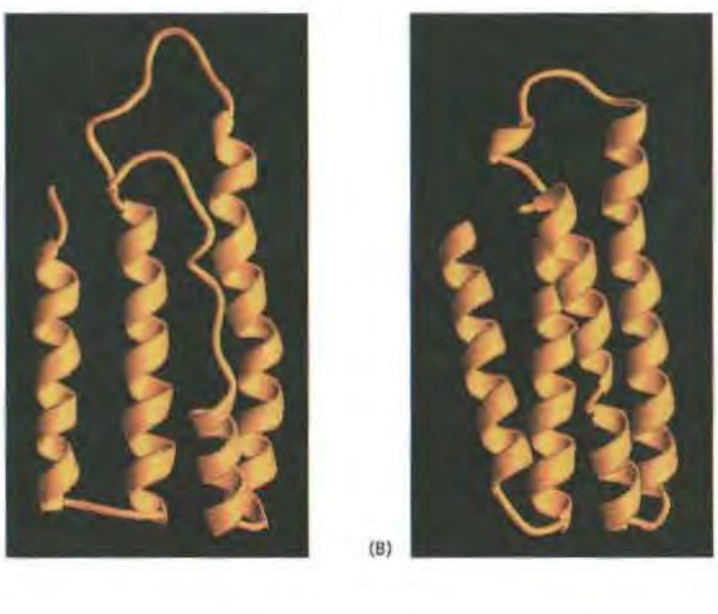


Figura 6–83 La estructura de glóbulo fundido. (A) La forma de glóbulo fundido del citocromo b_{562} es más abierta y menos ordenada que la forma plegada final de la proteína, como se puede observar en (B). Se debe destacar que el glóbulo fundido contiene la mayoría de las estructuras secundarias de la forma final, aunque los extremos de las hélices α están poco definidos y una de las hélices está formada sólo parcialmente. (Cortesía de Joshua Wand, de Y. Feng et al., *Nat. Struct. Biol.* 1:30-35, 1994. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

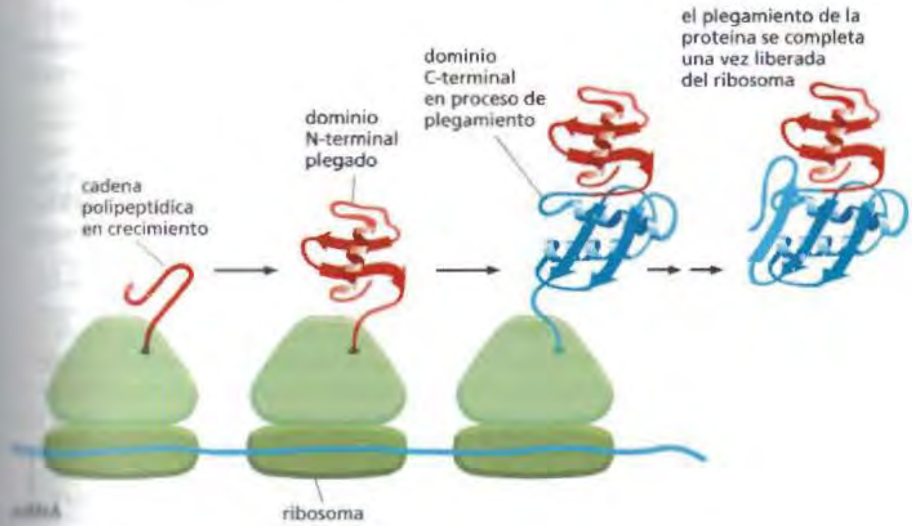


Figura 6–84 Plegamiento cotraduccional de una proteína. En la figura se muestra una cadena polipeptídica creciente adquiriendo sus estructuras secundaria y terciaria a medida que emerge del ribosoma. El dominio N-terminal es el primero en plegarse, mientras el dominio C-terminal todavía se está sintetizando. Esta proteína, al ser liberada del ribosoma, todavía no ha alcanzado su conformación final. (Modificado de A.N. Federov y T.O. Baldwin, *J. Biol. Chem.* 272:32715-32718, 1997.)

nas. Así, como describiremos en el Capítulo 12, las mitocondrias contienen sus propias moléculas de Hsp60 y Hp70 que son distintas de las que actúan en el citosol; en el retículo endoplasmático existe una Hsp70 especial (denominada *BIP*) que ayuda a plegar las proteínas de este orgánulo.

Cada una de las proteínas Hsp60 y Hsp70 cuenta con un pequeño grupo de proteínas asociadas característico, que colaboran con ellas en el plegamiento de las proteínas. Las Hsp comparten afinidad por las zonas de aminoácidos hidrófobos que quedan expuestas en las proteínas que no están completamente plegadas, e hidrolizan ATP, a menudo uniendo y liberando su proteína sustrato en cada ciclo de hidrólisis de ATP. En otros aspectos, los dos tipos de proteínas Hsp funcionan de maneras diferentes. La maquinaria de las Hsp70 participa en una etapa inicial de la vida de muchas proteínas y se une a cualquier fragmento

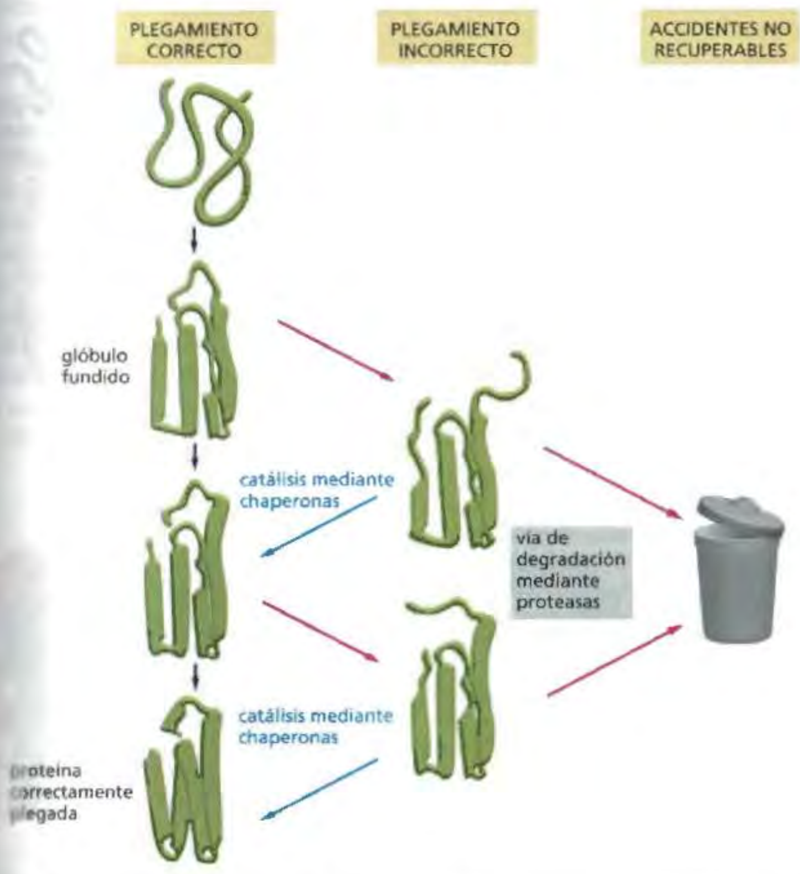


Figura 6–85 Visión actual del plegamiento de las proteínas. Cada dominio de una proteína recién sintetizada adquiere rápidamente su estado de "glóbulo fundido". El plegamiento posterior tiene lugar con más lentitud y mediante diversas vías, que a menudo requieren la participación de chaperonas moleculares. Algunas moléculas pueden no plegarse correctamente; como se explica en el texto, éstas serán reconocidas y degradadas por proteasas específicas.

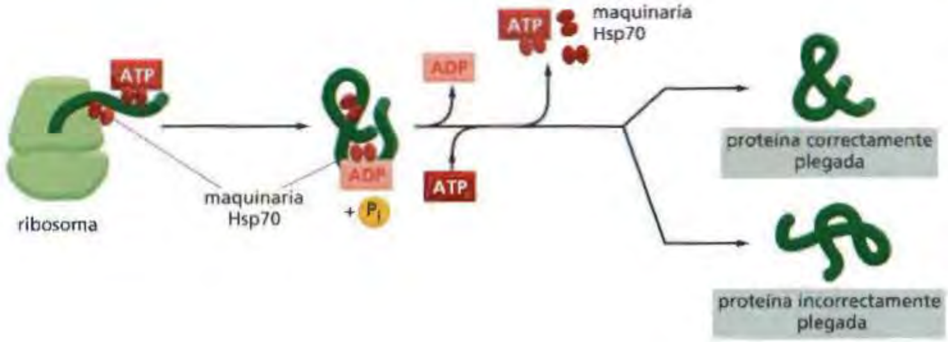


Figura 6–86 **La familia de chaperonas moleculares Hsp70.** Estas proteínas actúan de manera muy temprana, reconociendo pequeños segmentos de aminoácidos hidrofóbicos en la superficie de la proteína. Ayudado por las proteínas Hsp40, de menor tamaño (no mostrado), un monómero Hsp70 se une a su proteína diana e hidroliza una molécula de ATP a ADP, sufriendo entonces un cambio conformacional que provoca que la Hsp70 se una muy fuertemente a la proteína diana. Una vez se disocia la Hsp40, se induce la disociación de la Hsp70 mediante el intercambio del ADP por una nueva molécula de ATP. En realidad, estos ciclos repetidos de unión y liberación de las proteínas Hsp ayudan a que la proteína diana alcance su plegamiento correcto, como se ilustra esquemáticamente en la Figura 6–85.

de unos siete aminoácidos hidrofóbicos de la proteína incluso antes de que ésta abandone el ribosoma (**Figura 6–86**). Por el contrario, las proteínas semejantes a Hsp60 constituyen grandes estructuras en forma de barril que actúan después de que la proteína ya ha sido sintetizada completamente. Este tipo de chaperona, a veces denominada *chaperonina*, forma una "cámara de aislamiento"en cuyo interior se sitúan las proteínas mal plegadas, evitando así su agregación y aportando un entorno favorable para que estas proteínas alcancen el plegamiento correcto (**Figura 6–87**).

Las chaperonas mostradas en las Figuras 6–86 y 6–87 utilizan a menudo muchos ciclos de hidrólisis de ATP para plegar de forma correcta una sola cadena polipeptídica. A pesar de que parte de esta energía se utiliza para realizar trabajos mecánicos, probablemente la mayor parte de ella se dedica a asegurar que el plegamiento de la proteína es correcto. Tal como vimos para la transcripción, le maduración y la traducción, el gasto de energía libre puede ser utilizado por las células para aumentar la precisión de un proceso biológico. En el caso del plegado de una proteína, la hidrólisis de ATP permite a las chaperonas reconocer una amplia variedad de estructuras mal plegadas, interrumpir su plegamiento y volver a empezar el plegamiento de una manera ordenada.

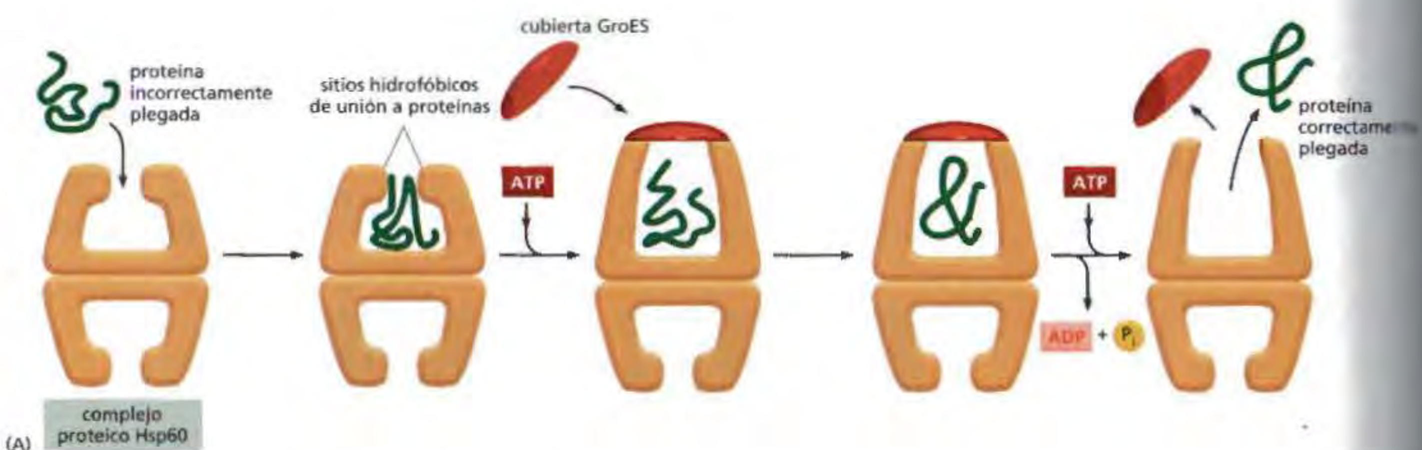




Figura 6–87 **Estructura y función de la familia de chaperonas moleculares Hsp60.** (A) Catálisis del nuevo plegamiento de una proteína. Las proteínas mal plegadas son capturadas mediante interacciones hidrofóbicas con uno de los anillos del barril. La unión posterior de ATP y de una proteína que actúa de cubierta aumenta el diámetro del reborde del barril, que puede forzar la entrada de la proteína diana parcialmente desplegada. De esta forma, la proteína queda confinada en un espacio cerrado, donde tiene una nueva oportunidad de plegarse correctamente. Después de unos 15 segundos, se hidroliza el ATP debilitando el sistema. A continuación, se une otra molécula de ATP que expulsa la proteína, tanto si se ha plegado como si no, y el ciclo vuelve a comenzar. Este tipo de chaperona molecular también se conoce como chaperonina; recibe el nombre de Hsp60 en las mitocondrias, TCP1 en el citosol de las células de vertebrados y GroEL en bacterias. Como se ve en el esquema, cada vez sólo actúa sobre una proteína cliente uno de los dos barriles simétricos. (B) Estructura de GroEL unida a la proteína de cubierta GroES, determinada por cristalografía de rayos X. A la *izquierda* se muestra la estructura en barril y a la *derecha*, una sección vertical, mostrando el interior de la estructura. (B, adaptado de B. Bukau y A.L. Horwich, *Cell* 92:351-366, 1998. Con la autorización de Elsevier.)

A pesar de que nuestra exposición sólo se ha centrado en dos tipos de chaperonas, la célula dispone de otras. La enorme diversidad de proteínas presentes en las células requiere probablemente una amplia variedad de chaperonas con capacidades de vigilancia o de corrección muy versátiles.

Las regiones hidrofóbicas de la proteína que quedan expuestas proporcionan señales críticas para el control de calidad de la proteína

Si se añaden aminoácidos radiactivos a las células durante un breve periodo de tiempo, se pueden trazar las proteínas recién sintetizadas en su proceso de maduración hasta que alcanzan su forma funcional. Este tipo de experimentos demostró que las proteínas Hsp70 actúan primero, empezando su función cuando la proteína todavía está siendo sintetizada en el ribosoma, y que las proteínas semejantes a Hsp60 actúan más tarde, ayudando al plegamiento de la proteína completa. Sin embargo, ¿cómo es capaz la célula de reconocer las proteínas mal plegadas, que requieren rondas adicionales de plegamientos dependientes de ATP de las que tienen estructuras correctas?

Antes de responder a esta pregunta, es necesario considerar el destino postraduccional de las proteínas en un sentido más amplio. Habitualmente, si una proteína tiene una región de aminoácidos hidrofóbicos de un cierto tamaño expuesta en su superficie, es una proteína anómala: se ha plegado de forma incorrecta después de abandonar el ribosoma, ha sufrido un accidente que la ha desplegado parcialmente o no ha podido ensamblarse con las demás subunidades con las que debía formar un complejo proteico. Esta proteína no sólo resulta inútil para la célula, sino que también puede resultar peligrosa. Muchas proteínas con regiones hidrofóbicas, expuestas de forma anormal, pueden formar grandes agregados en el interior de la célula. Veremos más adelante que en algunos casos estos agregados pueden ser la causa de algunas enfermedades humanas muy graves. Sin embargo existen potentes mecanismos de control de calidad de las proteínas, que normalmente evitan estos desastres.

Conocidas estas circunstancias generales, no resulta sorprendente que las células hayan desarrollado complicados mecanismos que reconocen estas regiones hidrofóbicas de las proteínas y minimicen los daños que pueden causar. Dos de estos mecanismos dependen de las chaperonas moleculares que acabamos de describir, que se unen a estas regiones y colaboran a reparar la proteína defectuosa dándole otra oportunidad de plegarse de forma correcta. Al mismo tiempo, al cubrir estas regiones hidrofóbicas, las chaperonas evitan la agregación de las proteínas. Las proteínas capaces de un plegado correcto de forma rápida no llegan a exponer estas regiones y son ignoradas por las chaperonas.

La **Figura 6–88** muestra de manera esquemática las diferentes opciones del proceso de control de calidad que una célula debe asumir ante una proteína recién sintetizada y difícil de plegar. Tal y como se indica, cuando fallan los intentos de volver a plegar una proteína, aparece un tercer mecanismo que acaba destruyendo completamente la proteína por proteólisis. Esta vía proteolítica se inicia con el reconocimiento de una región hidrofóbica expuesta, de forma anormal, en la superficie de una proteína, y acaba con la entrega de esta proteína a una maquinaria de destrucción de proteínas, un complejo de proteasas conocido como el *proteosoma*. Como se describe a continuación, este proceso depende de un complicado sistema de identificación de proteínas, que también lleva a cabo otras funciones clave de la célula mediante la destrucción de proteínas normales previamente seleccionadas.

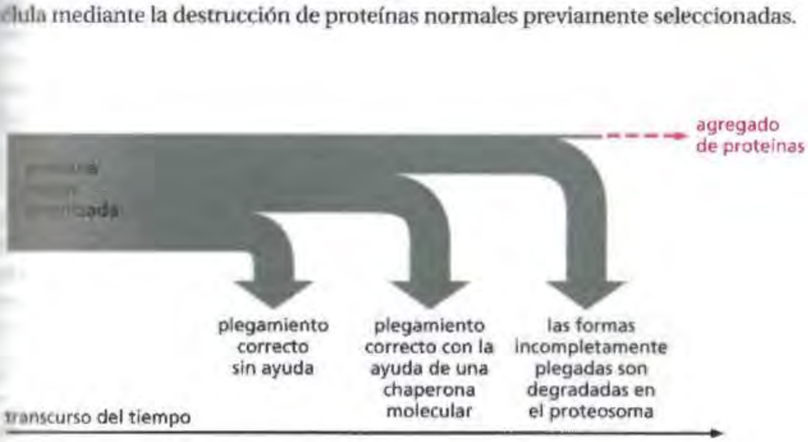


Figura 6–88 El proceso de control de calidad posterior a la síntesis proteica. Una proteína recién sintetizada puede plegarse de forma correcta y ensamblarse con otras proteínas formando el complejo multiproteico correcto; en este caso, no se requiere ningún otro mecanismo de control de calidad. Las proteínas plegadas parcialmente o incorrectamente pueden recibir la ayuda de las chaperonas moleculares para alcanzar su plegamiento correcto: primero, de las proteínas de la familia Hsp70 y, si éstas fallan, de las proteínas de la familia Hsp60. En ambos tipos de chaperonas, las proteínas diana son reconocidas por la exposición anómala de aminoácidos hidrofóbicos en su superficie. Estos procesos de "rescate de proteínas" compiten con otros mecanismos que, tras reconocer esta exposición anómala, marcan la proteína para su destrucción en un proteosoma. La actividad combinada de todos estos procesos evita una agregación masiva de proteínas en la célula, como cuando las regiones hidrofóbicas de diversas proteínas se agrupan entre sí y precipitan inespecíficamente.

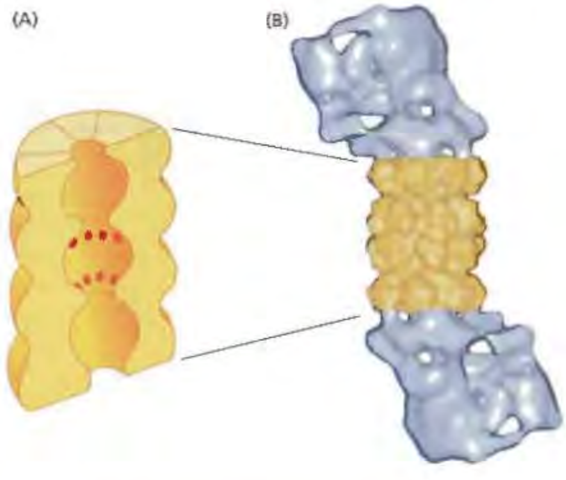


Figura 6–89 El proteosoma. (A) Esquema de un corte vertical de la estructura del cilindro central 20S, determinada por cristalografía de rayos X, con los centros activos de las proteasas indicados con *puntos rojos*. (B) El proteosoma completo, cuyo cilindro central (*amarillo*) está acompañado de la cubierta 19S (*azul*) en cada extremo. La estructura de la cubierta se ha determinado por procesamiento informático a partir de imágenes de electromicroscopía. Los complejos de las cubiertas (también llamados partículas reguladoras) se unen selectivamente a las proteínas que han sido marcadas por la ubiquitina para su destrucción; a continuación, utilizan la hidrólisis de ATP para desplegar las cadenas polipeptídicas e introducirlas, a través del túnel (véase la Figura 6–91), hacia la cámara interior del cilindro 20S donde serán digeridas hasta pequeños péptidos. (B, de W. Baumeister et al., *Cell* 92:367-380, 1998. Con la autorización de Elsevier.)

El proteosoma es una proteasa compartimentada con lugares activos secuestrados

La maquinaria proteolítica y las chaperonas compiten entre sí para reorganizar una proteína mal plegada. Si una proteína acabada de sintetizar se pliega rápidamente, sólo una pequeña fracción como máximo es degradada. Por el contrario, una proteína que se pliega con lentitud es vulnerable para la maquinaria proteica durante un periodo de tiempo prolongado y muchas más de sus moléculas son destruidas antes de que puedan alcanzar el estado de plegamiento adecuado. Debido a mutaciones o a errores de la transcripción, de la maduración del RNA y de la traducción, algunas proteínas no se pliegan nunca de forma adecuada. Es muy importante que la célula destruya estas proteínas potencialmente peligrosas.

En los eucariotas, el aparato que destruye las proteínas aberrantes es el **proteosoma**, una abundante proteasa dependiente de ATP que constituye casi el 1% de la proteína celular. El proteosoma, del que existen muchas copias dispersas por el citosol y por el núcleo, también destruye las proteínas aberrantes del retículo endoplasmático (ER: *endoplasmic reticulum*). Un sistema de vigilancia basado en ER detecta las proteínas que no se pliegan o no se ensamblan de forma adecuada después de entrar en el ER y las *retrotransloca* al citosol, donde serán degradadas (como describiremos en el Capítulo 12).

Cada proteosoma consiste en un cilindro central hueco (el complejo 20S del proteosoma) formado por varias subunidades proteicas que se ensamblan y forman una columna casi cilíndrica de cuatro anillos heptaméricos (**Figura 6–89**). Algunas de las subunidades son proteasas cuyos centros activos están dispuestos hacia la cámara interna del cilindro. Este diseño impide que estas eficientes proteasas actúen sobre la célula. Cada uno de los extremos del cilindro suele estar asociado con otro gran complejo proteico (la cubierta 19S) que contiene un anillo proteico de seis subunidades a través del cual las proteínas diana son ensartadas al núcleo del proteosoma, donde son degradadas (**Figura 6–90**). Esta reacción de "enhebrado", dirigida por la hidrólisis de ATP, despliega las proteínas diana a medida que se

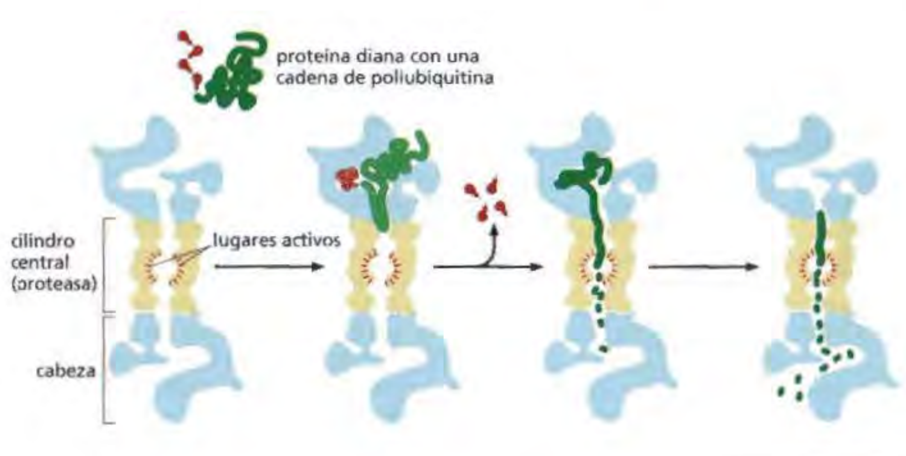
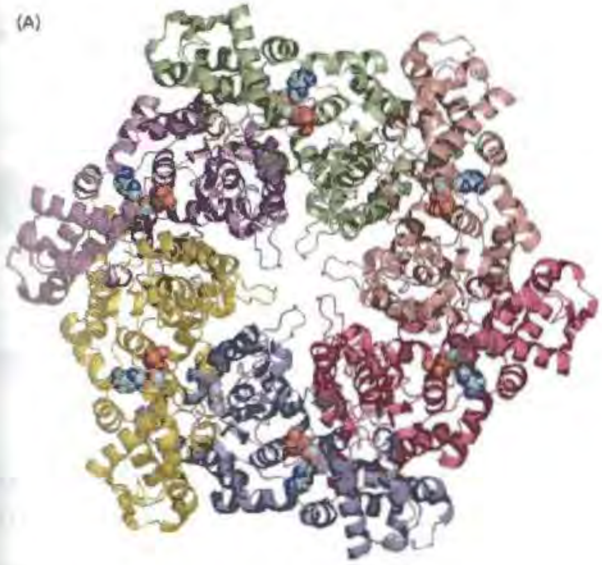


Figura 6–90 Proceso de digestión de proteínas por el proteosoma. La cabeza del proteosoma reconoce una proteína sustrato, en este caso debido a que está marcada por una cadena de poliubiquitina (véase Figura 6–92) y, a continuación, la transloca al interior del proteosoma, donde será digerida. En un estado inicial, la ubiquitina se elimina de la proteína sustrato y se recicla. La translocación al interior del proteosoma está mediada por un anillo de proteínas dependientes de ATP que despliega la proteína sustrato a medida que se va "enhebrando" a través del anillo y al interior del proteosoma (véase Figura 6–91) (De S. Prakash y A. Matouschek, *Trends Biochem. Sci.* 29:593-600, 2004. Con la autorización de Elsevier.)



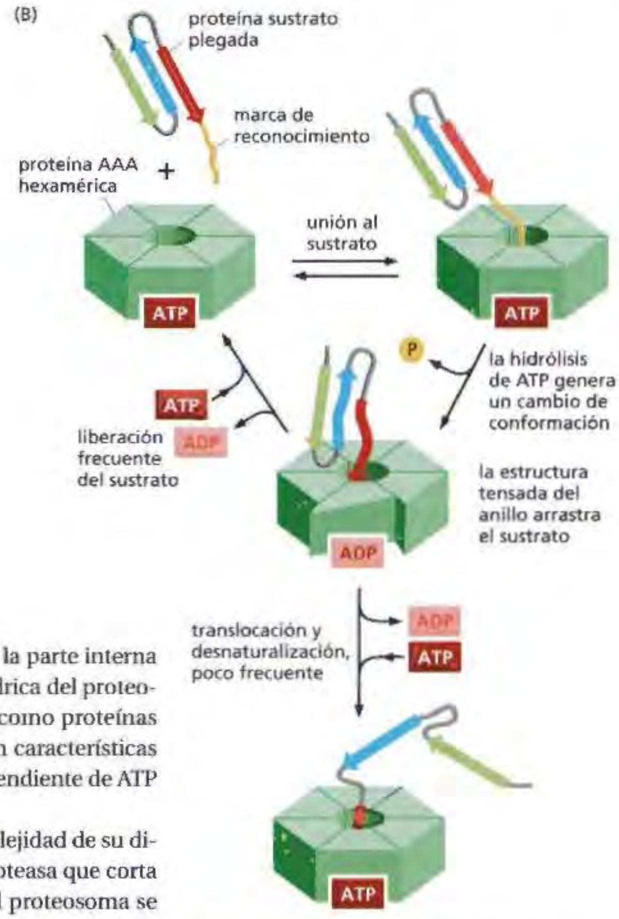


Figura 6–91 Una proteína desplegasa hexamérica. (A) La estructura está formada por seis subunidades, cada una de las cuales pertenece a la familia de las proteínas AAA. (B) Modelo de la actividad de la desplegasa dependiente de ATP de las proteínas AAA. La forma unida a ATP de un anillo hexamérico de proteínas AAA se une a una proteína sustrato plegada y marcada para ser desplegada (y finalmente destruida) mediante una marca de reconocimiento como una cadena de poliubiquitina (véase más adelante) o el péptido añadido para marcar las proteínas sintetizadas de forma incompleta (véase la Figura 6–81). Un cambio conformacional, irreversible debido a la hidrólisis de ATP, estira el sustrato hacia el interior del corazón central y tensa la estructura en anillo. En este momento, la proteína sustrato que está siendo arrastrada hacia el interior, puede desplegarse parcialmente y entrar en el poro, o mantener su estructura y disociarse. Las proteínas sustrato muy estables pueden necesitar cientos de ciclos de hidrólisis de ATP y disociación antes de entrar con éxito en el anillo de AAA. Una vez se ha desplegado, la proteína sustrato se desplaza relativamente deprisa a través del poro por rondas sucesivas de hidrólisis de ATP. (A, de X. Zhang et al., *Mol. Cell* 6:1473-1484, 2000, y A.N. Lupas y J. Martin, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12:746-753, 2002; B, de R.T. Sauer et al., *Cell* 119:9-18, 2004. Todo con la autorización de Elsevier.)

despliegan a través de la cubierta, exponiéndola a las proteasas que tapizan la parte interna del proteosoma (**Figura 6–91**). Las proteínas que forman la estructura cilíndrica del proteosoma pueden pertenecer a un tipo de proteínas "desplegasas" conocidas como proteínas AAA. Muchas de ellas actúan como hexámeros y es posible que compartan características mecánicas con las helicasas de DNA que desenroscan el DNA de forma dependiente de ATP (véase Figura 5–15)

Una propiedad crucial del proteosoma, y una de las razones de la complejidad de su diseño, es la *progresividad* de su mecanismo: a diferencia de una "sencilla" proteasa que corta la cadena polipeptídica sustrato una sola vez antes de disociarse de ella, el proteosoma se mantiene unido al sustrato hasta que lo transforma completamente en pequeños péptidos.

Las cubiertas 19S también actúan como "puertas" en la entrada de la cámara proteolítica interna, y son las responsables de reconocer y unirse a las proteínas seleccionadas como sustrato del proteosoma. Con pocas excepciones, los proteosomas actúan sobre proteínas que han sido marcadas específicamente para su destrucción mediante la unión covalente de una marca de reconocimiento formada por una pequeña proteína llamada *ubiquitina* (**Figura 6–92A**). La ubiquitina de las células se halla libre o unida a una gran variedad de proteínas intracelulares. En muchos de los casos, la unión de esta ubiquitina a una proteína acaba desencadenando la destrucción de la proteína en el proteosoma. Sin embargo, en otros casos la marca con ubiquitina tiene un significado completamente diferente. Por último, lo que determina la manera en que la célula interpreta el mensaje de la ubiquitina es el número de moléculas de ubiquitina y la manera a través de la cual se unen entre sí (**Figura 6–93**). En las próximas secciones destacaremos el papel de la ubiquitinación señalando la degradación de las proteínas.

Un elaborado sistema de conjugación con ubiquitina señala las proteínas que deben ser destruidas

Para conjugarse con otras proteínas, la ubiquitina debe ser preparada por la enzima *activadora de la ubiquitina* (E1), dependiente de ATP, que genera una ubiquitina activada, unida a E1, que será transferida a una enzima perteneciente a un conjunto de enzimas *conjugadoras de la ubiquitina* (E2) (Figura 6–92B). Las enzimas E2 actúan en combinación con otras proteínas accesorias (E3). En los complejos E2-E3, denominados *ubiquitina ligasas*, el componente E3 se une a unas señales específicas de degradación (*degrons*), de las proteínas sustratos, ayudando a la enzima E2 a formar una cadena de *poliubiquitina* unida a un residuo de lisina de la proteína sustrato. En esta cadena, el residuo C-terminal de cada molécula de ubiquitina se une a un residuo específico de lisina de la molécula de ubiquitina precedente (véase Figura 6–93), generando una cadena lineal de conjugados ubiquitina-ubiquitina (Figura 6–92C). Esta cadena de poliubiquitina unida a la proteína diana es la señal que reconocerá un receptor específico del proteosoma.

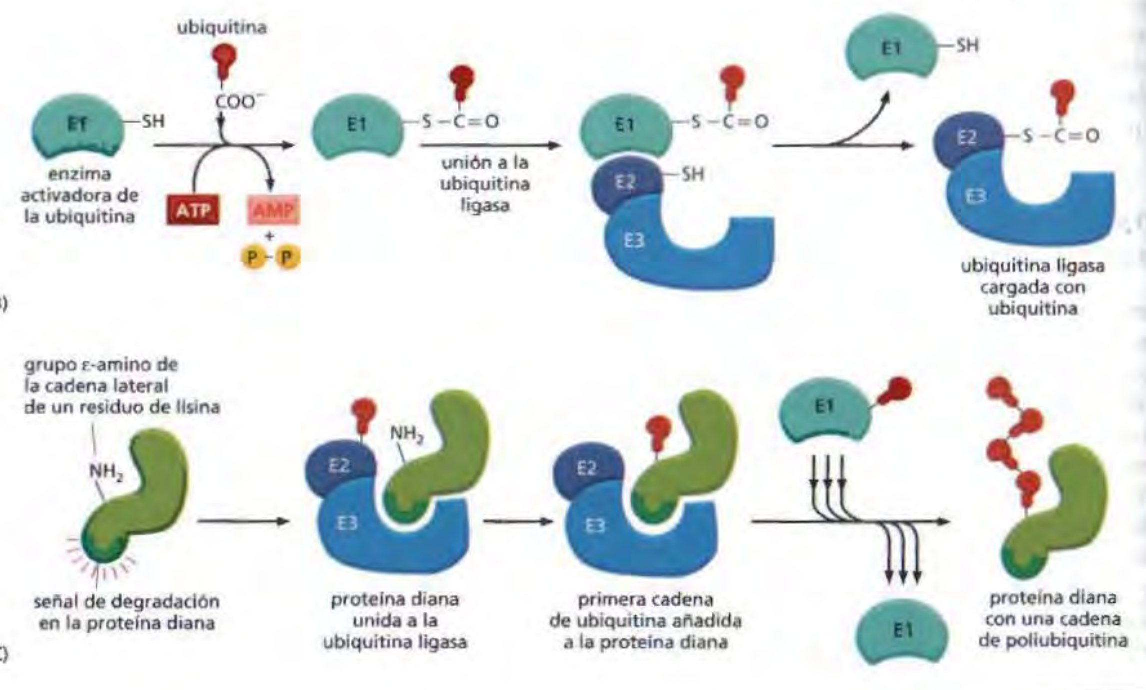
En mamíferos, se conocen aproximadamente 30 enzimas E2 estructuralmente similares pero centenares de proteínas E3 diferentes capaces de formar complejos con enzimas E2 específicas. Por lo tanto, el sistema ubiquitina-proteosoma consta de muchas vías proteolíticas distintas pero organizadas de forma similar, que tienen en común tanto la enzima E1 al inicio de la vía como el proteosoma al final y que difieren en la composición de sus ubiquitinas ligasa E2-E3 y en los factores accesorios. Las diversas ubiquitinas ligasa reconocen diferentes señales de degradación, de modo que marcan a los diferentes grupos de proteínas intracelulares para su destrucción.

Las proteínas desnaturalizadas o mal plegadas, así como las proteínas que contengan aminoácidos oxidados o con otras anomalías, son reconocidas y destruidas porque las proteínas anormales tienden a presentar en su superficie las secuencias de aminoácidos o los motivos conformacionales que son reconocidos como señales de degradación por determinadas moléculas E3 del sistema ubiquitina-proteosoma. En las proteínas normales, estas secuencias deben estar escondidas y, por lo tanto, son inaccesibles. Sin embargo, una vía proteolítica que reconoce y destruye proteínas anómalas tiene que ser capaz de distinguir entre proteínas *completas* que tienen conformaciones "equivocadas" y los polipéptidos crecientes unidos a los ribosomas (o los que acaban de ser liberados de los ribosomas) que todavía no han alcanzado su conformación plegada normal. No se trata de un problema trivial; se cree que el sistema ubiquitina-proteosoma puede destruir muchas de las proteínas nacientes y recién formadas, no porque sean anómalas sino porque exponen transitoriamente algunas señales de degradación que deberían estar escondidas en su estado maduro (plegado).

Figura 6–92 La ubiquitina y el marcaje de proteínas con cadenas de poliubiquitina. (A) Estructura tridimensional de la ubiquitina; esta proteína consta de 76 aminoácidos. (B) El extremo C-terminal de la ubiquitina se activa inicialmente mediante su unión a la cadena lateral de una cisteína de la proteína E1, un enlace tioéster de alta energía. Esta reacción requiere ATP y tiene lugar mediante la formación de un intermediario covalente AMP-ubiquitina. La ubiquitina activada en la E1, también conocida como la enzima activadora de la ubiquitina, es transferida a las cisteínas de un conjunto de moléculas E2. Estas moléculas E2 forman complejos con las proteínas que integran la familia E3, incluso más numerosa que la anterior. (C) Adición de una cadena de poliubiquitina a una proteína diana. En una célula de mamífero hay varios centenares de complejos E2-E3 distintos, alguno de los cuales reconoce una señal de degradación específica en las proteínas diana mediante su componente E3. Las enzimas E2 reciben el nombre de enzimas conjugadoras de la ubiquitina. Las enzimas E3 se suelen llamar ubiquitinas ligasa, pero es más exacto mantener este nombre para el complejo funcional E2-E3. En la Figura 3–79 se representa la estructura detallada de un complejo como éste.



(A)



(B)
(C)

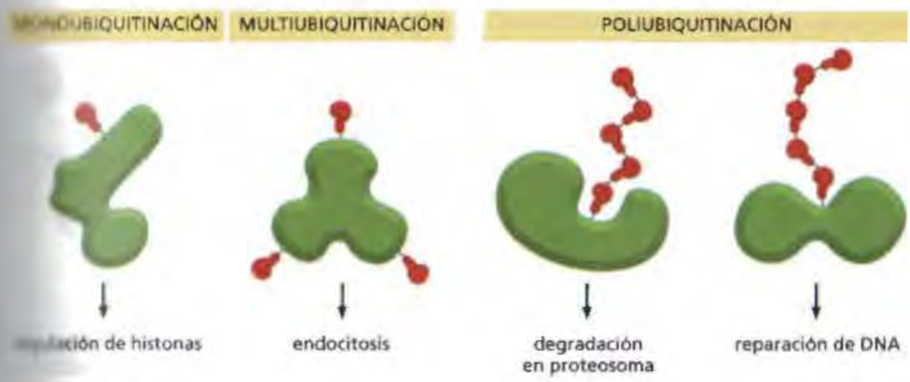


Figura 6–93 Marcaje de proteínas por la ubiquitina. Cada uno de los patrones de modificación que se muestran puede tener un significado específico para la célula. Los dos tipos de poliubiquitinación se diferencian en la manera en la que se unen entre sí las diferentes moléculas de ubiquitina. La unión a través de Lys48 significa degradación por el proteosoma mientras que la unión a través de Lys63 tiene otros significados. El marcaje con ubiquitina es "leído" por proteínas que reconocen de forma específica cada tipo de modificación.

Muchas proteínas se controlan mediante la regulación de su destrucción

Una de las funciones de los mecanismos proteolíticos intracelulares es reconocer y eliminar las proteínas mal plegadas o anómalas, tal como hemos descrito. Otra función de estas vías proteolíticas es la de conferir vidas medias cortas a algunas proteínas normales cuya concentración debe cambiar drásticamente en respuesta a alteraciones del estado de la célula. Algunas de estas proteínas de vida corta siempre se degradan rápido, pero en muchos otros casos la vida corta de la proteína es *condicional*, es decir, se trata de proteínas metabólicamente estables en algunas condiciones que se inestabilizan en respuesta a determinados cambios en el estado de la célula. Por ejemplo, las ciclinas mitóticas tienen vidas largas durante la mayor parte del ciclo celular hasta que sufren una repentina degradación al final de la mitosis, como se explica en el Capítulo 17.

¿Cómo se puede controlar la destrucción regulada de una proteína? Se conocen algunos mecanismos para este proceso, como ilustraremos mediante ejemplos específicos a lo largo de este libro. En un tipo general de estos mecanismos (**Figura 6–94**A), la actividad de una ubiquitina ligasa se estimula mediante la fosforilación de E3 o por una transición alostérica en la molécula de E3 causada por su unión a alguna molécula específica. Por ejemplo, el complejo promotor de la anafase (APC: ***anaphase-promoting complex***) es una ubiquitina ligasa formada por diversas subunidades que se activa por la unión de una de estas subunidades durante la mitosis. El complejo APC, una vez activado, provoca la degradación de las ciclinas mitóticas y otros reguladores de la transición entre la metafase y la anafase (véase la Figura 17–44).

Otra opción es generar una señal de degradación en una proteína que carecía de ella, en respuesta a estímulos intracelulares o procedentes del entorno, provocando su rápida ubiquitinización y su destrucción por el proteosoma. Una manera sencilla de generar esta señal consiste en fosforilar un determinado residuo de una proteína que provoca el desenmascaramiento de una señal de degradación que estaba escondida. Otra manera de desenmascarar esa señal consiste en la disociación regulada de alguna subunidad proteica. Finalmente, también se pueden generar potentes señales de degradación mediante la rotura de un enlace peptídico, siempre y cuando esta escisión genere un nuevo extremo N-terminal que sea reconocido por una enzima E3 como un residuo N-terminal "desestabilizador" (Figura 6–94B).

Este tipo de señal de degradación basado en el extremo N-terminal surge a causa de la "regla del extremo N", que relaciona la vida media de una proteína *in vivo* con la identidad de su residuo N-terminal. En la levadura *S. cerevisiae*, existen 12 residuos desestabilizadores según la regla del extremo N (Arg, Lys, His, Phe, Leu, Tyr, Trp, Ile, Asp, Glu, Asn y Gln). Los residuos N-terminales desestabilizadores son reconocidos por una ubiquitina ligasa especial, conservada desde las levaduras a los humanos.

Todas las proteínas se sintetizan inicialmente con una metionina (o una formilmetionina en bacterias) como su residuo N-terminal, un residuo estabilizador según la regla del extremo N. Unas proteasas especiales, llamadas metionina aminopeptidasas, suelen eliminar la primera metionina de la proteína naciente, pero sólo lo hacen si el segundo residuo también es un residuo estabilizador de acuerdo con la regla del extremo N. Al principio, no se entendía cómo se formaban los sustratos de la regla del extremo N *in vivo*. Sin embargo, ahora sabemos que estos sustratos están formados por proteasas específicas de lugar. Por ejemplo, una subunidad de la cohesina, un complejo proteico que mantiene unidas a las cromátidas her-

manas, es cortada por una proteasa altamente específica durante la transición metafase-anafase. Esta escisión regulada por el ciclo celular permite la separación de las cromátidas hermanas y permite alcanzar el final de la mitosis (véase la Figura 17–44). El fragmento C-terminal de la subunidad escindida queda con una arginina en su extremo N-terminal, un residuo desestabilizador según la regla del extremo N. Se han obtenido células mutantes que carecen de esta regla del extremo N. Estas células presentan un gran incremento en la frecuencia de pérdidas de cromosomas, probablemente porque, al no poder degradar este fragmento de la subunidad de la cohesina, se interfiere con la formación de los nuevos complejos de cohesina asociados a las cromátidas en el siguiente ciclo celular.

Las proteínas plegadas de forma anormal pueden formar agregados que causan graves enfermedades humanas

Muchas enfermedades hereditarias humanas (p. ej., la anemia celular perniciosa [véase p. 1495] y la deficiencia de α-antitripsina, una condición que a menudo provoca alteraciones del hígado y enfisema) se producen por proteínas mutantes que escapan de los controles de calidad de la célula, se pliegan de forma anormal y forman agregados. Al absorber macromoléculas críticas, estos agregados pueden dañar gravemente a las células e incluso provocar su muerte. A menudo la herencia de un único alelo mutante de un gen puede causar la enfermedad, ya que la copia normal del gen no puede proteger a la célula de las propiedades destructivas de los agregados.

En humanos normales, el declive gradual de los sistemas de control de calidad de las proteínas celulares también puede causar enfermedades, al permitir que las proteínas nor-

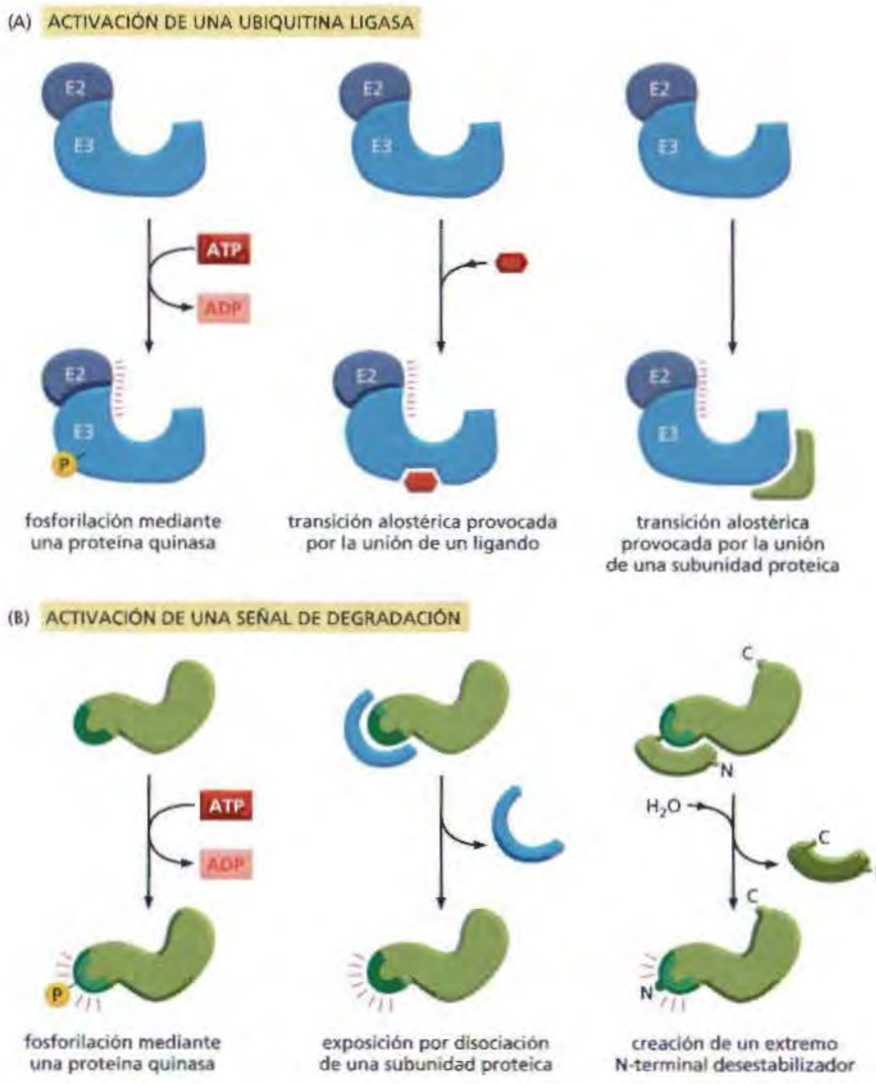


Figura 6–94 Dos vías generales de inducir la degradación de una proteína determinada. (A) La activación de una molécula específica de E3 genera una nueva ubiquitina ligasa. (B) Creación de una señal de degradación en la proteína diana. Esta señal se une a la ubiquitina ligasa y provoca la adición de una cadena de poliubiquitina a un residuo de lisina de la proteína diana. Se sabe que las seis vías que se recogen en esta figura son utilizadas por las células enviando las proteínas seleccionadas hacia el proteosoma.

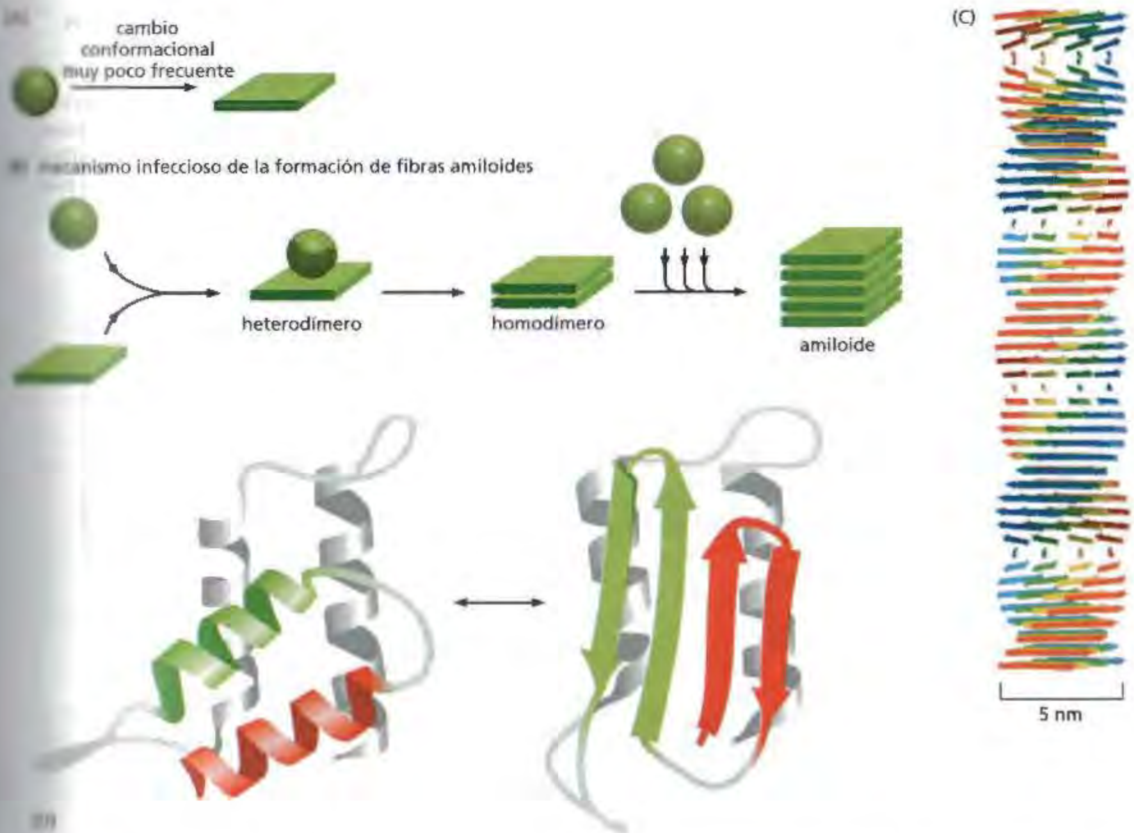


Figura 6–95 Agregados proteicos que causan enfermedades humanas. (A) Ilustración esquemática del tipo de cambio conformacional de una proteína que produce material para un filamento de entrecruzamiento beta. (B) Esquema que ilustra la naturaleza autoinfecciosa de la agregación proteica que es la base de las enfermedades causadas por priones. PrP (*prion protein*) es muy poco común porque la versión mal plegada de la proteína, llamada PrP*, induce un cambio de conformación en las moléculas normales de la proteína PrP cuando entra en contacto con ellas. Muchas de las enfermedades humanas causadas por la agregación de proteínas son provocadas por la sobreproducción de una variante proteica especialmente proclive a la agregación, aunque estos agregados proteicos no pueden propagarse de un animal a otro. (C) Dibujo de un filamento de entrecruzamiento beta, un tipo común de agregado polímero resistente a las proteasas, hallado en diversas enfermedades neurológicas humanas. Debido a que las interacciones por puentes de hidrógeno en las láminas β se forman entre los átomos del esqueleto polipeptídico (véase la Figura 3–9), esta estructura se puede formar a partir de diferentes proteínas anormalmente plegadas. (D) Uno de los posibles modelos de la conversión de PrP en PrP*, que muestra de qué manera se pueden convertir dos hélices α en cuatro láminas β. Aunque la estructura de la proteína normal ha sido determinada con precisión, la estructura de la variante infecciosa no ha llegado a ser establecida con certeza porque la agregación ha impedido utilizar las técnicas habituales en biología estructural. (C, cortesía de Louise Serpell, adaptado de M. Sunde et al., *J. Mol. Biol.* 273:729-739, 1997. Con la autorización de Academic Press; D, adaptado de S.B. Prusiner, *Trends Biochem. Sci.* 21:482-487, 1996. Con la autorización de Elsevier.)

células formen agregados (**Figura 6–95**). En algunos casos los agregados proteicos son liberados por las células muertas y se acumulan en la matriz extracelular que rodea las células de un tejido y en los casos extremos también pueden afectar a estos tejidos. El cerebro es especialmente vulnerable, ya que está formado por una colección de células nerviosas altamente organizadas. Por lo tanto, no resulta sorprendente que estos agregados proteicos originen sobre todo enfermedades neurodegenerativas. Entre ellas, destacan las enfermedades de Huntington y de Alzheimer, esta segunda responsable de la demencia senil de más de 20 millones de personas en todo el mundo.

Para que un tipo particular de agregado proteico pueda acumularse, expandirse y llegar a dañar al organismo, debe ser muy resistente a la proteolisis tanto fuera como dentro de la célula. Muchos de los agregados proteicos que causan problemas forman fibrillas constituidas por una serie de cadenas polipeptídicas dispuestas en capas, unas sobre otras, formando pilas de láminas β. Estos *filamentos de entrecruzamiento beta* (Figura 6–95C), estructuras particularmente resistentes a la proteolisis, se presentan en muchas enfermedades neurológicas provocadas por agregados proteicos, en las que producen diferentes depósitos que tienen una tinción anómala, conocidos como *amiloides*.

Una variedad particular de estas patologías ha alcanzado una notoriedad especial. Se trata de las **enfermedades causadas por priones**. Al contrario que las enfermedades de Hun-

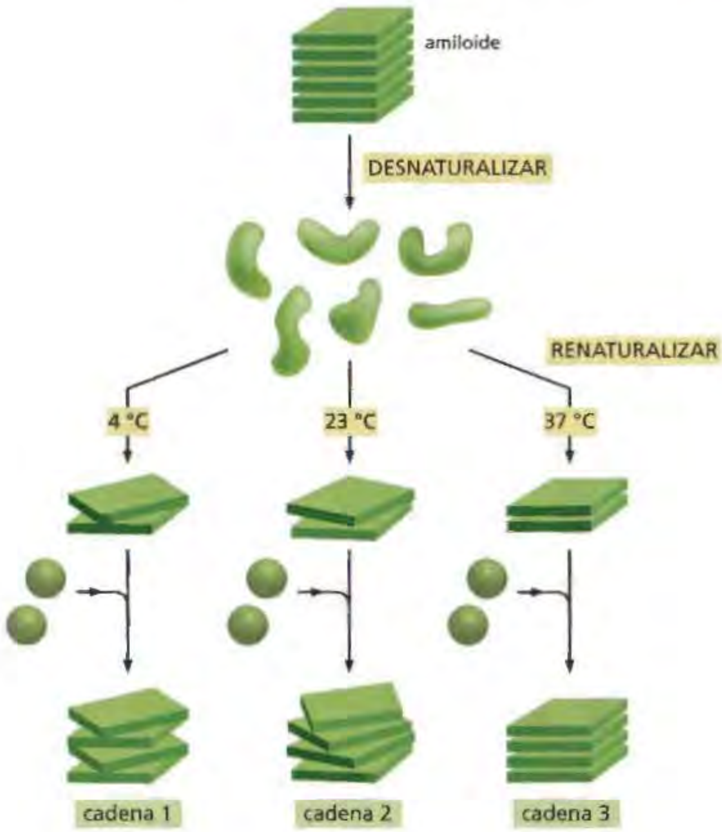


Figura 6-96 Formación de diferentes cadenas de priones *in vitro*. En este experimento, las fibras amiloides se desnaturalizaron y sus componentes se renaturalizaron a diferentes temperaturas. Este tratamiento produce tres tipos diferentes de amiloides, cada uno de los cuales puede autopropagarse cuando se le incorporan nuevas subunidades.

tington o de Alzheimer, una enfermedad causada por un prión puede transmitirse de un organismo a otro si este segundo se alimenta a partir de tejido que contenga el agregado. Un grupo de enfermedades -llamadas *scrapie* en ovejas, la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (CJD) en humanos y la encefalopatía espongiforme bovina (BSE) en el ganado vacuno- son provocadas por los agregados de una forma mal plegada de la proteína de prión llamada PrP (*prion protein*). La proteína PrP se localiza habitualmente en la superficie externa de la membrana plasmática, sobre todo en neuronas. Su función normal es desconocida. Sin embargo, la proteína Prp tiene la desafortunada propiedad de poder adquirir una conformación anormal muy especial (Figura 6-95A). Esta conformación no sólo forma filamentos de entrecruzamiento beta muy resistentes a las proteasas, sino que además es "infecciosa", ya que puede inducir a que las moléculas de PrP plegadas correctamente adopten la misma conformación patológica. Esta propiedad genera una retroalimentación positiva que propaga la forma anómala de PrP, llamada PrP* (Figura 6-95B) y que, por tanto, permite que la conformación patológica se extienda rápidamente de célula a célula en el cerebro, provocando la muerte tanto en animales como en humanos. Puede resultar peligroso consumir los tejidos de los animales que contienen PrP*, como demuestra la transmisión en Gran Bretaña de la BSE (comúnmente llamada la enfermedad de las vacas locas) desde el ganado a los humanos. Afortunadamente, en ausencia de PrP*, la PrP es muy difícil que adopte su forma anómala

Aunque muy pocas proteínas tienen la capacidad de plegarse erróneamente formando una conformación infecciosa, otro ejemplo causa una enigmática enfermedad por "herencia de una proteína", observada en células de levadura. La capacidad de estudiar proteínas infecciosas en levaduras ha clarificado otra característica destacable de los priones. Estas moléculas proteicas pueden formar diferentes tipos distintivos de agregados a partir de la misma cadena polipeptídica. Además, cada tipo de agregados puede ser infeccioso y forzar a las moléculas proteicas normales a adoptar el mismo tipo de estructura anormal. Así, a partir de una misma cadena polipeptídica pueden aparecer algunas "razas" diferentes de partículas infecciosas (**Figura 6-96**). Todavía no conocemos de qué forma una misma secuencia polipeptídica puede adoptar varias formas de agregados; es posible que todos los agregados de priones se parezcan a filamentos beta cruzados (véase Figura 6-95C) en los que la estructura está íntimamente relacionada sobre todo con interacciones de la cadena peptídica principal. Este hecho dejaría libres a las cadenas laterales de los aminoácidos para que adop-

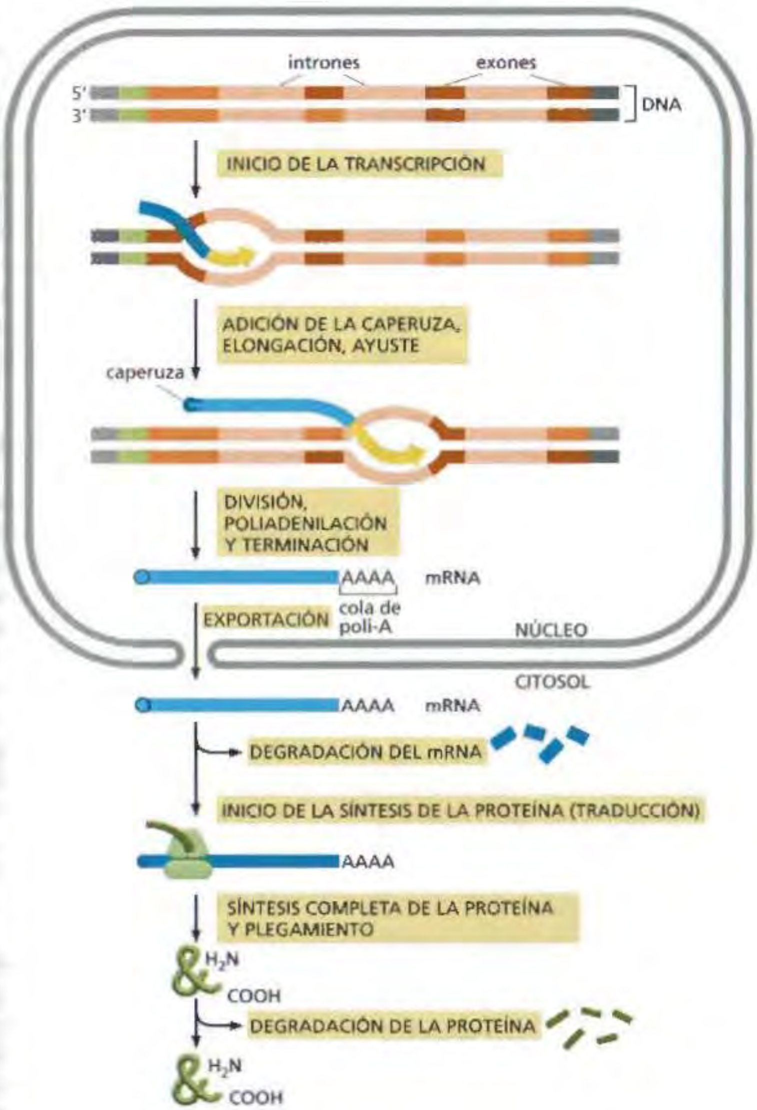


Figura 6–97 Producción de una proteína en una célula eucariota. Los niveles finales de cada proteína en una célula eucariota dependen de la eficiencia de cada uno de los pasos descritos en esta figura.

[illegible] diferentes conformaciones y, si las estructuras son autopropagantes, se explicaría la existencia de razas diferentes.

Por último, aunque los priones se descubrieron debido a que generan enfermedades, parece que también desempeñan algunas funciones positivas en la célula. Por ejemplo, algunas especies de hongos utilizan las transformaciones priónicas para establecer diferentes tipos de células. A pesar de que la idea es controvertida, se ha propuesto que los priones tienen un papel en la consolidación de memorias en organismos pluricelulares complejos, como el nuestro.

Entre el DNA y las proteínas existen muchas etapas

En este capítulo, hemos visto que se requieren muchos tipos diferentes de reacciones químicas para llegar a fabricar, a partir de la información contenida en un gen, una proteína plegada correctamente (**Figura 6–97**). Por lo tanto, la concentración final de esta proteína depende de la eficiencia con la que se lleva a cabo cada una de estas etapas.

En el capítulo siguiente, veremos que las células tienen la capacidad de cambiar las concentraciones de sus proteínas según sus necesidades. En principio, cualquiera de los pasos esquematizados en la Figura 6–97 puede darse en cada una de las proteínas. Como se describirá en el Capítulo 7, existen ejemplos de regulación en cada una de las etapas que van desde el gen hasta la proteína. Sin embargo, el inicio de la transcripción es el punto más común para que una célula regule la expresión de cada uno de sus genes. No deja de tener sentido, ya que la manera más eficiente de reprimir la expresión de un gen es bloquear el primer paso: la transcripción de su secuencia de DNA a una molécula de RNA.

Resumen

La traducción de una secuencia de nucleótidos de una molécula de mRNA a una proteína tiene lugar en el citoplasma, en un gran complejo ribonucleoproteico llamado ribosoma. Primero, los aminoácidos utilizados para la síntesis de la proteína tienen que unirse a una familia de moléculas de tRNA. Cada molécula de tRNA reconoce, mediante interacciones entre pares de bases complementarias, grupos particulares de tres nucleótidos del mRNA (codones). La secuencia de nucleótidos del mRNA se lee desde un extremo al otro en grupos de tres, según el código genético.

Para iniciar la traducción, una subunidad ribosómica menor se une a la molécula de mRNA en el codón de inicio (AUG), que es reconocido por una única molécula de tRNA iniciador. El ribosoma se completa con la unión de una subunidad ribosómica mayor y se inicia la fase de elongación de la síntesis proteica. Durante esta fase, los aminoacil-tRNA –cada uno de los cuales es portador de un aminoácido específico– se unen secuencialmente a los codones apropiados del mRNA mediante la formación de pares de bases complementarias entre los anticodones del tRNA y los codones de mRNA. Cada aminoácido se incorpora al extremo C-terminal de la cadena polipeptídica en crecimiento mediante un ciclo de cuatro etapas secuenciales. Los factores de elongación utilizan la hidrólisis de GTP para dirigir estas etapas hacia delante y para mejorar la precisión de la selección de los aminoácidos. La molécula de mRNA avanza, codón a codón, a través del ribosoma en dirección 5' a 3' hasta que alcanza uno de los tres posibles codones de paro. En este momento se une al ribosoma un factor liberador, concluyendo la traducción y liberándose el polipéptido completo.

Los ribosomas eucariotas y bacterianos están muy estrechamente emparentados, a pesar de algunas diferencias en el número y tamaño de sus componentes de rRNA y de proteínas. El rRNA tiene un papel principal en la traducción, determinando la estructura global del ribosoma, formando los sitios de unión para los tRNA, apareando los tRNA a sus codones del mRNA y generando el lugar activo de la enzima peptidil transferasa que une covalentemente los aminoácidos durante la traducción.

En las etapas finales de la síntesis proteica, dos tipos distintos de chaperonas moleculares guían el plegamiento de las cadenas polipeptídicas. Estas chaperonas, conocidas como Hsp60 y Hsp70, reconocen las regiones hidrofóbicas expuestas en las proteínas, evitando su agregación que, de no ser por las chaperonas, podría competir con el correcto plegamiento de las proteínas recién sintetizadas y evitar que alcanzasen sus conformaciones tridimensionales correctas. El proceso de plegamiento de la proteína debe competir también con un complejo mecanismo de control de calidad que destruye las proteínas que presentan regiones hidrofóbicas expuestas anormalmente. En este caso, la ubiquitina se une de forma covalente a la proteína mal plegada mediante una ubiquitina ligasa y la cadena de poliubiquitina resultante es reconocida por las cubiertas del proteosoma, que desplaza toda la proteína sustrato hacia el interior del proteosoma para su degradación proteolítica. Para determinar la vida media de muchas proteínas plegadas correctamente, se utiliza un mecanismo proteolítico parecido basado en el reconocimiento de señales específicas de degradación mediante ubiquitinas ligasa. Gracias a este método, se eliminan de la célula algunas proteínas seleccionadas, en respuesta a señales específicas.

EL MUNDO DE RNA Y EL ORIGEN DE LA VIDA

La expresión de la información hereditaria requiere una maquinaria extraordinariamente compleja y transcurre desde el DNA hasta la proteína utilizando el RNA como intermediario. Esta maquinaria presenta una paradoja fundamental: si los ácidos nucleicos son necesarios para sintetizar proteínas y las proteínas, a su vez, son necesarias para sintetizar ácidos nucleicos, ¿de qué forma apareció un sistema como éste de componentes interdependientes? Una hipótesis sostiene que antes de que las células actuales aparecieran en la Tierra existió un *mundo de RNA* (**Figura 6–98**). Según esta hipótesis, el RNA era capaz de almacenar la información genética y de catalizar las reacciones químicas en las células primitivas. No fue hasta más tarde que el DNA se convirtió en el material genético y las proteínas, en los princi-



Figura 6–98 Evolución temporal del universo en la que se muestra la supuesta existencia de un mundo de seres vivos basados en el RNA.

pales componentes catalíticos y estructurales de la célula. Si esta idea es correcta, entonces la transición desde el mundo de RNA nunca fue completa; como se ha descrito en este capítulo, el RNA todavía cataliza algunas reacciones fundamentales en las células actuales, una especie de fósiles moleculares de un mundo anterior.

En esta sección presentamos algunos de los argumentos que apoyan la hipótesis del mundo de RNA. Veremos que algunas de las características más sorprendentes de las células actuales, como el ribosoma y la maquinaria de maduración del pre-mRNA, se pueden explicar fácilmente como descendientes de una compleja trama de interacciones mediadas por el RNA que dominaron el metabolismo celular en el mundo de RNA. También explicaremos de qué manera el DNA asumió el papel de material genético, cómo pudo surgir el código genético y de qué forma las proteínas han eclipsado al RNA como las principales encargadas de la catálisis bioquímica en las células actuales.

La vida requiere información almacenada

Se ha propuesto que las primeras moléculas "biológicas" de la Tierra se formaron mediante una catálisis mediada por metales sobre las superficies cristalinas de los minerales. En principio, sobre estas superficies pudo llegar a existir un elaborado sistema de síntesis y degradación molecular (metabolismo) antes de que aparecieran las primeras células. A pesar de diferentes controversias, muchos científicos creen que en la Tierra prebiótica tuvo lugar una fase de evolución química, durante la cual pequeñas moléculas que podían catalizar su propia síntesis competían entre sí por materiales de construcción.

Pero la vida requiere mucho más que esto. Como se describe en el Capítulo 1, la característica principal de la vida quizá es la *herencia*. Una célula no sólo es capaz de utilizar materiales de construcción para generar una red de reacciones catalizadas, sino que además puede hacer esto de acuerdo con un elaborado juego de instrucciones codificados en la información hereditaria. La replicación de esta información asegura que el complejo metabolismo de las células puede reproducirse cuidadosamente a sí mismo. Otra característica esencial de la vida es la variabilidad genética procedente de cambios en la información hereditaria. Esta variabilidad, sobre la que actúan presiones de selección, es la responsable de la gran diversidad de vida de nuestro planeta.

Así, la aparición de la vida requiere algún sistema para almacenar información, duplicarla y cambiarla y algún sistema para transformar la información a través de catálisis en reacciones químicas favorables. Sin embargo, ¿cómo se puede formar un sistema semejante? En las células actuales, los catalizadores más versátiles son los polipéptidos, formados por muchos aminoácidos diferentes con cadenas laterales químicamente diversas y, por consiguiente, capaces de adoptar diversas formas tridimensionales recubiertas de grupos químicos reactivos. Los polipéptidos también contienen información sobre el orden de sus aminoácidos. Sin embargo, no conocemos ninguna manera a través de la cual un polipéptido sea capaz de reproducirse a sí mismo especificando directamente la formación de otra molécula con la misma secuencia exacta.

Los polinucleótidos pueden almacenar información y catalizar reacciones químicas

Los polinucleótidos tienen una propiedad que contrasta con las de los polipéptidos: pueden guiar directamente la formación de copias de su propia secuencia. Esta capacidad depende del apareamiento de bases complementarias entre sus nucleótidos constituyentes, que permiten que un polinucleótido actúe como molde para la formación de otro. Como hemos visto en este capítulo y en el precedente, estos mecanismos de complementariedad de bases subyacen a los procesos de replicación del DNA y transcripción de las células actuales.

Pero la síntesis eficiente de polinucleótidos mediante estos mecanismos de complementariedad de un molde requieren la presencia de unos catalizadores que aceleren la reacción de polimerización: sin catalizadores, la formación del polímero es lenta, sujeta a errores e ineficiente. Actualmente, la polimerización de nucleótidos sobre un molde es catalizada rápidamente mediante enzimas proteicas, como la DNA y la RNA polimerasas. ¿Cómo pudo estar catalizada esta polimerización antes de la aparición de las proteínas con la especificidad catalítica apropiada? Esta pregunta comenzó a responderse en 1982, cuando se descubrió que las propias moléculas de RNA podían actuar como catalizadores. En este capítulo se

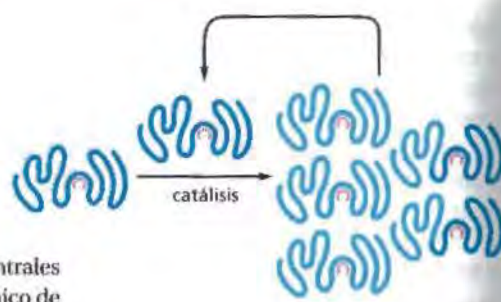


Figura 6–99 Una molécula de RNA que puede catalizar su propia síntesis. Este hipotético proceso requeriría la catálisis de la producción tanto de una segunda cadena de RNA con una secuencia de nucleótidos complementaria, como la utilización de este segundo RNA como molde para formar muchas más moléculas del RNA con la secuencia original. Las líneas *rojas* representan el centro activo de esta hipotética enzima de RNA.

ha indicado, por ejemplo, que una molécula de RNA cataliza una de las reacciones centrales de la célula, la unión covalente de aminoácidos dando lugar a proteínas. El potencial único de las moléculas de RNA para actuar tanto como portadoras de información como catalizadores forma la base de la hipótesis del mundo de RNA.

Por lo tanto, el RNA tiene todas las propiedades necesarias para que una molécula pueda catalizar una gran variedad de reacciones químicas, incluidas las que dan lugar a su propia síntesis (**Figura 6–99**). Aunque no se han encontrado en la naturaleza sistemas autorreplicantes basados en moléculas de RNA, los científicos y científicas se muestran esperanzados de poderlos obtener en el laboratorio. Aunque esta demostración no probaría que las moléculas autorreplicantes de RNA fueran esenciales en el origen de la vida en la Tierra, sí que indicaría que dicho escenario es posible.

Un mundo de pre-RNA pudo depredar el mundo de RNA

Aunque el RNA parece adecuado para constituir la base de un sistema autorreplicante de catalizadores bioquímicos, no está claro que fuera la primera molécula que desempeñará este papel. Desde un punto de vista puramente químico, resulta difícil imaginar de qué manera se habrían podido formar largas moléculas de RNA mediante mecanismos exclusivamente no enzimáticos. De entrada, los precursores del RNA, los ribonucleótidos, son difíciles de obtener de forma no enzimática. Además, la formación del RNA requiere que se forme una larga serie de enlaces fosfodiéster 3' a 5', en competencia con otras reacciones, como la hidrólisis, las uniones 2' a 5', las uniones 5' a 5', etc. Ante estos problemas, se ha sugerido que las primeras moléculas que tuvieron a la vez actividad catalítica y capacidad de almacenar información pudieron ser polímeros relacionados con el RNA, pero químicamente más sencillas (**Figura 6–100**). No tenemos remanentes de estos compuestos en las células actuales ni

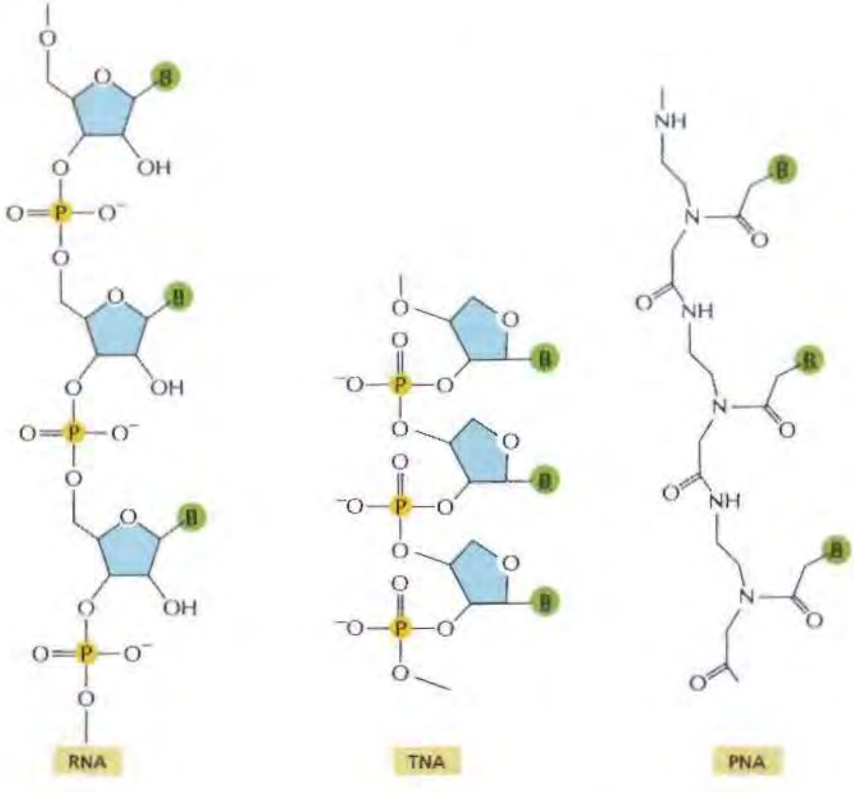
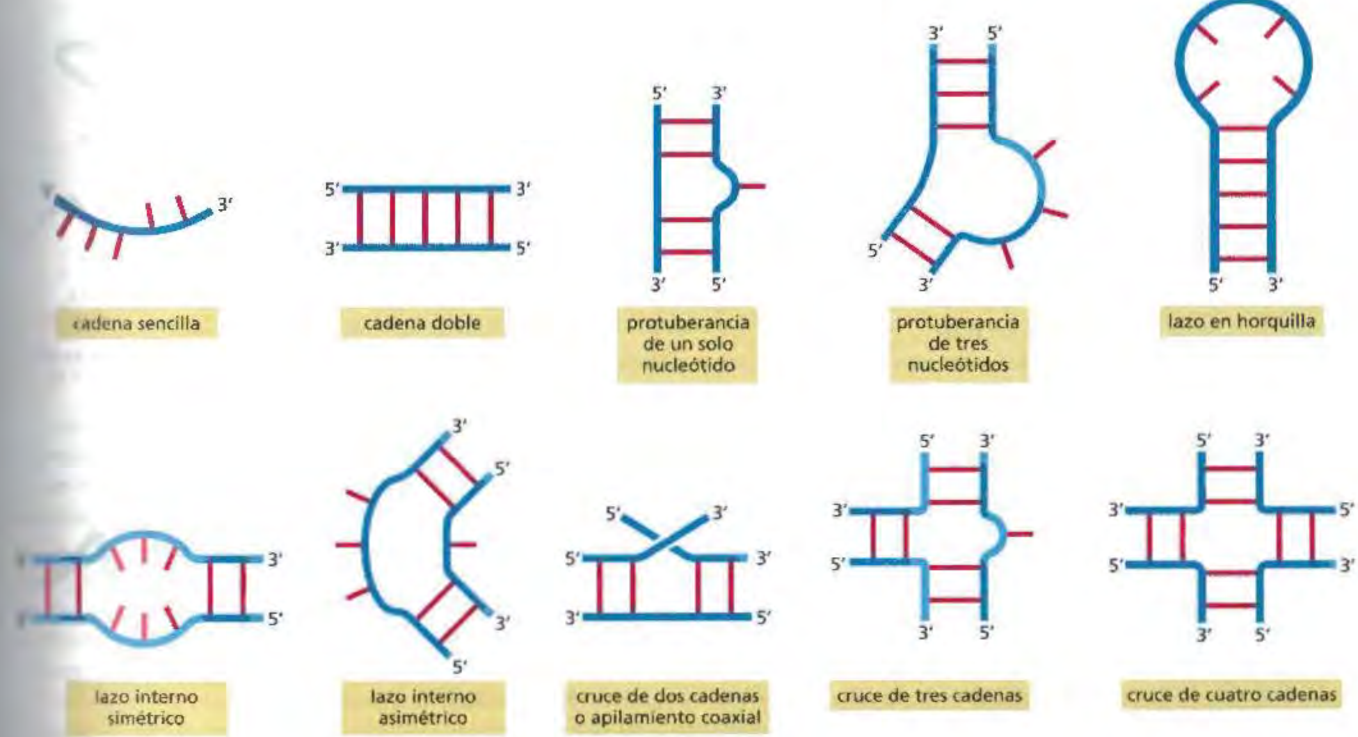


Figura 6–100 Estructuras del RNA y de dos polímeros relacionados capaces de almacenar información. En cada caso, B representa las bases de purina o pirimidina. El polímero TNA (ácido treosa-nucleico: *threose nucleic acid*) tiene un azúcar con 4 átomos de carbono en contraste con los cinco carbonos de la ribosa en el RNA. En el PNA (ácido péptido-nucleico: *peptide nucleic acid*), el esqueleto de ribosa fosfato del RNA se ha sustituido por un esqueleto peptídico idéntico al que se encuentra en las proteínas. Al igual que el RNA, tanto el TNA como el PNA pueden formar dobles hélices mediante el apareamiento de bases complementarias, por lo que cada uno podría servir, en principio, de molde para su propia síntesis.



han dejado ningún registro fósil. Sin embargo, la relativa sencillez de estos "polímeros semejantes al RNA" sugiere que uno de ellos y no el propio RNA, pudiera haber sido el primer biopolímero de la Tierra capaz de almacenar información y de tener actividad catalítica.

Si la hipótesis del mundo de pre-RNA es correcta, debió ocurrir una transición al mundo de RNA, probablemente a través de la síntesis de RNA utilizando uno de estos polímeros más simples, tanto de patrón como de catalizador. Mientras los detalles de los mundos de pre-RNA y de RNA sigan siendo un misterio, sabemos que las moléculas de RNA catalizan una amplia variedad de reacciones químicas. Ahora volveremos a las propiedades del RNA que las hacen posible.

Figura 6–101 Elementos encontrados habitualmente en la estructura secundaria del RNA. Las interacciones convencionales entre bases complementarias se representan mediante líneas *rojas* en los segmentos de doble hélice del RNA.

Las moléculas de RNA de cadena sencilla se pueden plegar formando estructuras altamente elaboradas

Hemos visto que entre los nucleótidos de una misma cadena se pueden establecer apareamientos de bases complementarias y otros tipos de enlaces de hidrógeno, haciendo que la molécula de RNA se pliegue de una manera única, determinada por su secuencia de nucleótidos (véase, p. ej., las Figuras 6–6, 6–52 y 6–69). El estudio comparativo de muchas estructuras de RNA ha revelado motivos conservados, cortos elementos estructurales que se repiten una y otra vez como partes de estructuras mayores. En la **Figura 6–101** se muestran algunos de estos motivos de estructura secundaria del RNA y en la **Figura 6–102** se muestran algunos

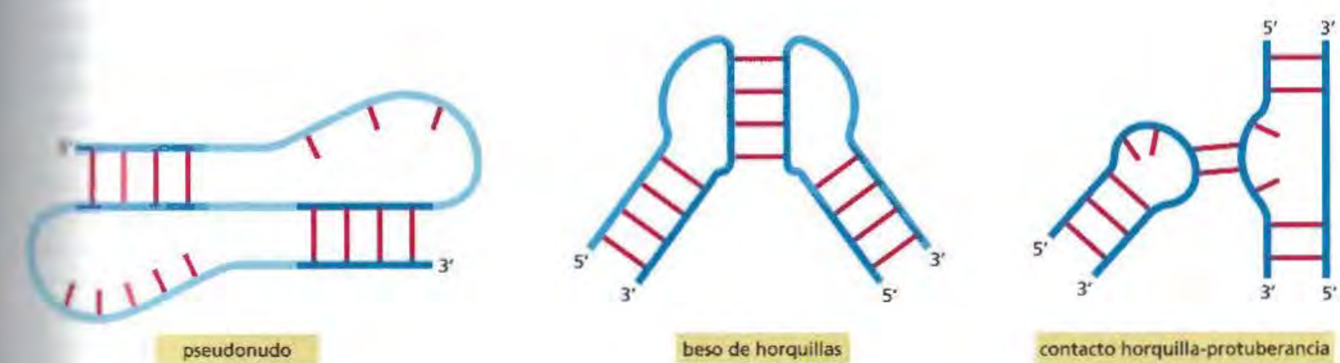


Figura 6–102 Ejemplos de interacciones terciarias del RNA. Algunas de estas interacciones pueden aproximar dos partes distantes de la misma molécula de RNA o juntar dos moléculas diferentes de RNA.

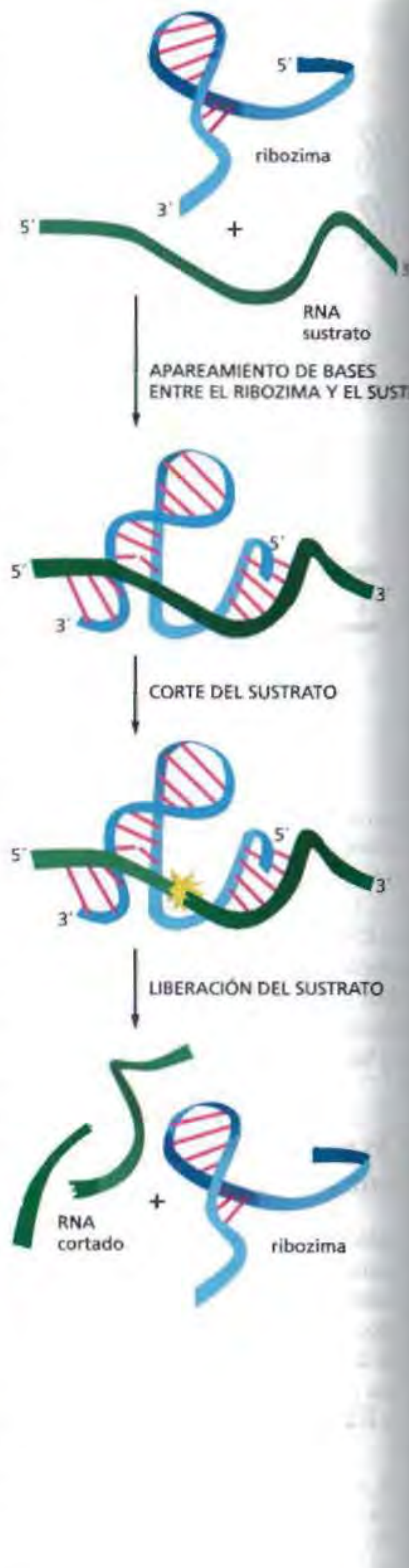


Figura 6–103 Una ribozima. Esta sencilla molécula de RNA cataliza la rotura de una segunda molécula de RNA en un lugar específico. Esta ribozima se encuentra embebida en grandes genomas RNA –llamados viroides– que infectan plantas. La rotura, que en la naturaleza se produce alejada sobre la misma molécula de RNA que contiene la ribozima, constituye una etapa de la replicación del genoma viroide. Aunque no se muestra en la figura, la reacción requiere una molécula de Mg situada en el lugar activo. (Adaptado de T.R. Cech y O.C. Uhlenbeck, *Nature* 372:39-40, 1994. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

ejemplos de interacciones más complejas y a menudo entre regiones más alejadas, conocidas como interacciones terciarias del RNA.

Los catalizadores proteicos requieren una superficie con sus perfiles y propiedades químicas únicas sobre la cual pueden reaccionar determinados sustratos (tal como se ha descrito en el Capítulo 3). Las moléculas de RNA con un plegamiento apropiado pueden actuar exactamente de esta misma manera, como una enzima (**Figura 6–103**). Al igual que algunas proteínas, muchas de estas ribozimas requieren la presencia de iones metálicos en sus centros activos para funcionar. Esta característica amplía el rango de actividades catalíticas del limitado número de grupos químicos de una cadena de polinucleótidos.

Se conocen relativamente pocos RNA catalíticos en las células actuales y gran parte de nuestras especulaciones sobre el mundo de RNA procede de experimentos en el laboratorio en los que se generan grandes conjuntos de moléculas de RNA de secuencias aleatorias. A continuación, se seleccionan y se estudian aquellas moléculas de RNA, muy poco frecuentes, que presentan una actividad catalítica determinada por el experimentador (**Figura 6–104**). Este tipo de experimentos ha generado RNA capaces de catalizar una gran variedad de reacciones bioquímicas (**Tabla 6–5**), con incrementos de velocidad de reacción semejantes a los de las proteínas. Dados estos hechos, no está claro por qué en las células actuales el número de catálisis enzimática sobrepasa extraordinariamente al número de ribozimas. Diferentes experimentos han mostrado que las moléculas de RNA pueden tener más dificultad que las de proteína para unirse a sustratos flexibles e hidrofóbicos; además, la disponibilidad de 20 tipos de aminoácidos respecto a cuatro tipos de bases puede proporcionar a las proteínas un gran número de estrategias catalíticas.

Al igual que las proteínas, los RNA pueden sufrir cambios conformacionales, tanto en respuesta a moléculas pequeñas como a otros RNA. Ya hemos visto varios ejemplos de ello tanto en el ribosoma como en el espliceosoma y veremos otros ejemplos cuando analicemos los *ribointerruptores* en el Capítulo 7. Uno de los cambios de conformación de RNA más destacados se ha observado en un ribosoma artificial, que puede existir en dos conformaciones cada una de las cuales tiene una actividad catalítica diferente (**Figura 6–105**). Desde el descubrimiento de la catálisis mediada por RNA, ha quedado claro que el RNA es una molécula muy versátil, por lo que resulta fácil imaginar la existencia pasada de un mundo de RNA con un elevado nivel de sofisticación bioquímica.

Las moléculas autorreplicantes pueden estar sometidas a selección natural

La estructura tridimensional plegada de un polinucleótido afecta a su estabilidad, a sus acciones sobre otras moléculas y a su capacidad de replicarse. Por lo tanto, en cualquier mezcla de moléculas autorreplicantes, algunos polinucleótidos tendrán mayores probabilidades de éxito que otros. Como en cualquier proceso de copia, inevitablemente habrá errores, por lo que a lo largo del tiempo se generarán nuevas variantes de estos polinucleótidos.

Algunas actividades catalíticas habrían tenido una importancia fundamental en los inicios de la evolución de la vida. Consideremos una molécula de RNA que pueda ayudar a catalizar el proceso de polimerización a partir de un molde, utilizando cualquier molécula de RNA como molde (**Figura 6–106**). Esta molécula, actuando sobre copias de sí misma, se puede replicar. Al mismo tiempo, puede favorecer la replicación de otros tipos de moléculas de RNA en su entorno (**Figura 6–107**). Si alguno de estos RNA vecinos tiene acciones catalíticas que ayuden a la supervivencia del RNA de otras maneras (p. ej. catalizando la producción de ribonucleótidos), este conjunto de diferentes tipos de moléculas de RNA, cada uno especializado en una actividad diferente, podrían evolucionar hacia un sistema cooperativo que se replicase con una eficiencia extraordinariamente elevada.

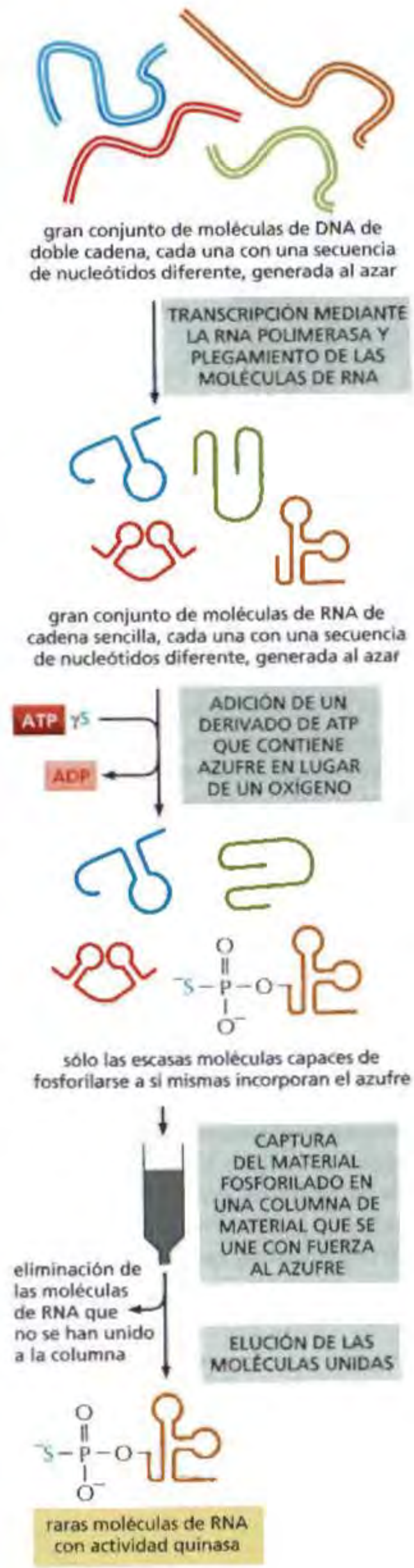


Figura 6–104 Selección *in vitro* de una ribozima sintética. A partir de un gran conjunto de moléculas de ácido nucleico sintetizadas en el laboratorio, se pueden aislar y estudiar aquellas moléculas de RNA, muy poco frecuentes, que tienen una actividad catalítica específica. Aunque se muestra un ejemplo (una ribozima con capacidad de autofosforilarse), se han utilizado variantes de este método para generar muchas de las ribozimas que se presentan en la Tabla 6–5. Durante la etapa de autofosforilación, las moléculas de RNA se mantienen lo bastante diluidas como para evitar la fosforilación cruzada de otras moléculas de RNA. En realidad, se necesitan varias repeticiones de este proceso para seleccionar las moléculas de RNA, extraordinariamente escasas, con esta capacidad catalítica. El material eluido inicialmente de la columna es convertido de nuevo en DNA, amplificado un gran número de veces (usando la transcriptasa inversa y la PCR, como se explica en el Capítulo 8), de nuevo transcrito a RNA y sometido a repetidas rondas de selección. (Adaptado de J.R. Lorsch y J.W. Szostak, *Nature* 371:31-36, 1994. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

Pero para que evolucione cualquiera de estos sistemas cooperativos, deberían estar presentes juntos en un mismo compartimiento. Por ejemplo, un conjunto de RNA mutuamente beneficiosos (como los de la Figura 6–107) sólo podría replicarse si todos los RNA permanecieran en la proximidad del RNA especializado en la polimerización a partir de un molde. Además, la compartimentación podría haber impedido la entrada en el sistema de moléculas de RNA parásitas. Por tanto, la selección de conjuntos de moléculas de RNA según la calidad de los sistemas autorreplicantes que los generaron no pudo tener lugar de una forma eficiente hasta que hubo evolucionado algún tipo de compartimiento capaz de contenerlos.

Una forma inicial y bastante simple de compartimentación pudo haber sido la adsorción a determinadas superficies o partículas. La necesidad de tipos más sofisticados de contenedores está cubierta fácilmente por una clase de pequeñas moléculas que tienen la propiedad físico-química tan simple de ser *anfifílicas*, es decir, contener una parte hidrófoba (insoluble en agua) y otra parte hidrófila (soluble en agua). Cuando estas moléculas están en el agua, se agregan, disponiendo sus partes hidrofóbicas lo más en contacto entre sí posible y las regiones hidrofílicas en contacto con el agua. Las moléculas anfifílicas con la estructura correcta se agregan de manera espontánea en forma de *bicapas* y generan pequeñas vesículas cerradas, cuyo contenido acuoso queda aislado del medio externo (**Figura 6–108**). Este fenómeno se puede observar mezclando fosfolípidos y agua: bajo las condiciones apropiadas, se formarán pequeñas vesículas. Todas las células actuales están rodeadas por una *membrana plasmática* formada por moléculas anfifílicas –principalmente fosfolípidos– con esta configuración; veremos estas moléculas con más detalle en el Capítulo 10.

Probablemente, las primeras células rodeadas por una membrana se formaron por el ensamblaje espontáneo de un grupo de moléculas anfifílicas que encerraron una mezcla de

Tabla 6–5 Algunas reacciones bioquímicas que pueden ser catalizadas por ribozimas

ACTIVIDAD	RIBOZIMAS
Formación del enlace peptídico en la síntesis de proteínas	RNA ribosómico
Corte del RNA, ligación	RNA autocatalíticos; RNasa P; también RNA seleccionado *in vitro*
Corte del DNA	RNA autocatalíticos
Maduración del RNA	RNA autocatalíticos, quizá RNA del espliceosoma
Polimerización del RNA	RNA seleccionado *in vitro*
Fosforilación del RNA y del DNA	RNA seleccionado *in vitro*
Aminoacilación del RNA	RNA seleccionado *in vitro*
Alquilación del RNA	RNA seleccionado *in vitro*
Formación de enlaces amida	RNA seleccionado *in vitro*
Formación de enlaces glucosídicos	RNA seleccionado *in vitro*
Reacciones de oxidación/reducción	RNA seleccionado *in vitro*
Formación de la unión carbono-carbono	RNA seleccionado *in vitro*
Formación de la unión fosfoamida	RNA seleccionado *in vitro*
Intercambio bisulfito	RNA seleccionado *in vitro*

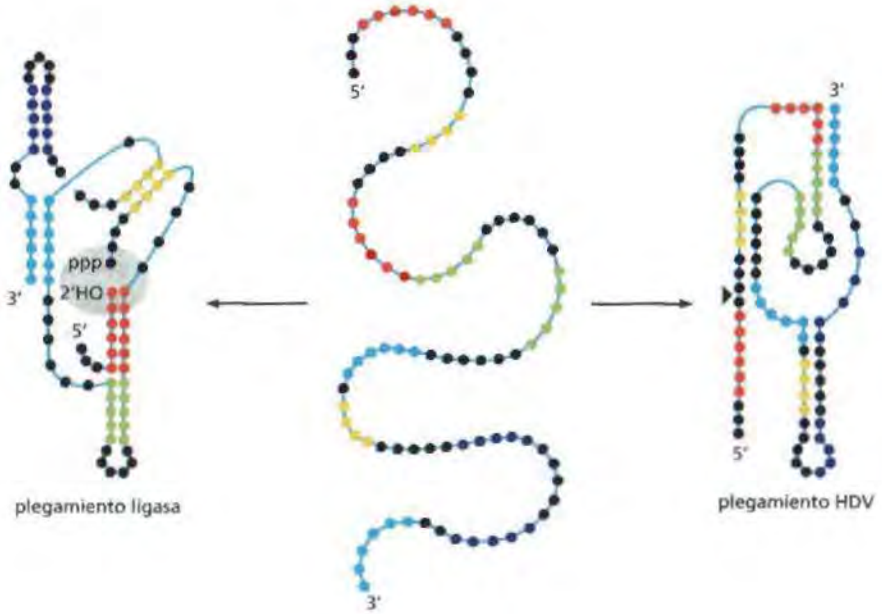


Figura 6–105 Una molécula de RNA que se pliega dando lugar a dos ribozimas diferentes. Este RNA de 88 nucleótidos, generado en el laboratorio, se puede plegar formando una ribozima que lleva a cabo una reacción de autounión (*izquierda*) o una reacción de autoescisión (*derecha*). La reacción de unión forma un enlace 2',5' fosfodiéster con la liberación de pirofosfato. Esta reacción sella el corte (sombreado en *gris*) que se había introducido de forma experimental en la molécula de RNA. En la reacción llevada a cabo por el plegamiento HDV, el RNA se corta en esa misma posición, indicada por la *punta de flecha*. Esta rotura recuerda la que tiene lugar en el ciclo vital del HDV, un virus satélite de la hepatitis B, de aquí el nombre del plegamiento. Cada nucleótido se representa por un *punto coloreado*, pero los colores sólo se utilizan para clarificar los dos patrones de plegamiento. Las estructuras plegadas ilustran las estructuras secundarias de las dos ribozimas, con las regiones de bases complementarias indicadas por la proximidad de los *puntos coloreados*. Es de destacar que ambas ribozimas no tienen estructuras secundarias comunes. (Adaptado de E.A. Schultes y D.P. Bartel, *Science* 289:448-452, 2000. Con la autorización de AAAS.)

RNA (o pre-RNA) autorreplicante y otras moléculas (**Figura 6–109**). A pesar de que no está claro en qué punto de la evolución de los catalizadores biológicos pudo haber ocurrido este suceso por primera vez, cuando las moléculas de RNA quedan selladas dentro de una membrana cerrada pueden empezar a evolucionar como portadores de instrucciones genéticas: se pueden seleccionar nuevas variantes no sólo en base a su estructura, sino también en base a sus efectos sobre las demás moléculas del mismo compartimiento. Las secuencias de nucleótidos de las moléculas de RNA podrían expresarse ahora en las características de una célula viva.

¿Cómo evolucionó la síntesis de proteínas?

Los procesos moleculares sobre los que descansa la síntesis de proteínas en las células actuales parecen muy complejos. Aunque entendemos cómo funcionan muchos de ellos, no parecen tener un sentido conceptual global semejante al de la transcripción, reparación y replicación del DNA. En particular, resulta difícil imaginar de qué manera evolucionó la síntesis de proteínas porque actualmente la lleva a cabo un complejo sistema integrado de proteínas y RNA; obviamente, las proteínas no podían existir antes de que hubiera alguna versión inicial del aparato de traducción funcionando. La hipótesis del mundo de RNA es es-

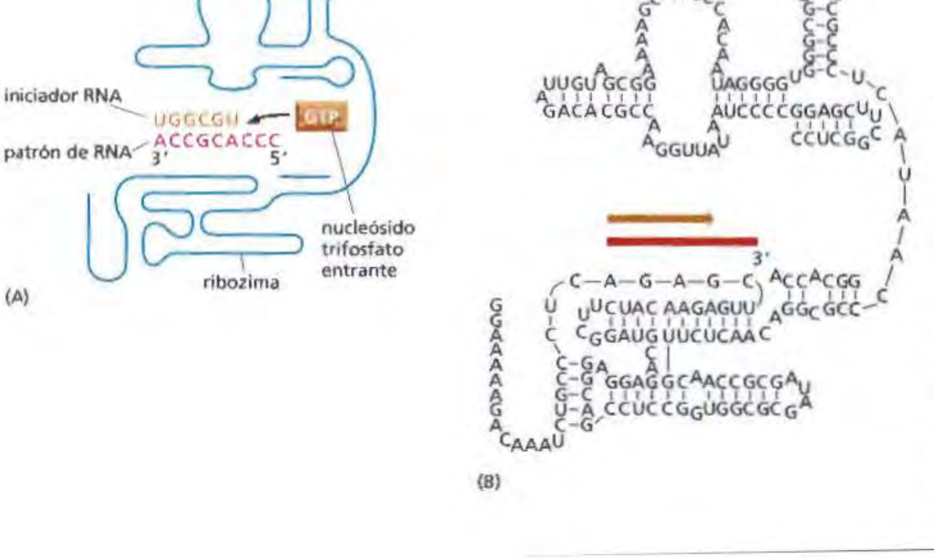


Figura 6–106 Una ribozima generada en el laboratorio que puede catalizar la síntesis de RNA sobre un patrón, a partir de nucleótidos trifosfato. (A) Esquema de la ribozima en el que se muestra una etapa de la reacción de polimerización sobre un patrón que cataliza. (B) Secuencia de nucleótidos de la ribozima en la que se indican los pares de bases que se forman. A pesar de la relativa ineficiencia (sólo puede sintetizar RNA cortos), más del 95% de las veces esta ribozima añade la base correcta que indica el patrón. (De W.K. Johnston et al., *Science* 292:1319-1325, 2001. Con autorización de la AAAS.)

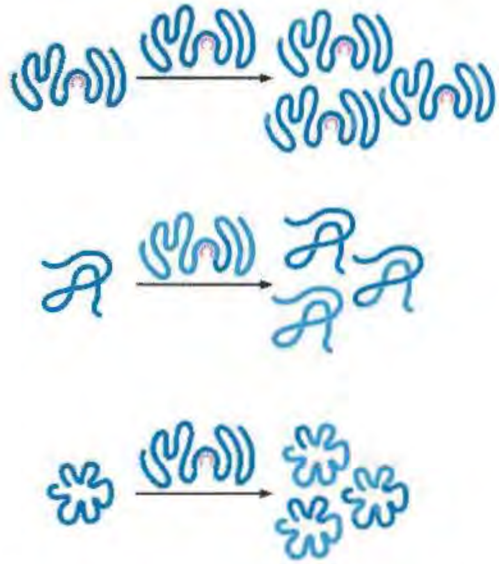


Figura 6–107 Una familia de moléculas de RNA mutuamente beneficiosas. Una molécula es la ribozima que se autorreplica, además de otras moléculas de RNA. Las otras moléculas catalizarían tareas secundarias necesarias para la supervivencia del sistema cooperativo, por ejemplo, sintetizando desoxinucleótidos para la síntesis de RNA o fosfolípidos para la compartimentación.

particularmente atractiva, ya que el uso de RNA tanto en la transmisión de la información como en la catálisis parece económico y conceptualmente sencillo. Por muy atractiva que sea esta idea sobre la vida primitiva, no explica cómo apareció el sistema actual de síntesis de proteínas. Aunque sólo podemos especular sobre los orígenes de la síntesis moderna de proteínas y del código genético, algunas observaciones experimentales han propuesto diferentes escenarios posibles.

En las células actuales, algunos péptidos cortos (como los antibióticos) son sintetizados sin la participación de ribosomas. Las enzimas péptido sintetasas ensamblan estos péptidos, con una secuencia apropiada de sus aminoácidos, sin la participación de mRNA que guíe su síntesis. Resulta plausible que esta versión de síntesis proteica no codificada se hubiera desarrollado durante el mundo de RNA, donde podría haber estado catalizada por moléculas de RNA. Esta idea no presenta dificultades conceptuales porque, como hemos visto, en las células actuales los rRNA catalizan la formación de enlaces peptídicos. También sabemos que las ribozimas generadas en el laboratorio pueden realizar reacciones de aminoacilación específicas, es decir, pueden juntar específicamente aminoácidos con moléculas de tRNA. Por tanto, es posible que en el mundo de RNA aparecieran adaptadores semejantes a tRNA, cada uno de los cuales estaría unido de forma específica a un aminoácido, marcando el principio del código genético.

En principio, otros RNA (los precursores de los mRNA) pudieron haberse utilizado como patrones para dirigir la polimerización no al azar de algunos aminoácidos diferentes. Cualquier RNA que colaborará en guiar la síntesis de un polipéptido útil, tendría una gran ventaja en la lucha de la evolución por la supervivencia. Podemos imaginar una ribozima peptidil transferasa inicial, relativamente inespecífica, que a lo largo del tiempo creciera y adquiriera la capacidad de colocar los tRNA cargados en una posición precisa frente a los moldes de RNA, llevando finalmente hasta el ribosoma moderno. Una vez empezó a evolucionar la síntesis proteica, se abrió el camino para la transición a un mundo de predominio proteico, en el que las proteínas acabarían asumiendo la mayoría de las funciones catalíticas y estructurales gracias a su mayor versatilidad, con 20 subunidades diferentes en lugar de 4.

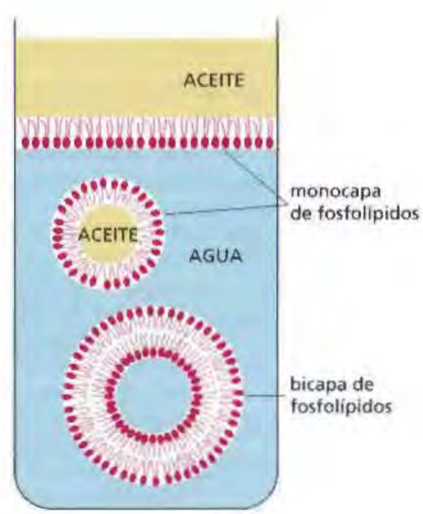


Figura 6–108 Formación de una membrana de fosfolípidos. Dado que estas moléculas tienen una cabeza hidrófila y una cola lipófila, en una interfase agua/aceite se alinean con sus cabezas hacia el agua y sus colas hacia el aceite. En el agua, se asocian en bicapas formando vesículas cerradas, en las que las colas lipófilas están en contacto unas con otras y las cabezas hidrófilas quedan expuestas hacia el agua.

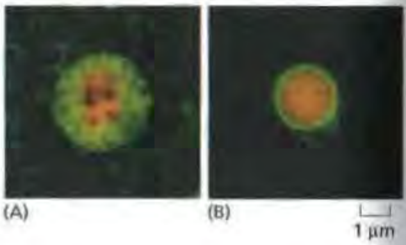


Figura 6–109 Encapsulación de RNA por moléculas sencillas anfifílicas. En estos experimentos se utilizó la arcilla mineral montmorillonita para unir RNA con ácidos grasos. (A) Una partícula de montmorillonita recubierta de RNA (*rojo*) ha quedado atrapada dentro de una vesícula de ácidos grasos (*verde*). (B) RNA (*rojo*) en solución encapsulado por ácidos grasos (*verde*). Estos experimentos demuestran que la montmorillonita puede acelerar notablemente la generación espontánea de vesículas a partir de moléculas anfifílicas y atrapar RNA en su interior. Se ha formulado la hipótesis de que acciones conceptualmente iguales a ésta pudieron haber dado lugar a la primera célula primitiva sobre la Tierra. (De M.M. Hanczyc et al., *Science* 302:618-622, 2003. Con autorización de la AAAS.)

Aunque los escenarios descritos son altamente especulativos, las propiedades conocidas de las moléculas de RNA son consistentes con estas ideas.

Todas las células actuales utilizan DNA como material hereditario

Si las especulaciones evolutivas que se centran en la hipótesis del mundo de RNA son correctas, las células primitivas debieron ser fundamentalmente diferentes a las células que conocemos especialmente en que debieron tener su información hereditaria almacenada en RNA en lugar de DNA (**Figura 6–110**).

La evidencia de que el RNA apareció antes que el DNA a lo largo de la evolución la podemos encontrar en las diferencias químicas entre ambos compuestos. La ribosa, al igual que la glucosa y otros carbohidratos sencillos, se puede formar a partir de formaldehído (HCHO), un compuesto químico sencillo que se puede obtener fácilmente en el laboratorio en experimentos que simulen las condiciones de la Tierra primitiva. El azúcar desoxirribosa, en cambio, es más difícil de obtener. En las células actuales, se obtiene a partir de la ribosa a través de una reacción catalizada por una enzima proteica, lo que sugiere que la ribosa precede a la desoxirribosa en las células. Según la hipótesis más probable el DNA apareció en la escena posteriormente, pero se demostró más apropiado que el RNA como almacén permanente de información genética. En particular, la desoxirribosa de su esqueleto de azúcar-fosfato hace que las cadenas de DNA sean más estables desde un punto de vista químico que las de RNA, de modo que se pueden mantener cadenas de DNA mucho más largas sin que se rompan.

Las otras diferencias entre el RNA y el DNA –la estructura en doble hélice del DNA y la utilización de timina en lugar de uracilo– aumentan la estabilidad del DNA al hacer que los múltiples accidentes que pueden ocurrir en la molécula sean más fáciles de reparar, como se describe en detalle en el Capítulo 5 (véase pp. 296-297 y 300-301).

Resumen

A partir de nuestro conocimiento de los organismos actuales y de las moléculas que contienen, parece probable que el desarrollo de los mecanismos autocatalíticos directos, fundamentales para los sistemas vivos, se iniciase con la evolución de familias de moléculas que pudieran catalizar su propia replicación. Con el tiempo, una familia de catalizadores de RNA cooperantes probablemente desarrolló la capacidad de dirigir la síntesis de polipéptidos. El DNA parece haber sido una adición tardía: a medida que la acumulación de catalizadores proteicos adicionales permitía la evolución de células más eficientes y complejas, la doble hélice de DNA reemplazó al RNA como molécula más estable que permitía el almacenamiento de mayores cantidades de información genética, necesarias para estas nuevas células.

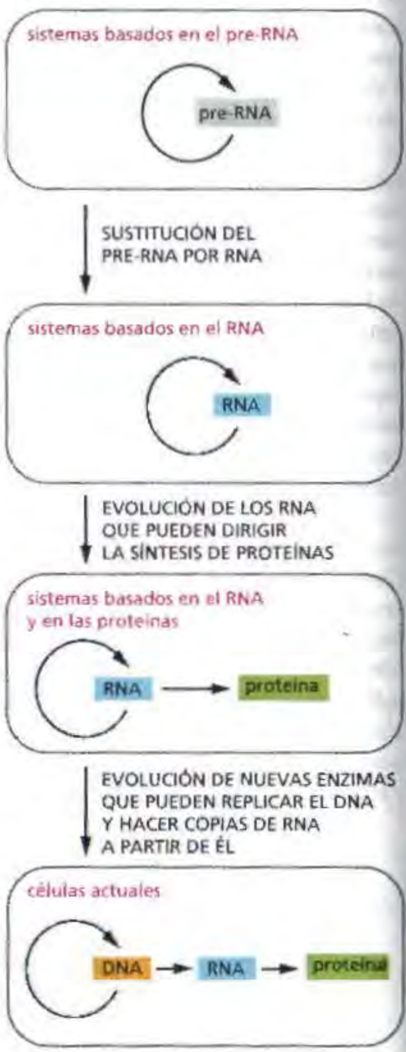


Figura 6–110 La hipótesis de que el RNA precedió al DNA y las proteínas en la evolución. En las células más primitivas, unas moléculas de pre-RNA habrían combinado funciones genéticas, estructurales y catalíticas y el RNA habría asumido de forma gradual el control de éstas. En las células actuales, el DNA es el almacén de la información genética y las proteínas llevan a cabo la mayoría de las funciones catalíticas. El RNA actúa fundamentalmente como un intermediario en la síntesis de las proteínas, aunque todavía sigue siendo el catalizador en unas cuantas reacciones cruciales.

PROBLEMAS

¿Qué afirmaciones son ciertas? Explicar por qué sí o por qué no

6–1 Las consecuencias de los errores en la transcripción son menores que las de los errores en la replicación del RNA.

6–2 Debido a que los intrones son "chatarra" genética, no es necesario que sean eliminados de forma precisa del transcrito primario durante la maduración del RNA

6–3 El balanceo del apareamiento de bases se produce entre la primera posición del codón y la tercera posición del anticodón.

6–4 Se cree que en las células actuales las enzimas proteicas sobrepasan en número a las ribozimas porque catalizan una mayor variedad de reacciones y a velocidades mayores que las ribozimas.

Resolver los siguientes problemas

6–5 ¿En qué sentido se tiene que haber desplazado la RNA polimerasa sobre el molde de la **Figura P6–1** para haber generado las estructuras superenrolladas que se muestran? ¿Es previsible que se generen estructuras superenrolladas si la RNA polimerasa fuese libre de rotar alrededor del eje del DNA a medida que avanza a lo largo del molde?

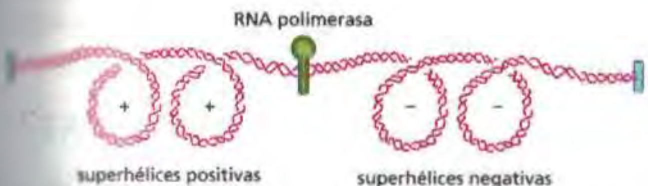


Figura P6–1 Superenrollamientos alrededor de una RNA polimerasa que se desplaza (Problema 6–5).

6–6 Durante la transcripción varios fosfatos se unen al CTD (dominio C-terminal) de la RNA polimerasa II. ¿Cuáles son las diferentes funciones que desempeña la fosforilación de CTD de la RNA polimerasa II?

6–7 El gen de la α-tropomiosina humana madura de forma alternativa produciendo diferentes formas de mRNA de α-tropomiosina en diferentes tipos celulares (**Figura P6–2**). En todas las formas de mRNA, la secuencia de la proteína codificada es la misma para los exones 1 y 10. Los exones 2 y 3 son exones alternativos utilizados en diferentes mRNA, como lo son los exones 7 y 8. ¿Cuál de las siguientes afirmaciones sobre los exones 2 y 3 es la más precisa? ¿Esta afirmación también resulta adecuada para los exones 7 y 8? Explicar las respuestas.

A. Los exones 2 y 3 deben tener el mismo número de nucleótidos.

B. Cada uno de los exones 2 y 3 deben contener un número entero de codones (es decir, el número de nucleótidos dividido por 3 debe ser entero).

C. Cada uno de los exones 2 y 3 tiene que contener un número de nucleótidos que dividido por 3 dé el mismo resto (es decir 0, 1 o 2).



Figura P6–2 mRNA producidos por maduración alternativa a partir del gen humano de la α-tropomiosina (Problema 6–7). **(A)** Exones en el gen de la α-tropomiosina humana. Los *rectángulos azules* y *rojos* indican las localizaciones y los tamaños relativos de los exones. **(B)** Patrones de maduración de cuatro mRNA de α-tropomiosina. La maduración está indicada por *líneas* que conectan los exones que son incluidos en el mRNA.

6–8 Tras tratar unas células con un mutante químico, se aíslan dos mutantes. Uno de ellos presenta alanina y el otro presenta metionina en un lugar de una proteína en el que habitualmente hay una valina (**Figura P6–3**). Después de volver a tratar estos mutantes con el mutágeno, a partir de ambos se aíslan mutantes que contienen treonina en el lugar original de la valina (Figura P6–3). Asumiendo que todas las mutaciones suponen un solo cambio de nucleótido, deducir los codones que utiliza la valina, la metionina, la treonina y la alanina en el lugar afectado. ¿Es posible aislar mutantes de valina a treonina en un solo paso?

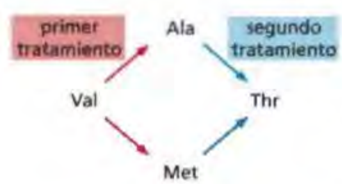


Figura P6–3 Dos rondas de mutagénesis y los aminoácidos alterados en una posición determinada de una proteína (Problema 6–8).

6–9 El factor de elongación EF-Tu introduce dos pequeños retrasos entre la formación de pares de bases codón-anticodón y la formación del enlace peptídico. Estos retrasos incrementan la precisión de la síntesis de proteínas. Describir estos retrasos y explicar cómo aumentan la fidelidad de la traducción.

6–10 Las chaperonas moleculares similares a Hsp60 y las Hsp70 presentan afinidad por zonas hidrofóbicas presentes en proteínas, ya que las utilizan como indicadores de plegamiento incompleto. ¿Por qué se supone que las zonas hidrofóbicas se pueden utilizar como señales críticas del estado de plegamiento de una proteína?

6–11 La mayoría de las proteínas necesitan que chaperonas moleculares les asistan para poderse plegar de forma correcta. ¿Cómo se las arreglan las chaperonas moleculares para plegarse correctamente?

6–12 Qué tiene tan especial el RNA que le hace ser un precursor evolutivo del DNA y de las proteínas tan atractivo? ¿Qué tiene el DNA que le hace ser un material mejor que el RNA para almacenar la información genética?

6–13 Si una molécula de RNA puede formar una horquilla con un lazo interno simétrico, como se muestra en la **Figura 6–4**, el complementario de esta forma de RNA ¿podrá formar una estructura similar? Si es así, ¿tienen que haber algunas regiones de ambas estructuras que sean idénticas? ¿Cuáles?

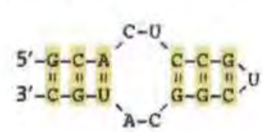


Figura P6–4 Una horquilla de RNA con un lazo interno simétrico (Problema 6–13).

BIBLIOGRAFÍA

General

Berg JM, Tymoczko JL & Stryer L (2006) Biochemistry, 6.ª ed. New York: WH Freeman.

Brown TA (2002) Genomes 2, 2.ª ed. New York: Wiley-Liss.

Gesteland RF, Cech TR & Atkins JF (eds) (2006) The RNA World, 3.ª ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hartwell L, Hood L, Goldberg ML et al (2006) Genetics: from Genes to Genomes, 3.ª ed. Boston: McGraw Hill.

Lodish H, Berk A, Kaiser C et al (2007) Molecular Cell Biology, 6.ª ed. New York: WH Freeman.

Stent GS (1971) Molecular Genetics: An Introductory Narrative. San Francisco: WH Freeman.

The Genetic Code (1966) *Cold Spring Harb. Symp Quant Biol* 31.

The Ribosome (2001) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 66.

Watson JD, Baker TA, Bell SP et al (2003) Molecular Biology of the Gene, 5.ª ed. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings.

Del DNA al RNA

Bentley DL (2005) Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Curr Opin Cell Biol* 17:251–256.

Berget SM, Moore C & Sharp PA (1977) Spliced segments at the 5′ terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:3171–3175.

Black DL (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72:291–336.

Brenner S, Jacob F & Meselson M (1961) An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190:576–581.

Cate JH, Gooding AR, Podell E et al. (1996) Crystal structure of a group I ribozyme domain: principles of RNA packing. *Science* 273:1678–1685.

Chow LT, Gelinas RE, Broker TR et al (1977) An amazing sequence arrangement at the 5′ ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12:1–8.

Cramer P (2002) Multisubunit RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol* 12:89–97.

Daneholt B (1997) A look at messenger RNP moving through the nuclear pore. *Cell* 88:585–588.

Dreyfuss G, Kim VN, & Kataoka N (2002) Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3:195–205.

Houseley J, LaCava J & Tollervey D (2006) RNA-quality control by the exosome. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:529–539.

Izquierdo JM, & Valcárcel J (2006) A simple principle to explain the evolution of pre-mRNA splicing. *Genes Dev* 20:1679–1684.

Kornberg RD (2005) Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem Sci* 30:235–239.

Malik S & Roeder RG (2005) Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem Sci* 30:256–263.

Matsui T, Segall J, Weil PA & Roeder RG (1980) Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J Biol Chem* 255:11992–11996.

Patel AA & Steitz JA (2003) Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4|:960–970.

Phatnani HP & Greenleaf AL (2006) Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev* 20:2922–2936.

Query CC & Konarska MM (2006) Splicing fidelity revisited. *Nature Struct Mol Biol* 13:472–474.

Ruskin B, Krainer AR, Maniatis T et al (1984) Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing *in vitro*. *Cell* 38:317–331.

Spector DL (2003) The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu Rev Biochem* 72:573–608.

Staley JP & Guthrie C (1998) Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92:315–326.

Thomas MC & Chiang CM (2006) The general transcription machinery and general cofactors. *Critical Rev Biochem Mol Biol* 41:105–178.

Wang D, Bushnell DA, Westover KD et al (2006) Structural basis of transcription: role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis. *Cell* 127:941–954.

Del RNA a la proteína

Allen GS & Frank J (2007) Structural insights on the translation initiation complex: ghosts of a universal initiation complex. *Mol Microbiol* 63:941–950.

Anfinsen CB (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181:223–230.

Brunelle JL, Youngman EM, Sharma D et al (2006) The interaction between C75 of tRNA and the A loop of the ribosome stimulates peptidyl transferase activity. *RNA* 12:33–39.

Chien P, Weissman JS, & DePace AH (2004). Emerging principles of conformation-based prion inheritance. *Annu Rev Biochem* 73:617–656.

Crick FHC (1966) The genetic code: III. *Sci Am* 215:55–62.

Hershko A, Ciechanover A & Varshavsky A (2000) The ubiquitin system. *Nature Med* 6:1073–1081.

Ibba M & Soll D (2000) Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu Rev Biochem* 69:617–650.

Kozak M (1992) Regulation of translation in eukaryotic systems. *Annu Rev Cell Biol* 8:197–225.

Kuzmiak HA, & Maquat LE (2006) Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends Mol Med* 12:306–316.

Moore PB & Steitz TA (2005) The ribosome revealed. *Trends Biochem Sci* 30:281–283.

Noller HF (2005) RNA structure: reading the ribosome. *Science* 309:1508–1514.

Ogle JM, Carter AP & Ramakrishnan V (2003) Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends Biochem Sci* 28:259–266.

Prusiner SB (1998) Nobel lecture. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13363–13383.

Rehwinkel J, Raes J & Izaurralde E (2006) Nonsense-mediated mRNA decay: Target genes and functional diversification of effectors. *Trends Biochem Sci* 31:639–646.

Sauer RT, Bolon DN, Burton BM et al (2004) Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines. *Cell* 119:9–18.

Shorter J & Lindquist S (2005) Prions as adaptive conduits of memory and inheritance. *Nature Rev Genet* 6:435–450.

Varshavsky A (2005) Regulated protein degradation. *Trends in Biochem Sci* 30:283–286.

Voges D, Zwickl P & Baumeister W (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68:1015–1068.

Weissmann C (2005) Birth of a prion: spontaneous generation revisited. *Cell* 122:165–168.

Young JC, Agashe VR, Siegers K et al (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5:781–791.

El mundo de RNA y el origen de la vida

Joyce GF (1992) Directed molecular evolution. *Sci Am* 267:90–97.

Orgel L (2000) Origin of life. A simpler nucleic acid. *Science* 290:1306–1307.

Kruger K, Grabowski P, Zaug P et al (1982) Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening seuence of Tetrahymena. *Cell* 31:147–157.

Silverman SK (2003) Rube Goldberg goes (ribo)nuclear? Molecular switches and sensors made from RNA. *RNA* 9:377–383.

Szostak JW, Bartel DP & Luisi PL (2001) Synthesizing life. *Nature* 409:387–390.

El control de la expresión génica

7

El DNA de un organismo codifica todas las moléculas de RNA y de proteína necesarias para la construcción de sus células. Sin embargo, la descripción completa de la secuencia de DNA de un organismo –tanto los pocos millones de nucleótidos de una bacteria como los escasos miles de millones de nucleótidos del genoma humano– no permitiría reconstruir un organismo, como tampoco podríamos reconstruir una obra de Shakespeare a partir de una lista de palabras inglesas. En ambos casos el problema radica en saber cómo se utilizan los elementos de secuencia de DNA o las palabras de la lista ¿En qué condiciones se produce cada uno de los productos génicos y, una vez producido, qué hace cada uno de ellos?

En este capítulo abordaremos la primera parte de este problema, es decir, las reglas y mecanismos que determinan que en cada célula sólo se expresen específicamente una selección de genes. Los mecanismos que controlan la expresión de los genes actúan a varios niveles. Comenzamos con una introducción a algunos de los principios básicos del control génico en los organismos pluricelulares.

En este capítulo

INTRODUCCIÓN AL CONTROL GÉNICO	411
MOTIVOS ESTRUCTURALES DE UNIÓN A DNA EN LAS PROTEÍNAS DE REGULACIÓN GÉNICA	416
CÓMO FUNCIONAN LOS INTERRUPTORES GENÉTICOS	432
MECANISMOS GENÉTICOS MOLECULARES QUE ORIGINAN TIPOS CELULARES ESPECIALIZADOS	453
CONTROLES POSTRANSCRIPCIONALES	477

INTRODUCCIÓN AL CONTROL GÉNICO

Los distintos tipos celulares de un organismo pluricelular suelen diferir profundamente tanto en estructura como en función. Si comparamos, por ejemplo, una neurona de mamífero con un linfocito, observaremos que las diferencias son tan grandes que se hace difícil imaginar que ambas células tienen el mismo genoma (**Figura 7–1**). Por esta razón y porque la diferenciación celular suele ser irreversible, los biólogos inicialmente sospecharon que durante el proceso de diferenciación de las células los genes se deberían perder de modo selectivo. Sin embargo, en la actualidad sabemos que la diferenciación celular depende por lo general de cambios en la expresión génica y no de cambios en la secuencia nucleotídica del genoma celular.

Los distintos tipos celulares de un organismo pluricelular contienen el mismo DNA

Los tipos celulares de un organismo pluricelular se diferencian unos de otros porque sintetizan y acumulan distintos juegos de moléculas de RNA y de proteínas. La mejor evidencia de que esto se consigue sin alterar la secuencia de DNA procede de una serie de experimentos clásicos con ranas. Cuando se inyecta el núcleo de una célula totalmente diferenciada de rana en un huevo cuyo núcleo ha sido eliminado, el núcleo dador inyectado es capaz de programar el huevo receptor para que produzca un renacuajo normal (**Figura 7–2A**). El renacuajo contiene un espectro completo de células diferenciadas, las cuales han adquirido sus secuencias de DNA a partir del núcleo de la célula dadora original, lo cual significa que la célula dadora diferenciada no ha perdido ninguna secuencia importante de DNA. En experimentos realizados con varias plantas se ha llegado a una conclusión similar. En estos experimentos se cultivaron fragmentos de tejido diferenciado en un medio de cultivo sintético y de estos fragmentos se disociaron células individuales. A menudo, cada una de estas células es capaz de regenerar una planta adulta entera (Figura 7–2B). Por último, este mismo principio ha sido demostrado en mamíferos –incluidos ovejas, bovinos, cerdos, cabras, perros y ratones– mediante la introducción de núcleos de células somáticas en el interior de oocitos enucleados. Al implantarse experimentalmente en madres nodriza,



Figura 7–1 Una neurona de mamífero y un linfocito. Las largas ramificaciones de esta neurona desde la retina, le permiten recibir señales eléctricas desde muchas células y trasladar estas señales a muchas células vecinas. El linfocito es una célula sanguínea implicada en la respuesta inmune frente a las infecciones y se desplaza libremente por el cuerpo. Ambos tipos de células contienen el mismo genoma, pero expresan distintos RNA y proteínas. (De B.B. Boycott, Essays on the Nervous System [R. Bellairs y E G. Gray, eds.]. Oxford, UK, Clarendon Press, 1974.)

algunos de estos oocitos (denominados cigotos reconstruidos) llegan a dar lugar a animales viables (Figura 7–2C).

Otra prueba de que durante el desarrollo de los vertebrados ni se pierden ni se reorganizan grandes bloques de DNA procede de la comparación de los patrones de bandas que se detectan en los cromosomas mitóticos condensados de distintos tipos celulares (véase Figura 4–11). Según este criterio, parece que los conjuntos de cromosomas de las células diferenciadas del cuerpo humano son idénticos. Además, comparaciones de los genomas de diferentes células basadas en técnicas de DNA recombinante demuestran, por lo general, que los cambios de expresión génica que subyacen al desarrollo de los organismos pluricelulares no dependen de cambios en las secuencias de DNA de los genes correspondientes. Sin embargo en algunos casos durante el desarrollo de un organismo se produce una reordenación del DNA en el genoma, especialmente generando la diversidad del sistema inmunitario de los mamíferos, que trataremos en el Capítulo 25.

Distintos tipos celulares sintetizan distintos conjuntos de proteínas

Un primer paso para tratar de entender la diferenciación celular podría consistir en averiguar cuántas diferencias existen entre dos tipos celulares dados. Aunque la respuesta a esta cuestión fundamental todavía se nos escapa, podemos hacer algunas afirmaciones generales:

1. Muchos procesos son comunes a todas las células. Por lo tanto, dos células cualesquiera de un organismo presentarán muchas proteínas en común. Entre ellas se encuentran las proteínas estructurales de los cromosomas, RNA polimerasas, enzimas de reparación del DNA, proteínas ribosómicas, enzimas implicadas en las reacciones centrales del metabolismo y muchas de las proteínas que forman el citoesqueleto.
2. Algunas proteínas son abundantes en las células especializadas en las que actúan pero no se pueden detectar en ningún otro tipo celular, aunque se utilicen métodos muy sensibles. Por ejemplo, la hemoglobina sólo se puede encontrar en los eritrocitos.
3. Estudios acerca de la cantidad de mRNA distintos indican que, en un momento dado, una célula humana típica expresa un 30-60% de sus aproximadamente 25.000 genes. Al comparar los patrones de mRNA en distintas líneas celulares humanas se observa que el nivel de expresión de casi cualquier gen activo varía de un tipo celular a otro. Algunas de estas diferencias son muy patentes, como el caso de la hemoglobina mencionado, pero la mayoría son mucho más sutiles. Incluso genes que se expresan en todos los tipos celulares varían en su nivel de expresión de un tipo celular a otro. Los patrones de abundancia de mRNA (determinados mediante microchips de DNA, descrito en el Capítulo 8) son tan característicos de un tipo celular determinado que pueden utilizarse para caracterizar células de cáncer humano cuyo origen tisular es incierto (**Figura 7–3**).
4. A pesar de que las diferencias de mRNA entre tipos celulares especializados son patentes, suponen una subestimación del total de diferencias en el patrón de producción de proteínas. Como veremos en este capítulo, existen muchos pasos tras la transcripción en los que la expresión génica puede regularse. Por ejemplo, la maduración alternativa puede generar una familia entera de proteínas a partir de un único gen. Por último, las proteínas pueden sufrir modificaciones covalentes una vez han sido sintetizadas. Así, la mejor forma de apreciar las diferencias radicales de expresión génica entre tipos celulares es mediante la utilización de métodos que permitan visualizar directamente los niveles de las proteínas y sus modificaciones postraduccionales (**Figura 7–4**).

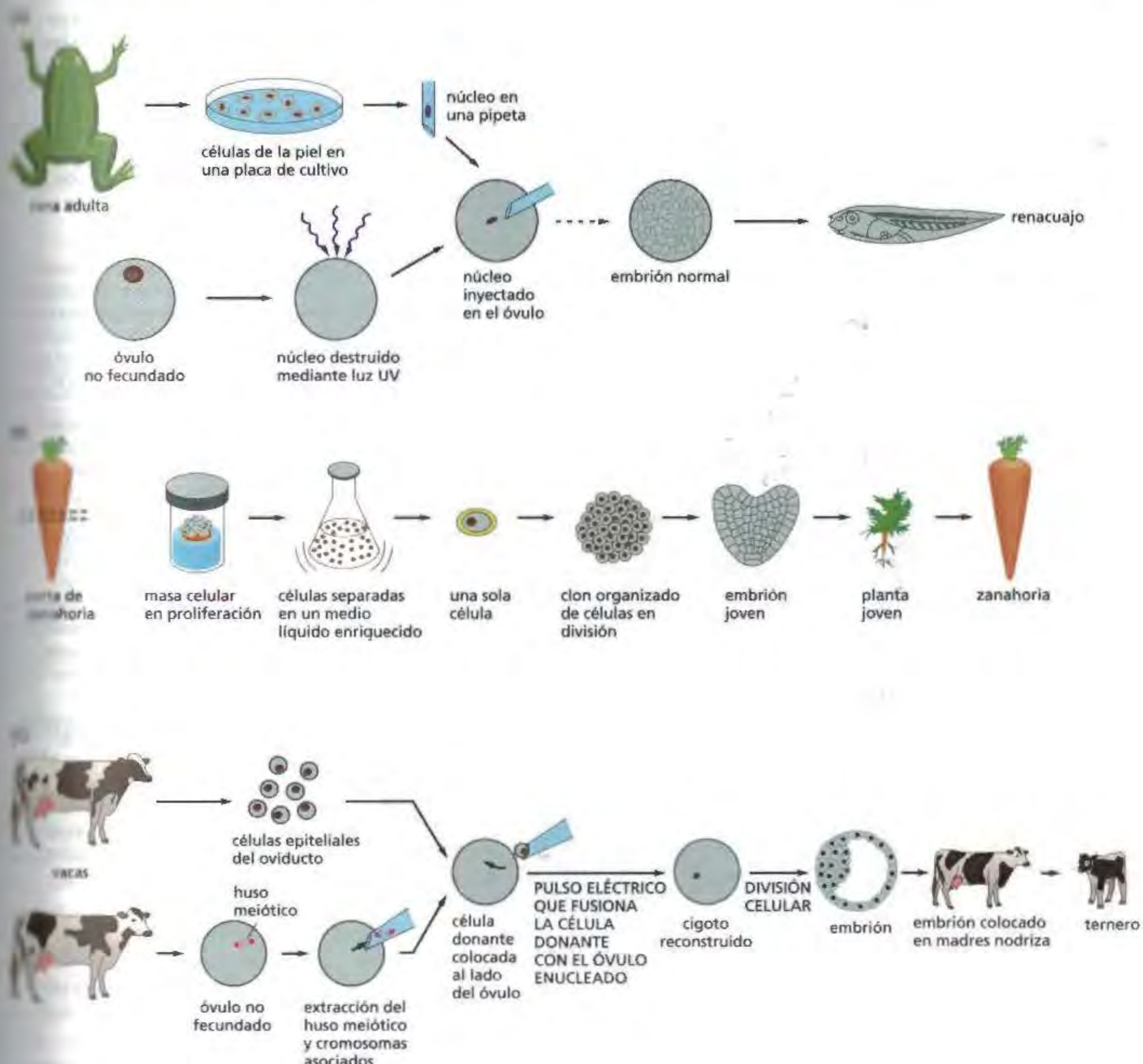


Figura 7–2 Evidencias de que la célula diferenciada contiene todas las instrucciones genéticas necesarias para dirigir la formación de un organismo completo. (A) El núcleo de una célula de la piel de una rana adulta, trasplantado a un óvulo enucleado, puede dar lugar a un renacuajo completo. La *flecha discontinua* indica que, para que el genoma trasplantado tenga tiempo de ajustarse a un desarrollo embrionario, se requiere un paso adicional de transferencia que consiste en tomar uno de los núcleos del embrión en una fase temprana de su desarrollo y colocarlo en un segundo óvulo enucleado. (B) En muchos tipos de plantas, las células diferenciadas conservan la capacidad de "desdiferenciación" de modo que una sola célula puede generar un clon de células progenitoras, que podrán dar lugar a una planta completa. (C) Un núcleo diferenciado de una célula de vaca adulta introducida en un óvulo enucleado de una vaca distinta, puede dar lugar a un ternero. Distintos terneros generados a partir de la misma célula diferenciada donante serán genéticamente idénticos y, por lo tanto, serán clones entre ellos. (A, modificado a partir de J.B. Gurdon, *Sci. Am.* 219:24-35, 1968. Con la autorización de Scientific American.)

Determinadas señales externas pueden provocar que una célula cambie la expresión de sus genes

La mayor parte de las células especializadas de un organismo pluricelular son capaces de alterar su patrón de expresión génica como respuesta a señales extracelulares. Por ejemplo, si se expone una célula de hígado a una hormona glucocorticoide, se incrementa notablemente el nivel de producción de algunas proteínas determinadas. Los glucocorticoides se li-

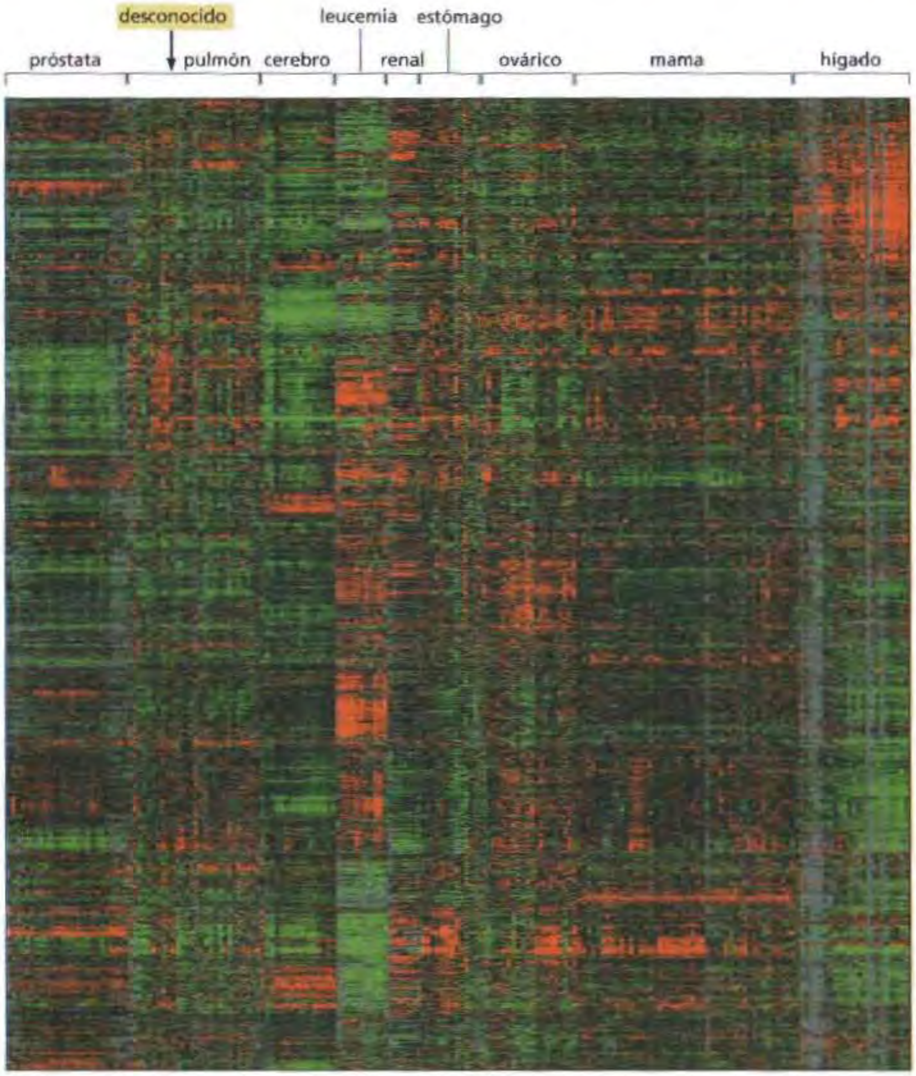


Figura 7–3 Diferencias en el patrón de expresión de mRNA entre distintos tipos de células cancerosas humanas. Esta figura resume un conjunto muy amplio de análisis en los que se determinaron los niveles de mRNA de 1800 genes seleccionados (alineados de *arriba a abajo*) para 142 líneas celulares tumorales humanas distintas (alineadas de *izquierda a derecha*), de pacientes distintos. Cada una de las pequeñas barras *rojas* indica que un determinado gen de un tumor se transcribe a un nivel más elevado que el valor promedio de todas las líneas celulares. Cada una de las pequeñas barras *verdes* indica una expresión por debajo del promedio, y cada barra *negra* indica un nivel de expresión cercano al promedio de los distintos tumores.
El procedimiento utilizado para generar estos datos –aislamiento de mRNA seguido de hibridación a microchips de DNA– se describe en el Capítulo 8 (pp. 574-575).
La figura muestra que los niveles relativos de expresión de cada uno de los 1800 genes analizados varía entre los distintos tumores (lo cual se puede ver siguiendo un gen determinado, de *izquierda a derecha* a lo largo de la figura). Este análisis muestra también que cada tipo de tumor tiene un patrón de expresión génica característico. Esta información puede ser utilizada para "tipificar" las células cancerosas de un tejido desconocido comparando su perfil de expresión génica con el de tumores conocidos. Por ejemplo, la muestra desconocida que aparece en la figura se ha identificado como un cáncer de pulmón. (Cortesía de Patrick O. Brown, David Botstein, y Stanford Expression Collaboration.)

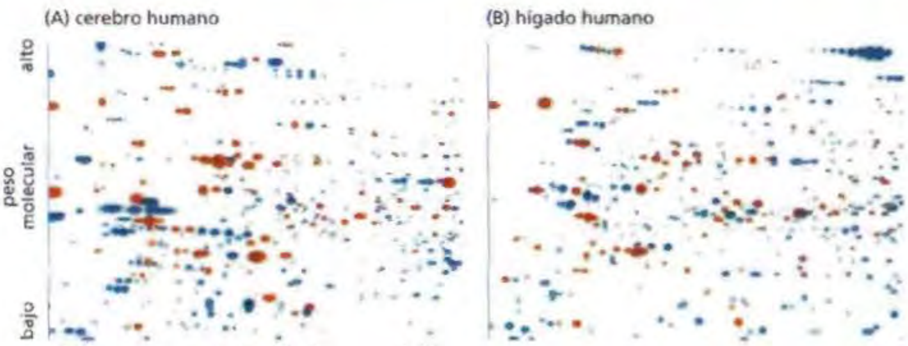


Figura 7–4 Diferencias en las proteínas que se expresan en dos tejidos humanos. En cada pane,l las proteínas se visualizan utilizando electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (véase pp. 521-522). Las proteínas se han separado según su peso molecular (de *arriba abajo*) y su punto isoeléctrico, el pH al cual la proteína deja de tener carga neta (de *derecha* a *izquierda*). Las manchas de proteína teñida de forma artificial en *rojo* son comunes a ambas muestras; en *azul* aparecen las que son específicas para uno de los dos tejidos. Las diferencias entre las muestras de los dos tejidos sobrepasan ampliamente las similitudes: incluso para las proteínas que son compartidas por los tejidos, su abundancia relativa suele ser distinta. Cabe destacar que esta técnica separa las proteínas por su tamaño y por su carga; en consecuencia una proteína que tenga varios estados distintos de fosforilación aparecerá como una serie de *manchas horizontales* (véase la parte *superior derecha* del panel de la *derecha*). Sólo se muestra una pequeña parte de todo el espectro de proteínas de cada muestra. Pese a que la electroforesis bidimensional en gel proporciona un modo sencillo de visualizar las diferencias entre dos muestras de proteína, los métodos basados en espectrometría de masas (véase pp. 519-521) proporcionan una información mucho más detallada y, por lo tanto, se utilizan más a menudo. (Cortesía de Tim Myers y Leigh Anderson, Large Scale Biology Corporation.)

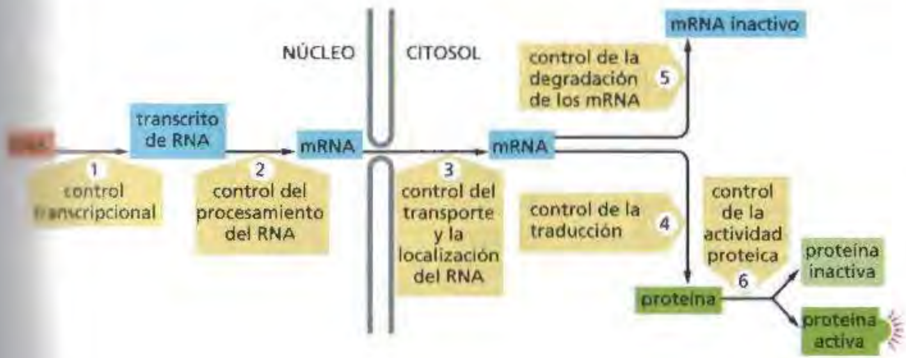


Figura 7–5 Seis etapas en las que se puede controlar la expresión génica en los eucariotas. En este capítulo sólo comentaremos los controles que actúan en las etapas de la 1 a la 5. La etapa 6 (la regulación de la actividad proteica) se da en gran parte a través de modificaciones de tipo postraduccional que incluyen fosforilación, acetilación y ubiquitinación (véase Tabla 3–3, p. 186) y se trata en varios capítulos de este libro.

liberan durante periodos de ayuno o de ejercicio intenso e indican al hígado la necesidad de producir más glucosa a partir de aminoácidos u otras pequeñas moléculas; el conjunto de las proteínas cuya producción se induce incluye enzimas como la tirosina aminotransferasa, que contribuye a transformar tirosina en glucosa. La producción de estas proteínas recupera sus niveles normales cuando la hormona desaparece.

Otros tipos celulares responden a los glucocorticoides de manera diferente. Por ejemplo, los adipocitos reducen la producción de tirosina aminotransferasa, mientras que otros tipos celulares no responden a los glucocorticoides de ninguna forma. Estos ejemplos ilustran una característica general de la especialización celular: frecuentemente diferentes tipos celulares responden en forma diferente a una misma señal extracelular. En la base de estas adaptaciones en respuesta a señales extracelulares, existen una serie de rasgos que no cambian y que confieren a cada tipo celular sus propiedades características permanentes.

La expresión génica se puede regular en muchas de las etapas de la vía que conduce desde el DNA al RNA y a las proteínas

Si las diferencias que existen entre los distintos tipos de células dependen de los genes concretos que expresan estas células, ¿a qué nivel se ejerce el control de la expresión génica? Como se expuso en el capítulo anterior, la vía que conduce desde el DNA hasta las proteínas está formada por muchas etapas. Ahora sabemos que, en principio, todas ellas se pueden regular. Así, las células pueden controlar la síntesis de proteínas (1) regulando cuándo y con qué frecuencia se transcribe un gen concreto (**control transcripcional**), (2) controlando la maduración o el procesamiento de los transcritos primarios de RNA (**control del procesamiento del RNA**), (3) seleccionando los mRNA maduros que van a ser exportados del núcleo al citosol y dónde van a localizarse en el citosol (**control del transporte y localización del RNA**), (4) seleccionando los mRNA citoplasmáticos que van a ser traducidos por ribosomas (**control traduccional**), (5) desestabilizando selectivamente algunas moléculas de mRNA citoplasmático (**control de la degradación de los mRNA**), o (6) activando, inactivando, degradando o ubicando de modo selectivo las proteínas ya sintetizadas (**control de la actividad proteica**) (**Figura 7–5**).

Para la mayoría de genes, los controles transcripcionales son los más importantes. Esto tiene sentido ya que de todos los posibles puntos de control ilustrados en la Figura 7–5, solamente el control transcripcional asegura que no se sinteticen intermediarios superfluos. A continuación describiremos los componentes de DNA y de proteínas que regulan la iniciación de la transcripción génica, y al final del capítulo se analizarán muchos otros mecanismos que permiten regular la expresión de los genes.

Resumen

El genoma de una célula contiene, en la secuencia de su DNA, la información necesaria para producir miles de proteínas y moléculas de RNA diferentes. Una célula expresa típicamente sólo algunos de sus genes y los diferentes tipos celulares de los organismos pluricelulares se forman porque expresan diferentes conjuntos de genes. Además, las células pueden cambiar el patrón de expresión de sus genes en respuesta a cambios en su ambiente, tales como señales que procedan de otras células. Aunque, en principio, todas las etapas implicadas en la expresión de un gen están reguladas, el punto de control más importante en la mayoría de los genes es la iniciación de la transcripción a RNA.

MOTIVOS ESTRUCTURALES DE UNIÓN A DNA EN LAS PROTEÍNAS DE REGULACIÓN GÉNICA

¿De qué forma una célula puede determinar cuáles de sus miles de genes se han de transcribir? Como se ha apuntado en el Capítulo 6, la transcripción de cada gen está controlada por una región de DNA próxima al lugar donde se inicia la transcripción. Algunas regiones reguladoras son sencillas y actúan como interruptores activados por una sola señal. Otras regiones reguladoras son complejas y parecen minúsculos microprocesadores, respondiendo a varias señales, que interpretan e integran decidiendo si activan o no el gen vecino. Sean sencillos o complejos, estos dispositivos interruptores se encuentran en todas las células y están formados por dos tipos de componentes fundamentales: (1) cortas secuencias de DNA definidas y (2) *proteínas de regulación génica* que reconocen y se unen a este DNA.

Iniciaremos el estudio de las proteínas de regulación génica describiendo cómo fueron descubiertas.

Las proteínas de regulación génica se descubrieron mediante técnicas de genética bacteriana

Los análisis genéticos realizados en bacterias durante la década de 1950 aportaron las primeras evidencias de la existencia de **proteínas de regulación génica** (a menudo llamadas de forma general "factores de transcripción") capaces de activar o desactivar conjuntos determinados de genes. Uno de estos reguladores, el *represor lambda*, está codificado por un virus bacteriano, el *bacteriófago lambda*. El represor inactiva los genes del virus que codifican los componentes proteicos de las nuevas partículas víricas capacitando así al genoma vírico a permanecer en el cromosoma bacteriano como un pasajero silencioso, multiplicándose con la bacteria cuando las condiciones son favorables al crecimiento bacteriano (véase Figura 5–78). El represor lambda fue una de las primeras proteínas de regulación génica que se caracterizaron y continúa siendo una de las mejor conocidas como veremos más adelante. Otros reguladores bacterianos responden a condiciones nutricionales inactivando conjuntos de genes que codifican grupos de enzimas del metabolismo que ya no se necesitan. El *represor Lac*, la primera de estas proteínas bacterianas que se descubrió, inactiva la producción de proteínas implicadas en el metabolismo de la lactosa cuando ésta no se encuentra en el medio.

La primera etapa hacia la comprensión de la regulación de los genes fue el aislamiento de cepas de bacteria y de bacteriófago lambda mutantes incapaces de inactivar determinados grupos de genes. En aquel tiempo se propuso, y posteriormente se demostró, que la mayoría de esos mutantes eran deficitarios en proteínas que actuaban como represores específicos de esos grupos de genes. Debido a que estas proteínas, como la mayoría de las proteínas reguladoras, se encuentran en pequeñas cantidades, su aislamiento fue muy difícil y largo. Se purificaron mediante fraccionamiento de extractos celulares. Una vez aisladas, se observó que las proteínas se unían a secuencias de DNA próximas a los genes que regulaban. Las secuencias de DNA que reconocían fueron determinadas mediante una combinación de genética clásica y métodos para estudiar las interacciones proteína-DNA descritos más adelante en este capítulo.

El exterior de la hélice de DNA puede ser leído por proteínas

Como se ha descrito en el Capítulo 4, el DNA de un cromosoma está formado por una doble hélice muy larga (**Figura 7–6**). Las proteínas reguladoras han de reconocer secuencias específicas del interior de esta estructura. En un principio se pensó que para ser capaces de distinguir una secuencia de DNA de la otra, estas proteínas deberían acceder a los enlaces de hidrógeno situados entre las parejas de bases en el interior de la doble hélice. Sin embargo, actualmente se sabe que las proteínas reguladoras pueden reconocer la información acerca de

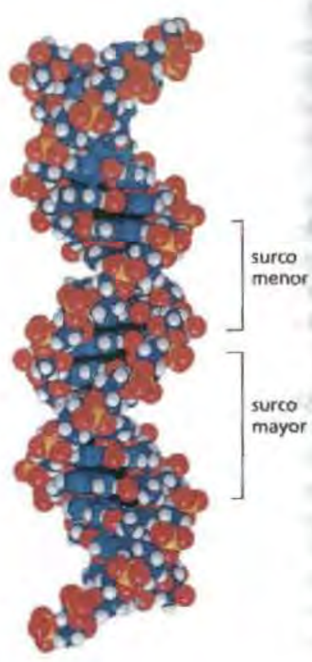


Figura 7–6 Estructura de la doble hélice del DNA. Un modelo en volumen del DNA que muestra los surcos mayor y menor en el exterior de la doble hélice. Los átomos se han coloreado como sigue: carbono, *azul oscuro*; nitrógeno, *azul claro*; hidrógeno, *blanco*; oxígeno, *rojo*; fósforo, *amarillo*.

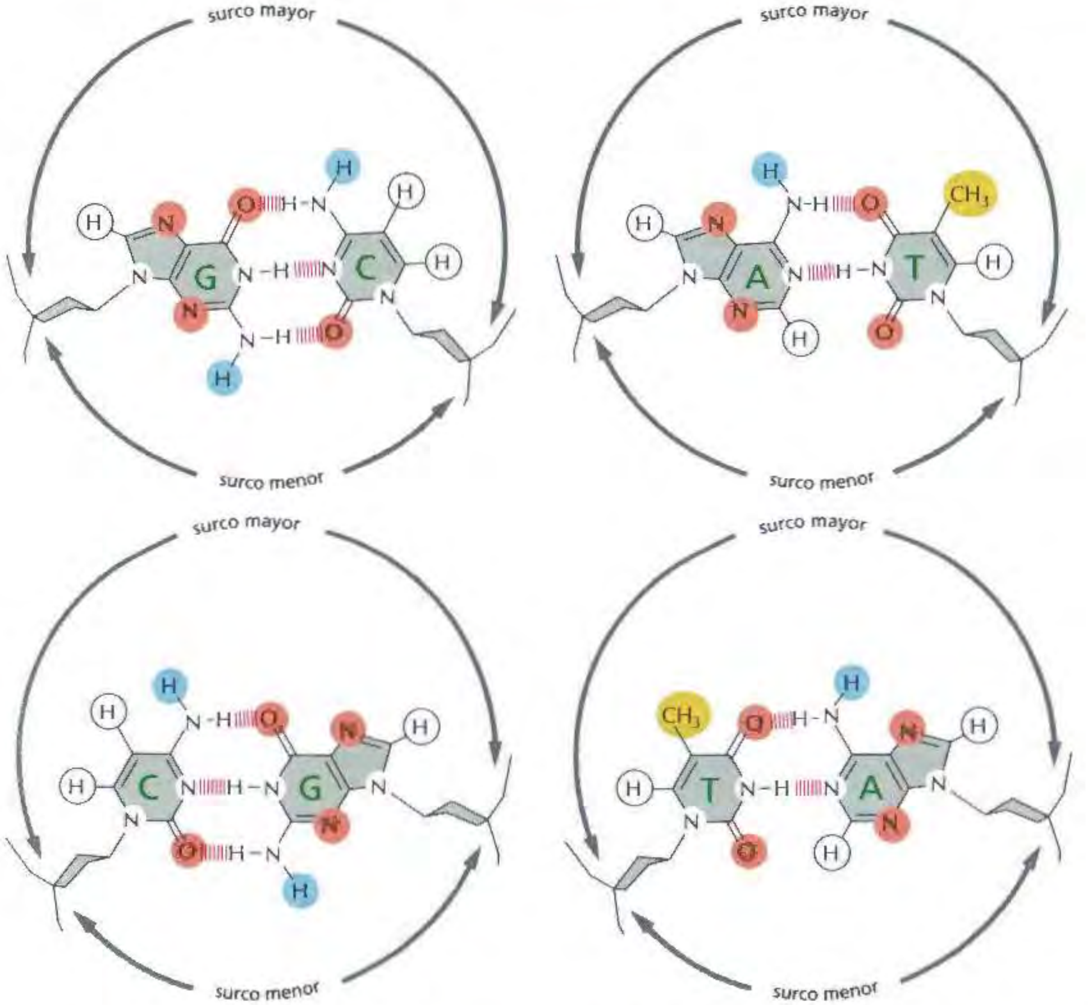


Figura 7–7 Cómo es posible reconocer los apareamientos de las bases a partir de sus extremos sin necesidad de abrir la doble hélice. Se muestran las cuatro configuraciones posibles de pares de bases, con los dadores de enlaces de hidrógeno indicados en *azul*, los aceptores de enlaces de hidrógeno en *rojo* y los propios enlaces de hidrógeno como series de líneas *rojas* cortas y paralelas. Los grupos metilo que forman protuberancias hidrofóbicas se han indicado en *amarillo* y los átomos de hidrógeno que están unidos a carbono (y por tanto son inaccesibles a los enlaces de hidrógeno) se señalan en *blanco*. (De C. Branden y J. Tooze, Introduction to Protein Structure, 2.ª ed. New York: Garland Publishing, 1999.)

la secuencia de DNA desde el exterior de la doble hélice, sin necesidad de abrirla. El borde de cada pareja de bases está expuesto en la superficie de la doble hélice, presentando un patrón característico de aceptores y dadores de enlaces de hidrógeno y parches hidrofóbicos reconocibles por proteínas, tanto en el surco mayor como en el menor (**Figura 7–7**). Sin embargo, sólo en el surco mayor los patrones son marcadamente diferentes para cada uno de los cuatro apareamientos de bases (**Figura 7–8**). Como veremos, esta es la razón de que por lo general las proteínas de regulación génica establezcan contactos específicos con el surco mayor.

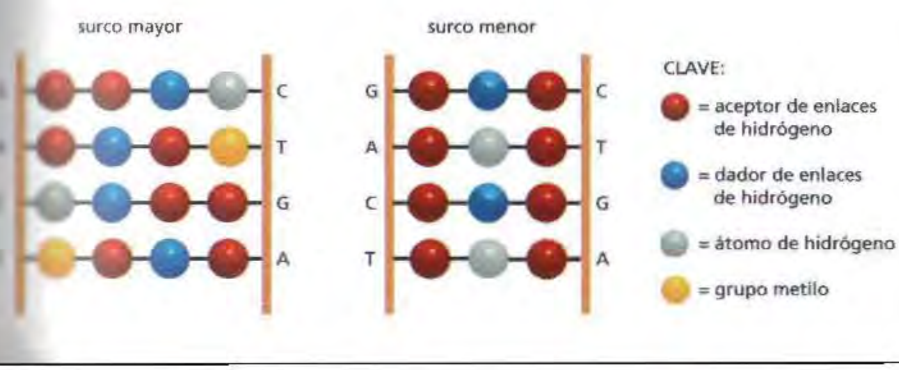


Figura 7–8 Un código de reconocimiento del DNA. El borde de cada base, visto directamente desde el surco mayor o desde el surco menor, contiene un patrón distintivo de aceptores y dadores de enlaces de hidrógeno y de grupos metilo. Cada uno de los cuatro posibles apareamientos de bases proyecta un patrón de rasgos característico. Sin embargo, desde el surco menor se confunden los patrones para G-C y C-G y para A-T y T-A. El código de colores es el mismo que se ha utilizado en la Figura 7–7. (De C. Branden y J. Tooze, Introduction to Protein Structure, 2.ª ed. New York: Garland Publishing, 1999.)

Secuencias cortas de DNA son componentes fundamentales de los interruptores genéticos

Una secuencia nucleotídica específica se puede "leer" como un patrón molecular de rasgos en la superficie de la doble hélice del DNA. Algunas secuencias nucleotídicas particulares, cada una de las cuales tiene una longitud de menos de 20 pares de bases, actúan como componentes fundamentales de los interruptores genéticos, al actuar como lugares específicos de reconocimiento para la unión de determinadas proteínas de regulación génica. Se han identificado miles de estas secuencias de DNA, cada una de las cuales es reconocida por una proteína reguladora (o por una serie de proteínas muy relacionadas entre sí). Algunas de las proteínas reguladoras de la expresión génica que se explican en este capítulo se listan en la **Tabla 7–1** junto con las secuencias que reconocen.

Ahora volvamos a las proteínas de regulación génica, el segundo componente fundamental de los interruptores genéticos. Empecemos por las características fundamentales que permiten a estas proteínas reconocer secuencias cortas de DNA contenidas en una doble hélice mucho mayor.

Las proteínas de regulación génica contienen motivos estructurales que pueden leer secuencias de DNA

En biología, el reconocimiento molecular generalmente se basa en el ajuste exacto entre las superficies de dos moléculas; el estudio de las proteínas de regulación génica ha suministrado algunos de los ejemplos más evidentes de este principio. Una proteína de regulación génica reconoce una secuencia de DNA específica porque la superficie de la proteína es

Tabla 7–1 Algunas proteínas de regulación génica y las secuencias de DNA que reconocen

	NOMBRE	SECUENCIA DE DNA RECONOCIDA*
Bacterias	represor Lac	5' AATTGTGAGCGGATAACAATT 3' TTAACACTCGCCTATTGTTAA
	CAP	TGTGAGTTAGCTCACT ACACTCAATCGAGTGA
	represor lambda	TATCACCGCCAGAGGT ATAGTGGCGGTCTCCAT
Levaduras	Gal4	CGGAGGACTGTCCTCCG GCCTCCTGACAGGAGGC
	Matα2	CATGTAATT GTACATTAA
	Gcn4	ATGACTCAT TACTGAGTA
Drosophila	Kruppel	AACGGGTTAA TTGCCCAATT
	Bicoid	GGGATTAGA CCCTAATCT
Mamíferos	Sp1	GGGCGG CCCGCC
	dominio Oct1 Pou	ATGCAAAT TACGTTTA
	GATA1	TGATAG ACTATC
	MyoD	CAAATG GTTTAC
	p53	GGGCAAGTCT CCCGTTCAGA

*Para mayor facilidad, para cada proteína se da una única secuencia de reconocimiento en lugar de una secuencia consenso (véase Figura 6-12).

complementaria a la superficie de la molécula de DNA, con sus rasgos estructurales característicos en esa región. En la mayoría de los casos, la proteína establece una serie de contactos con el DNA, incluyendo enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos e interacciones hidrofóbicas. Aunque cada uno de los contactos es débil, los 20 contactos o más que se establecen en la interfase DNA-proteína actúan conjuntamente asegurando una interacción que es altamente específica y muy fuerte (**Figura 7–9**). De hecho, las interacciones DNA-proteínas se encuentran entre las interacciones moleculares más fuertes y específicas de las conocidas en biología.

Aunque cada uno de los ejemplos de reconocimiento proteína-DNA es único en sus detalles, los estudios de cristalografía de rayos X y de espectroscopia NMR de unos 30 complejos de proteínas reguladoras con sus secuencias específicas, han mostrado que la mayor parte de dichas proteínas contienen uno de entre una pequeña serie de motivos estructurales de unión a DNA. Cada uno de estos motivos utiliza tanto hélices α como láminas β para unirse al surco mayor del DNA; este surco, como ya hemos visto, contiene información suficiente para permitir distinguir una secuencia de DNA de cualquier otra. El ajuste es tan bueno que es tentador especular que las dimensiones de las unidades estructurales básicas de los ácidos nucleicos y de las proteínas evolucionaron juntas permitiendo que estas moléculas se pudieran ajustar mejor.

El motivo hélice-giro-hélice es uno de los motivos de unión a DNA más sencillos y habituales

El primer motivo estructural de unión a DNA que se descubrió fue el **hélice-giro-hélice**. Identificado originalmente en proteínas bacterianas, se ha encontrado en muchos centenares de proteínas de unión a DNA tanto de eucariotas como de procariotas. Consta de dos hélices α conectadas por una corta cadena de aminoácidos que forma el "giro" (**Figura 7–10**). Las dos hélices se mantienen en un cierto ángulo fundamentalmente por interacciones entre ambas. La hélice más próxima al extremo carboxilo se denomina la *hélice de reconocimiento* ya que se adapta al surco mayor del DNA; las cadenas laterales de sus aminoácidos, que difieren de una proteína a otra, desempeñan un papel muy importante en el reconocimiento de las secuencias de DNA específicas a las que se une la proteína.

Aparte de la región de hélice-giro-hélice, la estructura de las proteínas que contienen este motivo varía enormemente (**Figura 7–11**). Así pues, cada proteína presenta su motivo hélice-giro-hélice al DNA de una forma única, un rasgo que parece que aumenta la versatilidad del motivo hélice-giro-hélice al aumentar el número de secuencias de DNA con el motivo que se pueden reconocer. Además, en la mayoría de estas proteínas partes de la cadena polipeptídica que están fuera del dominio hélice-giro-hélice también establecen contactos importantes con el DNA y facilitan una interacción ajustada muy finamente.

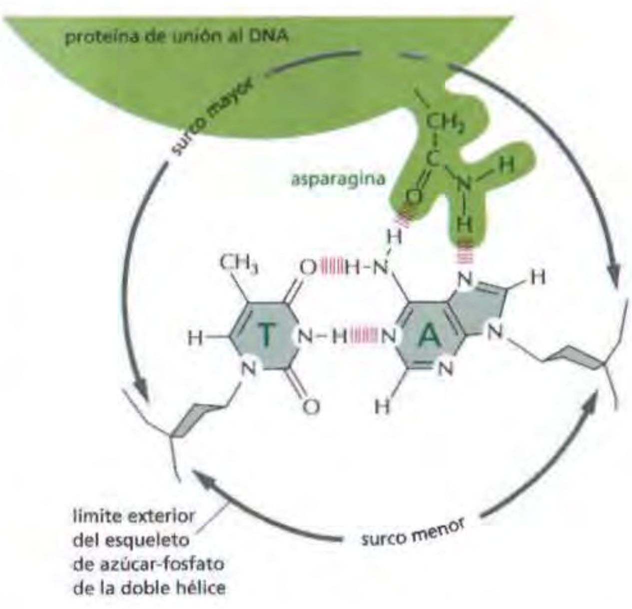


Figura 7–9 Unión de una proteína de regulación génica al surco mayor del DNA. Sólo se muestra un tipo de contacto sencillo. Normalmente la superficie de interacción entre la proteína y el DNA tiene que presentar 10-20 de estos contactos, implicando diferentes aminoácidos, de forma que cada uno de ellos contribuye a aumentar la fuerza de la interacción proteína-DNA.

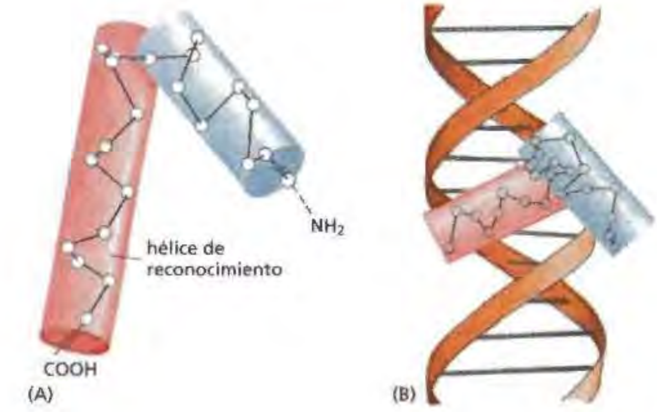


Figura 7–10 El motivo estructural de unión a DNA, hélice-giro-hélice. El motivo se muestra en (A), donde cada círculo *blanco* representa el carbono central de un aminoácido. La hélice α carboxilo terminal (*rojo*) se denomina hélice de reconocimiento, ya que participa en el reconocimiento de las secuencias específicas en el DNA. Como se muestra en (B), esta hélice se ajusta al surco mayor del DNA donde entra en contacto con las bases apareadas (véase también la Figura 7–7). La hélice α N-terminal (*azul*) actúa en principio como un componente estructural que contribuye a la colocación de la hélice de reconocimiento.

El grupo de proteínas hélice-giro-hélice que aparece en la Figura 7–11 demuestra un rasgo común a muchas proteínas de unión a secuencias específicas de DNA. Se unen como dímeros simétricos a secuencias de DNA que están formadas por dos "medios-sitios" muy similares, también organizados de forma simétrica (**Figura 7–12**). Esta disposición permite que cada monómero proteico establezca un conjunto casi idéntico de contactos e incrementa enormemente la afinidad de unión: como primera aproximación, al duplicar el número de contactos se duplica la energía libre de la interacción pero se eleva al *cuadrado* la constante de afinidad.

Las proteínas de homeodominios son una clase especial de proteínas hélice-giro-hélice

Poco después de que se descubrieran las primeras proteínas de regulación génica en bacterias, análisis genéticos en la mosca del vinagre *Drosophila* permitieron descubrir una clase importante de genes, los *genes selectores homeóticos*, que desempeñan un papel crítico organizando el desarrollo de la mosca. Como se describe en el Capítulo 22, se ha demostrado que estos genes también participan de forma destacada en el control del desarrollo de animales superiores. Mutaciones en estos genes pueden hacer que una parte del cuerpo de una mosca se convierta en otra parte, lo cual demuestra que las proteínas que codifican controlan decisiones clave del desarrollo.

Cuando se determinaron las secuencias de algunos de los genes selectores homeóticos, a principios de la década de 1980 se demostró que cada uno de ellos codifica una secuencia

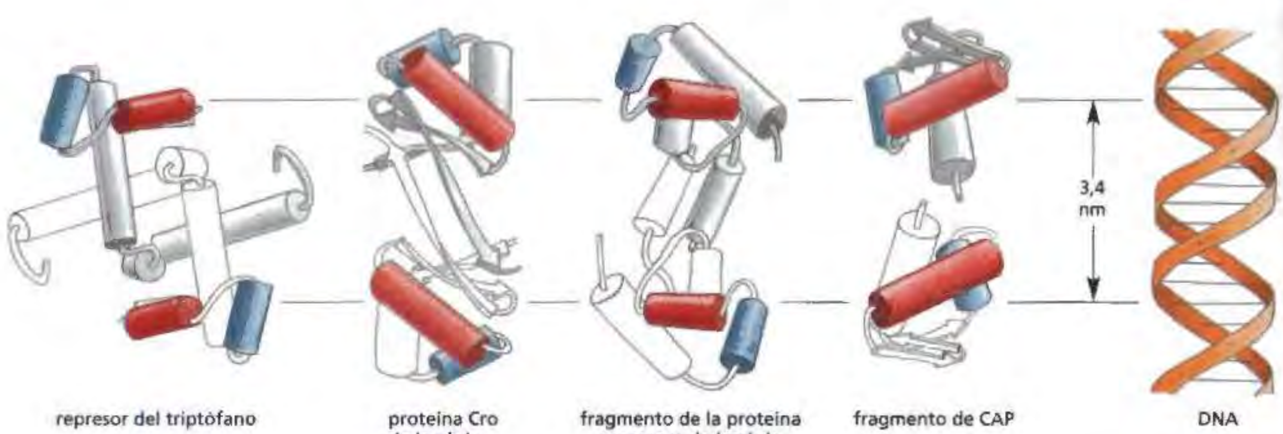


Figura 7–11 Algunas proteínas de unión al DNA hélice-giro-hélice. Todas las proteínas se unen al DNA como dímeros en los que las dos copias de la hélice de reconocimiento (*cilindro rojo*) están separadas exactamente por una vuelta de la doble hélice (3,4 nm). La otra hélice del motivo hélice-giro-hélice se ha coloreado en *azul*, como en la Figura 7–10. El represor lambda y la proteína Cro controlan la expresión de genes del bacteriófago lambda; el represor de triptófano y la proteína activadora de catabolito (CAP) controlan grupos de genes de *E. coli*.



Figura 7–12 Una secuencia específica de DNA reconocida por la proteína Cro del bacteriófago lambda. Los nucleótidos coloreados en *verde* se encuentran dispuestos simétricamente, permitiendo que cada mitad de la secuencia específica de DNA sea reconocida de la misma manera por cada monómero de la proteína, también mostrada en *verde*. Para la estructura real de la proteína véase la Figura 7–11.

...tica de unos 60 aminoácidos que define este tipo de proteína y a la que se denominó **homeodominio**. Al resolverse la estructura tridimensional del homeodominio se descubrió que contiene un motivo hélice-giro-hélice similar al de las proteínas reguladoras bacterianas, aportando una de las primeras indicaciones de que los principios de la regulación génica establecidos en bacterias también son válidos para los organismos superiores. ... en *Drosophila*, se han descrito más de 60 proteínas homeodominio y se han identificado proteínas con homeodominio en casi todos los organismos que se han estudiado, desde ... hasta el hombre.

En la **Figura 7–13** se muestra la estructura del homeodominio unido a su secuencia de DNA específica. Frecuentemente el motivo hélice-giro-hélice de las proteínas reguladoras bacterianas está inmerso en diferentes regiones estructurales, mientras que el motivo hélice-giro-hélice de los homeodominios siempre está rodeado por la misma estructura (que forma el resto del homeodominio), lo cual sugiere que el motivo es presentado al DNA siempre de la misma forma básica. Además, estudios estructurales muestran que proteínas de levaduras y de *Drosophila* con homeodominio reconocen el DNA casi de la misma forma, a pesar de que existe una identidad entre ellos de sólo 17 de los 60 aminoácidos (véase Figura 7-13).

Existen algunos tipos de motivos de unión a DNA en forma de dedos de zinc

El motivo hélice-giro-hélice está formado exclusivamente por aminoácidos. Un segundo grupo importante de motivos de unión a DNA incluye una o más moléculas de zinc como elemento estructural. Aunque todos los motivos que utilizan zinc se han denominado **dedos de zinc**, esta descripción se refiere sólo a su aspecto en diagramas esquemáticos que datan de su descubrimiento inicial (**Figura 7–14**A). Estudios estructurales posteriores han permitido demostrar que realmente se trata de diferentes grupos, de entre los que sólo describiremos dos. El primer tipo fue descubierto en la proteína que activa la transcripción del gen del RNA ribosómico eucariota. Incluye una estructura sencilla, en la que el zinc mantiene unidas una hélice α y una lámina β (Figura 7–14B). Este tipo de dedo de zinc se encuentra con frecuencia agrupado con otros dedos de zinc en tándem de modo que la hélice α pueda contactar con el surco mayor del DNA y formar una serie casi continua de hélice α a lo largo del surco. De esta forma se obtiene una interacción DNA-proteína fuerte y específica a través de la repetición de una unidad estructural básica (**Figura 7–15**).

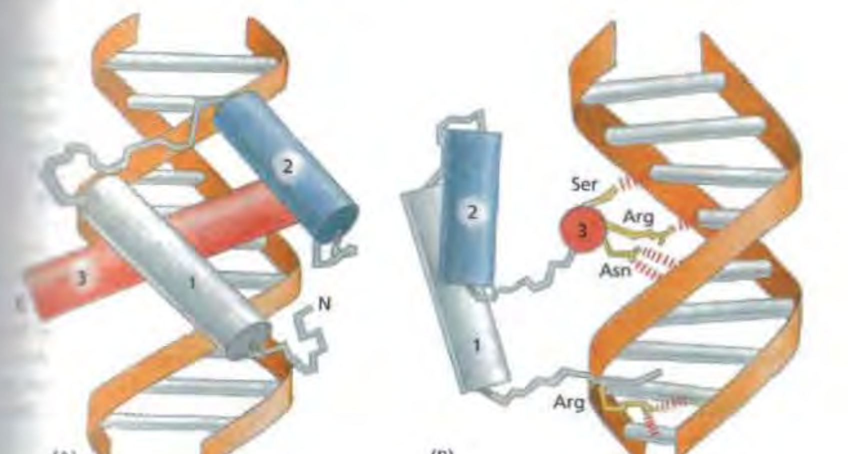


Figura 7–13 Un homeodominio unido a su secuencia específica del DNA. Se muestran dos perspectivas distintas de la misma estructura. (A) El homeodominio se pliega en tres hélices α que se empaquetan estrechamente por interacciones hidrofóbicas. La región que contiene las hélices 2 y 3 se parece mucho al motivo estructural hélice-giro-hélice, de forma que la hélice de reconocimiento (*rojo*) establece contactos importantes con el surco mayor (B). Por ejemplo, la asparagina de la hélice 3 entra en contacto con una adenina, como se muestra en la Figura 7–9. Un brazo flexible unido a la hélice 1 también establece contactos con pares de bases en el surco menor. El homeodominio mostrado procede de una proteína reguladora de levadura, pero es casi idéntico a dos homeodominios de *Drosophila* que interaccionan con el DNA de forma similar. <ACGT> (Adaptado de C. Wolberger et al., *Cell* 67: 517-528, 1991. Con la autorización de Elsevier.)

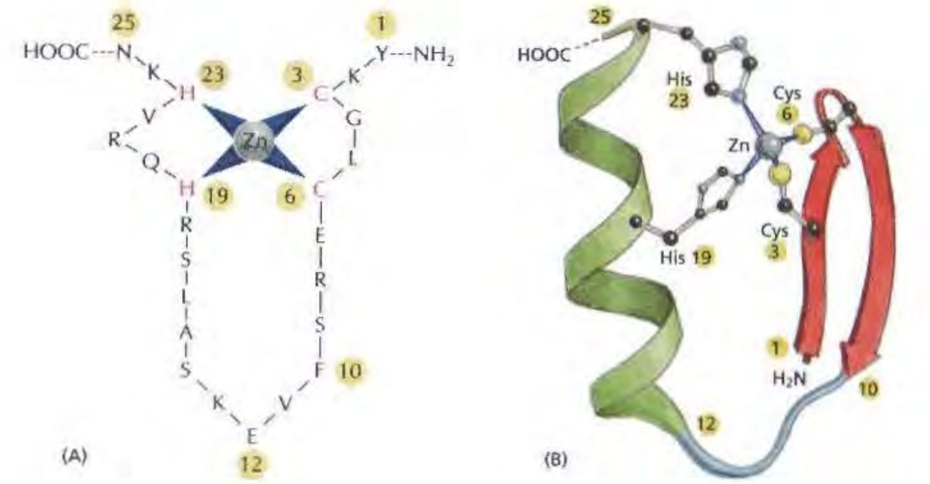


Figura 7–14 Un tipo de proteína con dedo de zinc. Esta proteína pertenece a las proteínas con dedos de zinc Cys-Cys-His-His, se denominan así por los aminoácidos que unen el zinc. Este dedo de zinc procede de una proteína de rana, de función desconocida. (A) Esquema de la secuencia de aminoácidos del dedo de zinc. (B) La estructura tridimensional de este mismo dedo de zinc está formada por una lámina β antiparalela (aminoácidos 1 al 10), seguida de una hélice α (aminoácidos 12 al 24). Los cuatro aminoácidos que unen el zinc (Cys 3, Cys 6, His 19 y His 23) mantienen fuertemente unido un extremo de la hélice α al otro extremo de la lámina β. (Adaptado de M.S. Lee et al., *Science* 245: 635-637, 1989. Con la autorización de AAAS.)

Otro tipo de dedos de zinc se encuentra en la gran familia de proteínas receptoras intracelulares (descritas en el Capítulo 15). Forma una estructura diferente (en algunos aspectos similar al motivo hélice-giro-hélice) en la que dos hélices α se mantienen juntas mediante dos átomos de zinc (**Figura 7–16**). De forma similar a las proteínas hélice-giro-hélice, forman dímeros que permiten a una de las dos hélices α de cada subunidad interaccionar con el surco mayor del DNA. Aunque la estructura de los dos tipos de dedos de zinc es diferente, comparten dos rasgos importantes: ambas utilizan zinc como elemento estructural y ambas utilizan la hélice α para reconocer el surco mayor del DNA.

Las láminas β también pueden reconocer el DNA

En los motivos de unión a DNA descritos hasta el momento, sólo se utilizaban hélices α como estructura capaz de reconocer secuencias específicas de DNA. Sin embargo, un gran grupo de proteínas reguladoras ha desarrollado una estrategia de reconocimiento completamente diferente. En este caso, una lámina β de dos hebras, con las cadenas laterales de los aminoácidos extendidas desde la lámina hacia el DNA, lee la información sobre la superficie del surco mayor (**Figura 7–17**). Como en el caso del reconocimiento mediante hélice α, este motivo en lámina β puede reconocer muchas secuencias de DNA diferentes; la secuencia de DNA exacta reconocida depende de los aminoácidos que formen la lámina β.

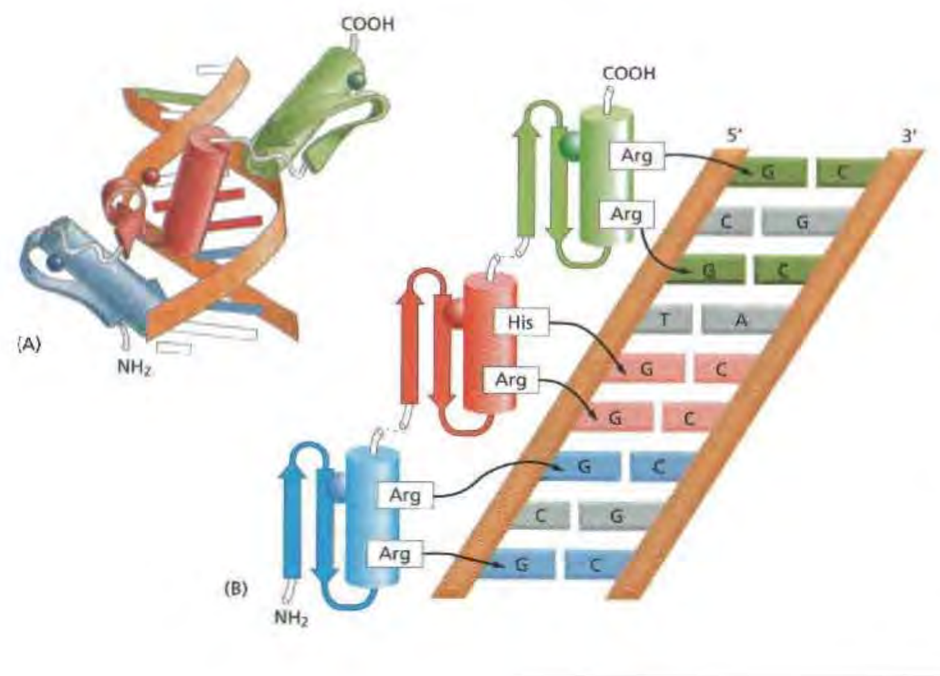


Figura 7–15 Unión a DNA de una proteína con dedo de zinc. (A) La estructura de un fragmento de una proteína reguladora del ratón unida a su secuencia específica en el DNA. Esta proteína reconoce el DNA a través de tres dedos de zinc del tipo Cys-Cys-His-His (véase Figura 7–14) organizados en repetición directa. <ATCT> (B) Los tres dedos de zinc tienen secuencias de aminoácidos similares y entran en contacto con el DNA de forma similar. Tanto en (A) como en (B) el átomo de zinc de cada dedo se ha representado como una pequeña esfera. (Adaptado de N. Pavletich y C. Pabo, *Science* 252: 819-817, 1991. Con la autorización de AAAS.)



Figura 7–16 Un dímero del dominio de dedo de zinc de la familia de receptores intracelulares unidos a su secuencia específica de DNA. Cada dominio de dedo de zinc contiene dos átomos de Zn (que se indican por las *esferas grises* pequeñas); uno estabiliza la hélice de reconocimiento del DNA (mostrada en *marrón* en una subunidad y en *rojo* en la otra), y la otra estabiliza un bucle (mostrado en *púrpura*) implicado en la formación del dímero. Cada átomo de Zn se encuentra coordinado con cuatro residuos cisteína separados adecuadamente. Como en las proteínas hélice-giro-hélice que aparecen en la Figura 7–11, las dos hélices de reconocimiento del dímero se mantienen a una distancia correspondiente a una vuelta de la doble hélice del DNA. El ejemplo específico que se muestra es un fragmento del receptor de glucocorticoides. Esta es la proteína mediante la cual las células detectan y responden transcripcionalmente a las hormonas glucocorticoides producidas por la glándula adrenal en respuesta al estrés. (Adaptado de B.F. Luisi et al., *Nature* 352: 497-505, 1991. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

Algunas proteínas, para reconocer el DNA, utilizan bucles que penetran en los surcos mayor y menor

Algunas proteínas de unión a DNA utilizan bucles peptídicos protuberantes para leer secuencias nucleotídicas en lugar de hélices α y láminas β. Por ejemplo, la proteína p53, un *supresor tumoral* esencial en los humanos, reconoce pares de nucleótidos tanto del surco mayor como del surco menor utilizando estos bucles (**Figura 7–18**). El papel normal de la proteína p53 es el de regular de forma precisa el crecimiento y la proliferación celular. Su importancia queda reflejada en el hecho de que casi la mitad de los cánceres humanos han adquirido mutaciones somáticas en el gen de p53; este paso es clave para la progresión de muchos tumores, como veremos en el Capítulo 20. Muchas de las mutaciones de p53 observadas en las células cancerosas destruyen o alteran sus propiedades de unión a DNA; de hecho, Arg 248, que contacta con el surco menor de DNA (véase Figura 7–18), es el residuo que aparece mutado con más frecuencia en los cánceres humanos.

El motivo "cremallera de leucina" está implicado tanto en el reconocimiento del DNA como en la dimerización

Muchas proteínas reguladoras reconocen el DNA como dímeros, probablemente debido a que, como se ha visto, se trata de una forma sencilla de alcanzar una elevada especificidad de unión (véase Figura 7–12). Por lo general, la región de la proteína responsable de la dimerización es diferente a la región que es responsable de la unión al DNA. Sin embargo, un motivo combina ambas funciones de una forma elegante y económica, el **motivo de la cremallera de leucina.** Se denomina así por la forma en que dos hélices α, una de cada monómero, se mantienen unidas formando un corto sobreenrollamiento (véase Figura 3–9). Las hélices se mantienen unidas por interacciones entre las cadenas laterales hidrofóbicas de algunos aminoácidos (frecuentemente leucinas), que se extienden desde un lado de cada hélice. Exactamente después del dominio de dimerización, las dos hélices α se separan una de la otra y forman una estructura en forma de Y, lo que permite a sus cadenas laterales entrar en contacto con el surco mayor del DNA. Así, el dímero pinza la doble hélice como una pinza de tender ropa (**Figura 7–19**).

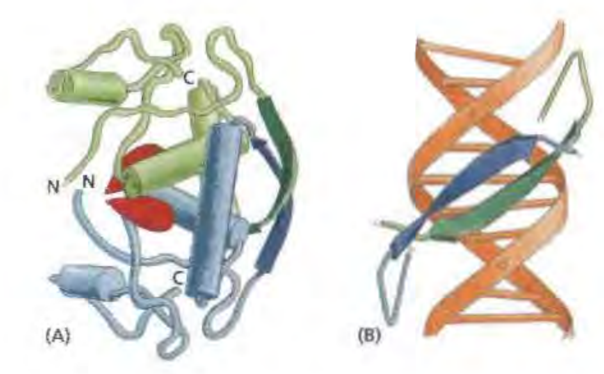


Figura 7–17 La proteína represora bacteriana Met. La proteína represora bacteriana Met regula los genes que catalizan la síntesis de metionina. Cuando este aminoácido es abundante, se une al represor provocando un cambio en la estructura de la proteína que le permite unirse con fuerza al DNA e inactivar la síntesis de la enzima. (A) Para poderse unir fuertemente al DNA, el represor Met tiene que estar acomplejado con S-adenosil metionina, mostrado en *rojo*. Se muestra en *verde* una subunidad de la proteína dimérica, y la otra se muestra en *azul*. Las dos láminas β que se unen al DNA están formadas por una cadena de cada subunidad, mostradas en *azul oscuro* y *verde oscuro*. (B) Esquema simplificado del represor Met unido al DNA, que muestra cómo las láminas β de doble hebra del represor se unen al surco mayor del DNA. Para mayor claridad se han omitido las otras regiones del represor. (A, adaptado de S. Phillips, *Curr. Opin. Struc. Biol.* 1: 89-98, 1991, con la autorización de Elsevier; B, adaptado de W. Somers y S. Phillips, *Nature* 359: 387–393, 1992, con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

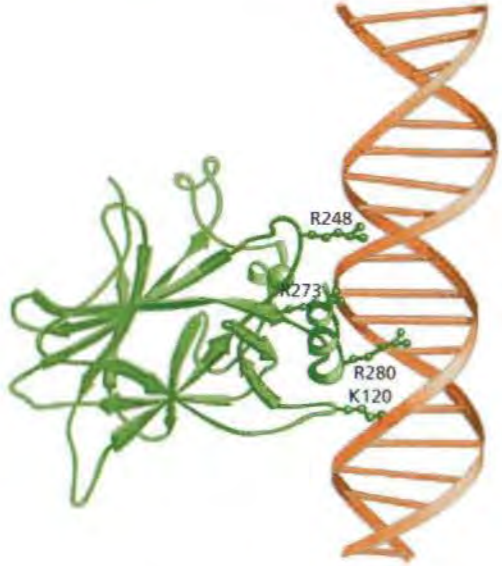


Figura 7–18 Reconocimiento de DNA mediante la proteína p53. Los contactos más importantes son los que establecen la arginina 248 y la lisina 120, que se extienden desde los bucles protuberantes hasta los surcos mayor y menor. El plegamiento de la proteína p53 precisa un átomo de zinc (mostrado como una esfera), pero la manera como la proteína sujeta el zinc es por completo distinta a la de las proteínas con dedos de zinc, descritas previamente.

La heterodimerización amplía el repertorio de secuencias de DNA que las proteínas de regulación génica pueden reconocer

Muchas de las proteínas reguladoras de la expresión génica mencionadas hasta ahora se unen al DNA en forma de homodímeros, es decir, dímeros formados por dos subunidades idénticas. Sin embargo, muchas de estas proteínas pueden asociarse con proteínas acompañantes no idénticas, formando así heterodímeros compuestos por dos subunidades distintas. Debido a que habitualmente los heterodímeros se forman a partir de proteínas con especificidad de unión al DNA diferente, esta mezcla y combinación de proteínas reguladoras de la expresión génica amplía en gran medida el repertorio de especificidades de unión a DNA que pueden presentar estas proteínas. Por ejemplo, en la **Figura 7–20** se muestran tres posibles especificidades de secuencia que se podrían obtener con sólo dos tipos de monómeros de cremallera de leucina; se podrían obtener seis a partir de únicamente tres monómeros, y así sucesivamente.



Figura 7–19 Un dímero en cremallera de leucina unido al DNA. Dos dominios de unión al DNA en forma de hélice α (*abajo*) dimerizan a través de la región de la cremallera de leucina (*arriba*) formando una estructura en Y invertida. Cada uno de los brazos de la Y está formado por una hélice α sencilla, una de cada monómero, que entran en contacto con la secuencia específica de DNA en el surco mayor. <TGTT> Cada una de las hélices α se une a una mitad de la estructura simétrica del DNA. La estructura que se muestra corresponde a la proteína Gcn4 de la levadura, que regula la transcripción en respuesta a la disponibilidad de aminoácidos en el medio. (Adaptado de T.E. Ellenberger et al., *Cell* 71: 1223-1237, 1992. Con la autorización de Elsevier.)



Figura 7–20 La heterodimerización de proteínas con cremalleras de leucina permite alterar su especificidad de unión al DNA. Los homodímeros de cremallera de leucina se unen a secuencias de DNA simétricas, como se muestra en los esquemas de la izquierda y del centro. Estas dos proteínas reconocen diferentes secuencias de DNA, como se indica por las regiones coloreadas en *rojo* y en *azul* del DNA. Estos dos monómeros diferentes se pueden combinar formando un heterodímero que reconoce una molécula de DNA híbrida compuesta por una región *roja* y otra *azul*.

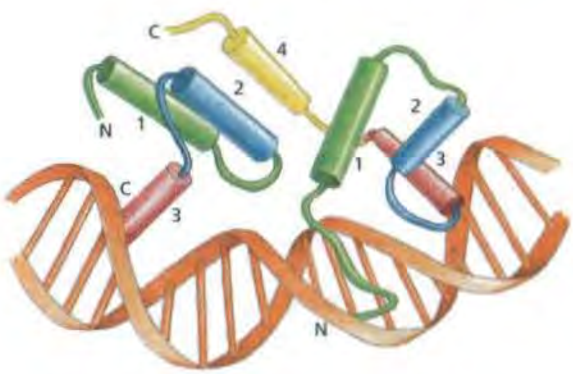


Figura 7–21 Un heterodímero compuesto por dos homeodominios unidos a su lugar de reconocimiento en el DNA. La hélice 4 *amarilla* de la proteína a la derecha (Matα2), en ausencia de la proteína de la izquierda (Mata1) se encuentra desestructurada, y sólo forman una hélice tras su heterodimerización. La secuencia de DNA es reconocida conjuntamente por las dos proteínas; algunos de los contactos proteína-DNA formados por Matα2 se muestran en la Figura 7–13. Estas dos proteínas corresponden a la levadura de gemación en la que el heterodímero especifica un tipo celular particular (véase Figura 7–65). Las hélices están numeradas de acuerdo con la Figura 7–13. (Adaptado de T. Li et al. *Science* 270: 262-269, 1995. Con la autorización de AAAS.)

Sin embargo, existen límites a esta promiscuidad: por ejemplo, si la mayor parte de las proteínas de cremallera de leucina de una célula eucariota típica formasen heterodímeros, la cantidad de interrelaciones entre los circuitos de regulación génica sería tan grande que probablemente produciría un caos. Que un heterodímero se forme o no depende de cómo se ajusten las superficies hidrofóbicas de las dos hélices α que forman la cremallera, lo que a su vez depende de la secuencia de aminoácidos de las dos regiones de la cremallera. Así, cada proteína de la célula que tenga una cremallera de leucina sólo podrá formar dímeros con una pequeña fracción de otras proteínas con cremalleras de leucina.

La heterodimerización es un ejemplo de **control combinatorio**, en el que son las combinaciones de proteínas, más que las proteínas individuales, las que controlan un proceso celular. La heterodimerización como mecanismo de control combinatorio de la expresión génica se da en muchos tipos distintos de proteínas reguladoras (**Figura 7–21**). El control combinatorio es un tema fundamental que encontraremos repetidamente a lo largo de este capítulo; la formación de complejos heterodiméricos entre proteínas reguladoras es sólo uno de los distintos mecanismos mediante los cuales las proteínas actúan de forma combinada controlando la expresión génica.

Algunas combinaciones de proteínas reguladoras de la expresión génica se han "programado" dentro de la célula; por ejemplo, dos dominios distintos de unión a DNA pueden, mediante reordenaciones de genes que han ocurrido a lo largo de escalas de tiempo evolutivas, unirse entre sí formando una sola cadena polipeptídica con una nueva especificidad de unión al DNA (**Figura 7–22**).

El motivo hélice-bucle-hélice también está implicado en la dimerización y en la unión al DNA

Otro motivo importante de unión al DNA, relacionado con la cremallera de leucina, es el **motivo hélice-bucle-hélice (HLH: *h*elix-*l*oop-*h*elix)**, que es distinto del motivo hélice-giro-

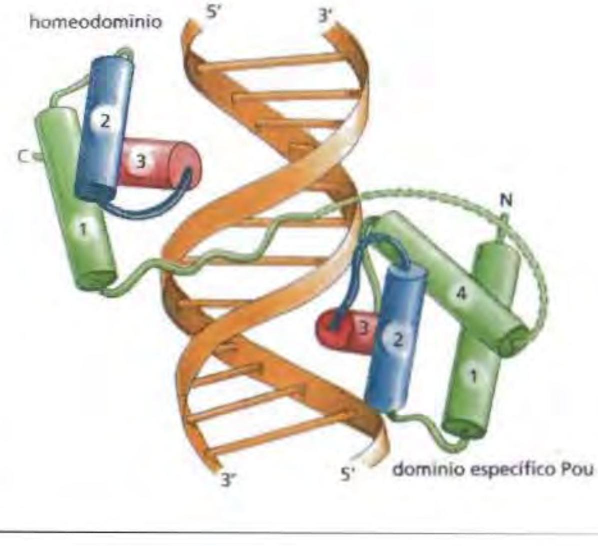


Figura 7–22 Dos dominios de unión al DNA conectados de forma covalente mediante un polipéptido flexible. La estructura que se muestra (denominada dominio Pou) consiste en un homeodominio y una estructura hélice-giro-hélice unidos mediante una "correa" formada por un polipéptido flexible, indicada mediante líneas discontinuas. Un único gen codifica toda la proteína, la cual se sintetiza como una cadena polipeptídica continua. La conexión covalente de dos estructuras de esta forma genera un gran aumento de la afinidad de la proteína por su secuencia específica de DNA en comparación con la afinidad que tiene cada estructura por separado por el DNA. El grupo de proteínas reguladoras de genes de mamíferos, de las que esta estructura es un ejemplo, regula la producción de factores de crecimiento, inmunoglobulinas y otras moléculas implicadas en el desarrollo. El ejemplo concreto que se muestra corresponde a la proteína Oct1. (Adaptado de J.D. Klemm et al., *Cell* 77: 21-32, 1994. Con la autorización de Elsevier.)

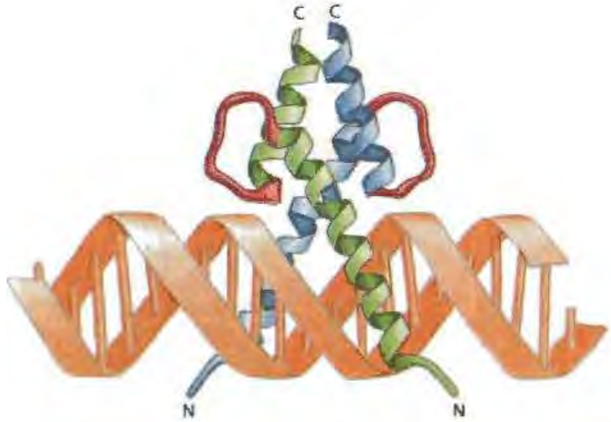


Figura 7–23 Un dímero de proteína hélice-bucle-hélice (HLH) unido al DNA. Los cuatro monómeros se mantienen unidos en un haz de cuatro hélices: cada monómero contribuye con dos hélices α conectadas mediante un bucle flexible de proteína (*rojo*). A las dos hélices α que se proyectan desde el ovillo se une una secuencia de DNA específica. (Adaptado de A.R. Ferre-D'Amare et al., *Nature* 363: 38-45, 1993. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

hélice descrito. Un motivo HLH está formado por una hélice α corta conectada por un bucle a una hélice α más larga. La flexibilidad del bucle permite que una de las hélices se doble y quede alineada con la otra. Como se observa en la **Figura 7–23**, esta estructura de dos hélices se une tanto al DNA como a un motivo HLH de otra proteína con motivo HLH. Esta segunda proteína HLH puede ser la misma (se obtiene un homodímero) o diferente (el resultado es un heterodímero): en ambos casos, dos hélices α que sobresalen de la superficie de dimerización establecen contactos específicos con el DNA.

Algunas de las proteínas HLH carecen de la extensión de hélice α responsable de la unión al DNA. Estas proteínas truncadas pueden formar heterodímeros con proteínas con motivo HLH completo, pero los heterodímeros son incapaces de unirse estrechamente al DNA, ya que sólo pueden formar la mitad de los contactos necesarios. Así, además de dar lugar a dímeros activos, la heterodimerización proporciona a las células una forma muy común de mantener bajo control proteínas reguladoras específicas (**Figura 7–24**).

Aún no es posible predecir la secuencia de DNA que es reconocida por una proteína reguladora

Los diferentes motivos de unión a DNA descritos aportan un soporte estructural desde el que se extienden las cadenas laterales de los aminoácidos que entran en contacto con determinados pares de bases del DNA. Sería razonable preguntarse si se trata de un código de apareamiento aminoácido-pareja de bases sencillo: por ejemplo ¿siempre es el par de bases G-C el que se une a un cierto aminoácido? La respuesta es no, aunque algunos tipos de interacción aminoácido-base aparecen con más frecuencia que otros (**Figura 7–25**). En el Capítulo 3 describimos que a partir de sólo 20 aminoácidos es posible obtener superficies de casi cualquier forma y naturaleza química, y que una proteína reguladora utiliza diferentes patrones de las cadenas laterales de sus aminoácidos para formar una superficie que sea exactamente complementaria a la de una secuencia determinada de DNA. Por lo tanto, un mismo par de bases puede ser reconocido de muchas formas diferentes según el contexto en el que se encuentre (**Figura 7–26**). Sin embargo, los biólogos moleculares comienzan a entender suficientemente bien los principios fundamentales que actúan en el

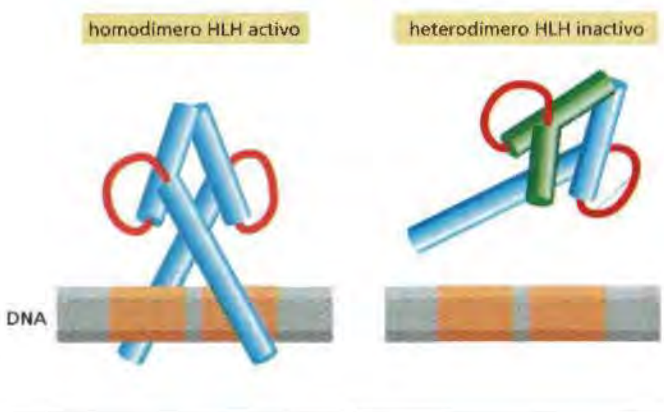


Figura 7–24 Regulación inhibidora por las proteínas HLH truncadas. El motivo HLH es responsable tanto de la dimerización como de la unión a DNA. A la *izquierda*, un homodímero HLH reconoce una secuencia simétrica de DNA. A la *derecha*, la unión de una proteína HLH completa (*azul*) a una proteína HLH truncada (*verde*) que carece de la hélice α de unión al DNA, forma un heterodímero incapaz de unirse fuertemente al DNA. Si la proteína truncada está presente en exceso, bloquea la homodimerización de la proteína completa y de este modo impide su unión al DNA.

reconocimiento de DNA-proteína como para diseñar nuevas proteínas que reconozcan una secuencia de DNA dada.

Una vez descritas las características generales de las proteínas de regulación génica, se indicarán algunos de los métodos utilizados en la actualidad para su estudio.

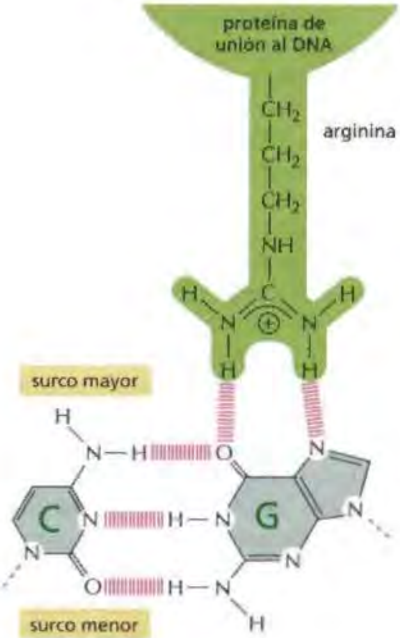


Figura 7–25 Una de las interacciones proteína-DNA más habituales. A causa de la especial geometría de sus aceptores de enlace de hidrógeno (véase Figura 7–7), la cadena lateral de la arginina reconoce a la guanina de forma no ambigua. La Figura 7–9 muestra otra interacción proteína-DNA.

Un ensayo de movilidad en gel detecta con gran facilidad proteínas que se unen a una secuencia específica de DNA

Los análisis genéticos que fueron la clave para aislar las proteínas reguladoras de bacterias, levaduras y *Drosophila*, muchas veces es imposible llevarlos a cabo en vertebrados. Por ello, el aislamiento de las proteínas de regulación génica de los vertebrados tuvo que esperar al desarrollo de diferentes aproximaciones experimentales. Muchas de ellas se basan en la detección en un extracto celular de una proteína de unión a DNA que reconoce específicamente una secuencia de la que se sabe que es importante para controlar la expresión de un gen determinado. Una de las formas más comunes de detectar y estudiar proteínas de unión a determinadas secuencias de DNA se basa en el efecto que tiene la unión de una proteína sobre la migración en un gel de moléculas de DNA bajo la acción de un campo eléctrico.

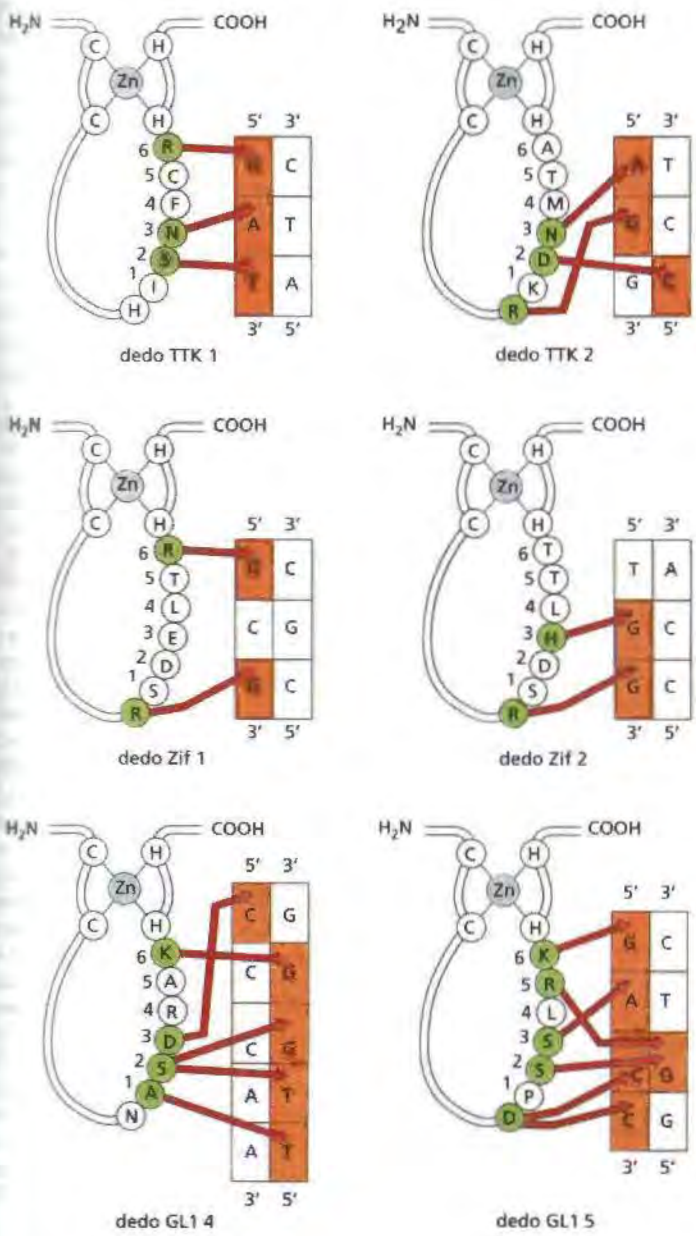


Figura 7–26 Resumen de las interacciones específicas de secuencia entre seis dedos de zinc distintos y sus secuencias de reconocimiento en el DNA. Pese a que los seis dedos de Zn tienen la misma estructura general (véase Figura 7–14), cada uno de ellos se une a una secuencia de DNA distinta. Los aminoácidos que están numerados son los que forman la hélice α que reconoce el DNA (Figuras 7–14 y 7–15) y los que están coloreados en *verde* son los que dan lugar a los contactos específicos con el DNA. Las bases que entran en contacto con la proteína están dibujadas en color *naranja*. Los contactos más habituales son los guanina-arginina (véase Figura 7–25), pero la guanina también puede ser reconocida por la serina, la histidina y la lisina, como se muestra. Además, un mismo aminoácido (serina, en este ejemplo) puede reconocer a más de una base. Dos de los dedos de Zn mostrados corresponden a la proteína TTK (una proteína de *Drosophila* que actúa durante el proceso de desarrollo); otros dos corresponden a la proteína de ratón Zif268 mostrada en la Figura 7–15, y los otros dos corresponden a la proteína humana GL1, cuyas formas aberrantes pueden causar algunos tipos de cáncer. (Adaptado de C. Branden y J. Tooze, Introduction to Protein Structure, 2.ª ed. New York: Garland Publishing, 1999.)

Una molécula de DNA está fuertemente cargada de forma negativa, por lo que cuando se somete a un campo eléctrico se desplaza con rapidez hacia el electrodo positivo. En geles de poliacrilamida (véase p. 534), las moléculas de DNA se separan según su tamaño debido a que las moléculas menores son capaces de penetrar con mayor facilidad que las mayores en la fina malla del gel. La presencia de moléculas de proteína unidas a las moléculas de DNA provocarán un desplazamiento más lento del DNA a través del gel; en general la movilidad del DNA se reducirá tanto más cuanto mayor sea el tamaño de la molécula de proteína unida. Este fenómeno es la base del **análisis de retraso en gel**, que permite detectar incluso trazas de proteínas de unión a DNA, específicas de secuencia. En este ensayo se utiliza un fragmento corto de DNA, de longitud y secuencia determinadas (producido por clonaje de DNA o por síntesis química, tal como se describe en el Capítulo 8) que es marcado radiactivamente y se mezcla con un extracto celular; la mezcla se carga en un gel de poliacrilamida y se analiza por electroforesis. Si el fragmento de DNA corresponde a una región cromosómica en la que, por ejemplo, se unen varias proteínas de unión a secuencias específicas, la autorradiografía (véase pp. 602-603) revelará una serie de bandas de DNA, cada una de las cuales sufrirá un retraso distinto, lo que refleja la existencia de diferentes complejos DNA-proteína. Las proteínas responsables de cada una de las bandas de retraso en el gel se pueden ir separando unas de otras mediante fraccionamiento del extracto celular (**Figura 7-27**). Una vez purificada una proteína de unión a secuencias específicas de DNA, el ensayo de movilidad en gel puede utilizarse para estudiar la fuerza y la especificidad de sus interacciones con distintas secuencias de DNA, la vida de los complejos DNA-proteína y otras características esenciales para el funcionamiento de la proteína en la célula.

La cromatografía de afinidad de DNA facilita la purificación de proteínas de unión a secuencias específicas de DNA

Cuando se obtiene la secuencia de DNA reconocida por una proteína reguladora, es posible utilizar un método de purificación de proteínas particularmente potente, denominado **cromatografía de afinidad de DNA**. Mediante métodos químicos se sintetiza un oligonucleótido de doble cadena de la secuencia adecuada y se une a una matriz porosa insoluble, como por ejemplo la agarosa; la matriz con el oligonucleótido unido se utiliza para construir una columna que unirá de forma selectiva las proteínas que reconozcan la secuencia de DNA

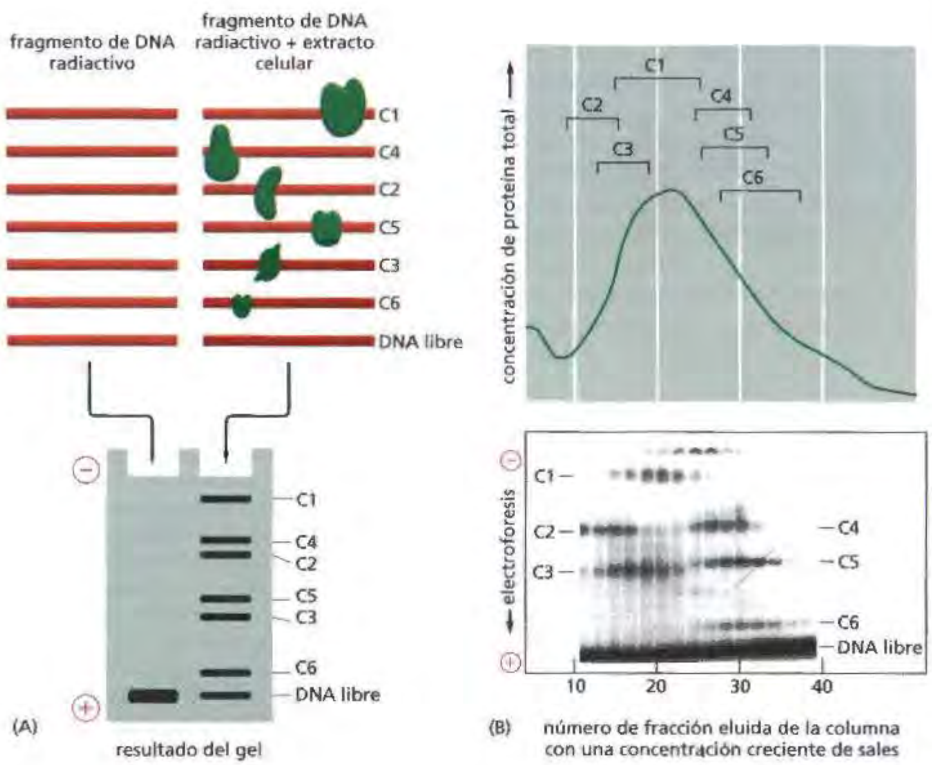


Figura 7-27 Análisis de retraso en gel. El principio del ensayo se muestra de forma esquemática en (A). Se mezcla un extracto de una línea celular productora de anticuerpos con un fragmento de DNA marcado radiactivamente, que contiene unos 160 nucleótidos de una secuencia de DNA reguladora, de un gen que codifica la cadena ligera producida por la línea celular. El efecto de las proteínas del extracto sobre la movilidad del fragmento de DNA se analiza por electroforesis seguida por autorradiografía. Los fragmentos de DNA libres se desplazan rápidamente hacia la base del gel, mientras que los que se unen a proteínas son retardados; la observación de 6 bandas de retraso sugiere que en el extracto existen 6 proteínas de unión a DNA diferentes, específicas de secuencia (indicadas como C1 a C6). (Para mayor sencillez, en la figura se han omitido los fragmentos de DNA que están unidos a más de una proteína.) En (B), el extracto fue fraccionado mediante una técnica cromatográfica estándar (véase pp. 512-513); cada fracción se mezcló con el fragmento radiactivo de DNA, se cargó en un carril de un gel de poliacrilamida y se analizó como en (A). (B, modificado de C. Scheidereit, A. Heguy y R.G. Roeder. *Cell*, 51: 783-793, 1987. Con la autorización de Elsevier.)

Figura 7-28). De esta forma se han conseguido –sin gran esfuerzo– purificaciones tan elevadas como de 10.000 veces.

Aunque en los eucariotas superiores muchas de las proteínas de regulación génica están presentes en la célula a concentraciones muy bajas, mediante cromatografía de afinidad es posible aislar suficiente cantidad de proteína pura como para obtener una secuencia parcial del extremo amino terminal, mediante espectrometría de masas u otros sistemas (descrito en el Capítulo 8). Si se conoce la secuencia completa del genoma del organismo, puede utilizarse la secuencia parcial de aminoácidos para identificar el gen. El gen no sólo aporta la secuencia completa de aminoácidos de la proteína, sino que también proporciona un medio para producir cantidades ilimitadas de la proteína mediante técnicas de ingeniería genética, también descritas en el Capítulo 8.

La secuencia de DNA reconocida por una proteína de regulación génica puede ser determinada de forma experimental

Las proteínas de regulación génica pueden ser descubiertas antes de que se conozca la secuencia de DNA que reconocen. Por ejemplo, muchas de las proteína con homeodominios de *Drosophila* se descubrieron mediante el aislamiento de mutaciones que alteraban el desarrollo de la mosca. Esto permitió identificar a los genes que codificaban estas proteínas y así las proteínas pudieron ser sobreexpresadas en cultivos celulares y purificadas fácilmente. La *huella en el DNA* es uno de los métodos que permiten determinar las secuencias de DNA reconocidas por una proteína de regulación génica una vez que ésta ha sido purificada. Esta estrategia también requiere un fragmento purificado de DNA dúplex que contenga un sitio de reconocimiento para la proteína. En cualquier fragmento largo de DNA pueden encontrarse al azar secuencias cortas de reconocimiento, aunque suele ser necesario utilizar cerca de la región reguladora de un gen controlado por la proteína de interés. La huella en el DNA se basa en nucleasas o agentes químicos que cortan el DNA al azar en cada unión fosfodiéster. Una proteína reguladora de unión protege las uniones fosfodiéster de este ataque, de modo que revela el sitio preciso de reconocimiento de la proteína como una zona protegida o huella (**Figura 7–29**).

Un segundo modo de determinar las secuencias de DNA reconocidas por proteínas de regulación génica no requiere ningún conocimiento previo sobre qué genes puede regular la proteína. En este caso, la proteína purificada se utiliza para seleccionar, a partir de un gran conjunto de distintos fragmentos cortos de DNA generado de forma aleatoria, sólo aquellos

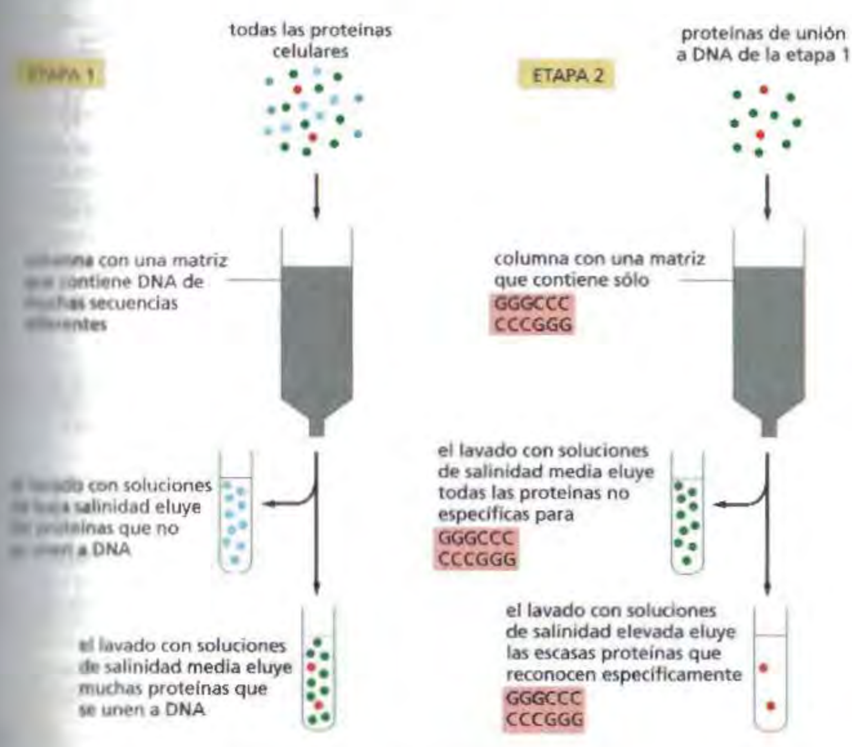


Figura 7–28 Cromatografía de afinidad de DNA. En la primera etapa todas las proteínas que pueden unir DNA se separan del resto de las proteínas de la célula, en una columna que contiene una gran cantidad de secuencias diferentes de DNA. Generalmente, la mayoría de las proteínas de unión a secuencias específicas de DNA tienen una afinidad débil por el DNA (no específica) y son retenidas en la columna. Esta afinidad es debida sobre todo a interacciones iónicas, de forma que las proteínas pueden ser eluidas de la columna mediante soluciones de una concentración salina moderada. En una segunda etapa, la mezcla de proteínas de unión a DNA se pasa a través de una columna que sólo contiene DNA de una secuencia particular. Normalmente, la mayoría de proteínas de unión a DNA se unirán débilmente, mediante interacciones inespecíficas. Éstas serán eluidas de nuevo mediante soluciones de salinidad moderada, dejando en la columna aquellas proteínas (por lo general una o muy pocas) que se unen de manera específica y, por tanto, firmemente, a la secuencia de DNA particular. Estas proteínas retenidas se pueden eluir mediante soluciones de elevada concentración de sales.

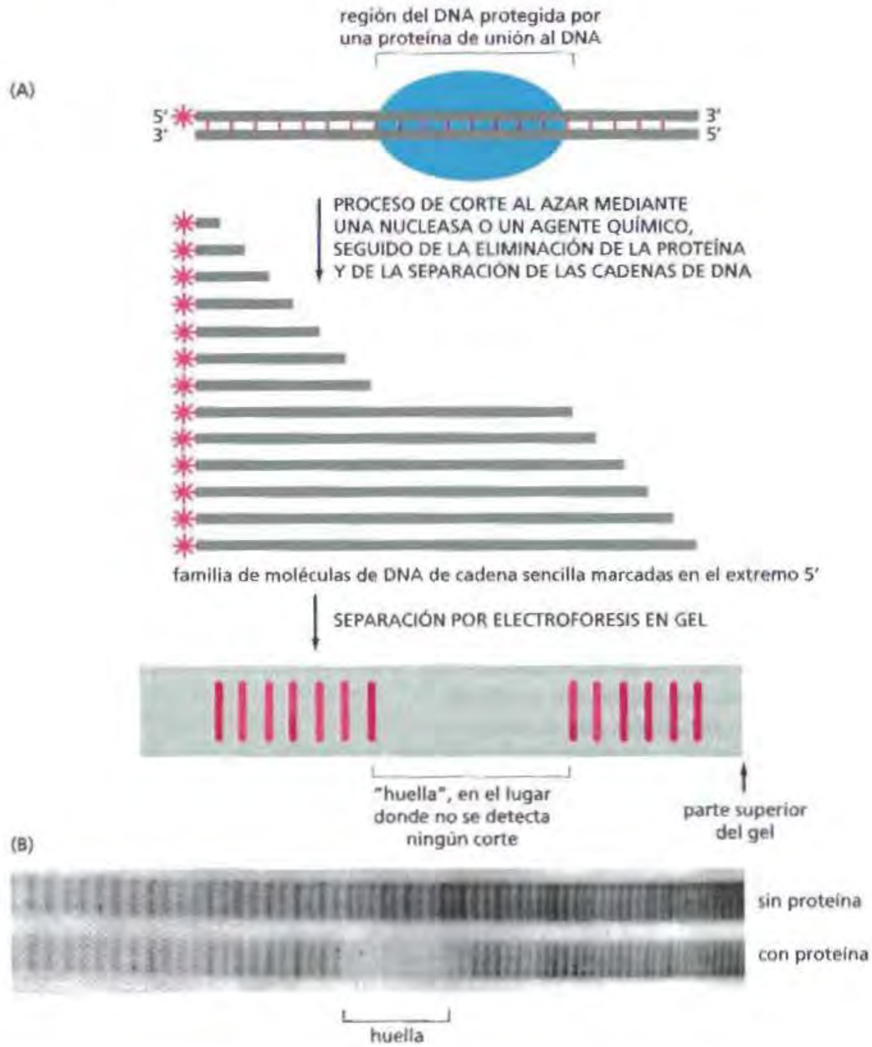


Figura 7–29 **Huella en el DNA.** (A) Esquema del método. Un fragmento de DNA se marca en un extremo con ^{32}P, procedimiento descrito en la Figura 8–34, y se corta con una nucleasa o un producto químico que corta al azar las cadenas sencillas. Después de desnaturalizar la molécula DNA para separar sus dos cadenas, los fragmentos que proceden de la cadena marcada se separan en un gel y se detectan por autorradiografía (véase Figura 8–33). El patrón de bandas del DNA cortado en presencia de una proteína de unión al DNA se compara con el patrón del DNA cortado en ausencia de la proteína. Cuando la proteína está presente, cubre los nucleótidos de su sitio de unión y protege sus enlaces fosfodiéster del proceso de corte. Por consiguiente, los fragmentos marcados que terminarían en el lugar de unión, no aparecen y dejan un agujero en el patrón del gel que se denomina "huella". En el ejemplo mostrado, la proteína de unión al DNA protege siete enlaces fosfodiéster del agente que corta el DNA. (B) Una huella en el DNA real utilizada para determinar el sitio de unión para una proteína de regulación génica del hombre. El agente que se utilizó para cortar fue una molécula orgánica pequeña que contenía hierro y que, por lo general, corta en cada enlace fosfodiéster exactamente con la misma frecuencia. (B, cortesía de Michele Sawadogo y Robert Roeder.)

fragmentos que se unan con fuerza a la proteína. Después de varias rondas de esta selección, se determinan las secuencias nucleotídicas de los DNA unidos fuertemente y se puede formular una secuencia consenso de DNA de reconocimiento para la proteína de regulación génica (**Figura 7–30**). Cuando se conoce la secuencia de reconocimiento para la proteína reguladora, búsquedas en el genoma mediante ordenador identifican genes candidatos cuya transcripción quizás sea controlada por la proteína reguladora. Sin embargo, esta estrategia no es infalible. Por ejemplo, muchos organismos producen una serie de proteínas de regulación génica muy relacionadas entre sí que reconocen secuencias de DNA muy parecidas y



Figura 7–30 **Método para determinar la secuencia de DNA reconocida por una proteína reguladora de genes.** Una proteína reguladora de genes purificada se mezcla con millones de fragmentos cortos distintos de DNA, cada uno de los cuales tiene una secuencia nucleotídica distinta. Mediante la programación de un sintetizador de DNA, una máquina que sintetiza químicamente DNA de cualquier secuencia que se desee (descrito en el Capítulo 8) se puede producir una colección de estos fragmentos de DNA. Por ejemplo, para un fragmento de DNA de 11 nucleótidos existen 4^{11}, aproximadamente 4,2 millones de secuencias posibles. Los fragmentos de DNA de doble cadena que estén unidos fuertemente a la proteína reguladora son separados de los fragmentos de DNA que no pueden unirse. Un método para lograr esta separación es mediante el retraso en gel, como se muestra en la Figura 7–27. Tras la separación de los complejos DNA-proteína del DNA libre, los fragmentos de DNA se separan de la proteína y suelen ser utilizados para varios ciclos adicionales de selección. Se pueden determinar las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de DNA que permanecen tras varios ciclos de unión y separación, y generar así una secuencia consenso de reconocimiento del DNA.

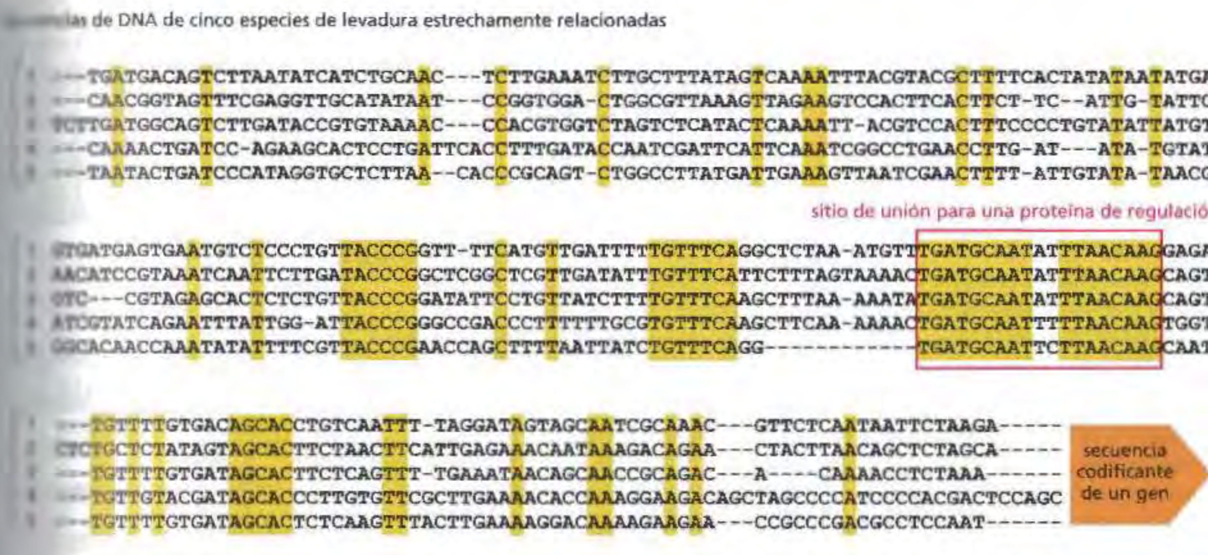


Figura 7–31 **Huella filogenética.** Este ejemplo compara secuencias de DNA de la región corriente arriba de un mismo gen de cinco levaduras estrechamente relacionadas; los nucleótidos idénticos están marcados en *amarillo*. La huella filogenética pone de manifiesto los sitios de reconocimiento del DNA para las proteínas reguladoras, ya que por lo general están más conservados que las secuencias vecinas. En este ejemplo sólo se muestra la región corriente arriba de un gen determinado, pero este método se utiliza normalmente para analizar genomas enteros. Las proteínas de regulación génica que se unen a la secuencia marcada en *rojo* se muestran en la Figura 7–21. Algunas de las huellas filogenéticas más cortas de este ejemplo representan los sitios de unión de proteínas reguladoras adicionales, algunas de las cuales todavía no se han identificado. (De M. Kellis et al., *Nature* 423:241–254, 2003, con la autorización de Macmillan Publishers Ltd., y D.J. Galgoczy et al., *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 101:18069–18074, 2004, con la autorización de National Academy of Sciences.)

este método no las puede distinguir. En la mayoría de los casos, las predicciones de los sitios de unión de las proteínas reguladoras obtenidas mediante la búsqueda de secuencias genómicas tienen que ser comprobadas de forma experimental.

La huella filogenética identifica secuencias reguladoras del DNA mediante la genómica comparativa

La gran disponibilidad de secuencias de genomas completos proporciona un método sorprendentemente sencillo para la identificación de sitios reguladores importantes en el DNA, incluso cuando no se conoce la proteína de regulación génica que se une a ellos. En este procedimiento, se comparan genomas de distintas especies muy relacionadas entre sí. Si se eligen bien las especies, las zonas del genoma que codifican proteínas serán muy parecidas, mientras que las regiones situadas entre las secuencias que codifican moléculas proteicas o de RNA habrán divergido de forma considerable, ya que la mayoría de estas secuencias son funcionalmente irrelevantes por lo que no están controladas durante la evolución. Entre las excepciones a esta regla general, encontramos las secuencias reguladoras que controlan la transcripción génica. Estas secuencias sobresalen como islas conservadas en un mar de nucleótidos no conservados (**Figura 7–31**). A pesar de que la identidad de las proteínas reguladoras de genes que reconocen las secuencias conservadas de DNA debe ser determinada de otra forma, la huella filogenética es un método potente para la identificación de muchas secuencias de DNA que controlan la expresión génica.

La inmunoprecipitación de la cromatina identifica muchos de los sitios que ocupan en las células vivas las proteínas reguladoras de genes

En un determinado momento, una proteína reguladora de genes no ocupará todos sus sitios potenciales de unión al DNA en el genoma. Bajo ciertas circunstancias, puede ser que la proteína no se sintetice y, por lo tanto, esté ausente dentro de la célula; puede estar presente, pero sin su pareja heterodimérica, o puede estar excluida del núcleo hasta que se reciba la señal adecuada desde el entorno celular. Incluso si la proteína de regulación génica se encuentra



Figura 7-32 Inmunoprecipitación de la cromatina. Este método permite identificar todos los sitios del genoma que ocupa *in vivo* una proteína de regulación génica. Para la amplificación del DNA mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), véase Figura 8-45. La identidad de los fragmentos de DNA precipitados y amplificados puede determinarse por hibridación de la mezcla de fragmentos de DNA mediante microchips de DNA, como se describe en el Capítulo 8.

en el núcleo y está capacitada para unirse al DNA, determinados componentes de la cromatina u otras proteínas reguladoras que se unen a las mismas secuencias de DNA o a secuencias superpuestas, pueden ocultar muchos de sus sitios potenciales de unión al DNA.

La **inmunoprecipitación de la cromatina** proporciona un método para la determinación empírica de los sitios del DNA que ocupa una determinada proteína de regulación génica bajo unas condiciones determinadas (**Figura 7-32**). En este procedimiento, las proteínas se entrelazan de forma covalente al DNA en células vivas, las células se rompen y el DNA se corta mecánicamente en fragmentos pequeños. A continuación se utilizan anticuerpos contra una proteína reguladora dada para purificar el DNA que se ha unido covalentemente a esta proteína en la célula. Si este DNA se hibrida en microchips que contengan el genoma entero dispuesto en series de fragmentos discretos de DNA (véase Figura 8-73), se puede determinar la localización genómica precisa de cada fragmento de DNA precipitado. De esta forma se pueden situar en el genoma de la célula todos los sitios ocupados por la proteína reguladora en las células originales (**Figura 7-33**).

La inmunoprecipitación de cromatina se utiliza de forma rutinaria para identificar posiciones a lo largo del genoma que están empaquetadas por varios tipos de histonas modificadas (descrito en el Capítulo 4). En este caso, se utilizan anticuerpos específicos para la modificación de histonas de interés.

Resumen

Las proteínas reguladoras de genes reconocen cortas secuencias específicas de DNA de doble hélice y de ese modo determinan qué genes, de entre los miles de una célula, se han de transcribir. En una amplia variedad de organismos se han identificado miles de proteínas de regulación génica. Aunque cada una de estas proteínas tiene una serie de rasgos únicos, muchas de ellas se unen al DNA como homodímeros o como heterodímeros que reconocen al DNA mediante uno de entre un pequeño número de motivos estructurales. Los motivos más comunes incluyen el motivo hélice-giro-hélice, el homeodominio, las cremalleras de leucina, el motivo hélice-bucle-hélice y los dedos de zinc de distintos tipos. La secuencia de aminoácidos que se pliega en el dominio de reconocimiento determina la secuencia de DNA que reconoce una determinada proteína de regulación génica. La heterodimerización aumenta el número de secuencias de DNA que pueden ser reconocidas. Se han desarrollado potentes técnicas que permiten identificar y aislar estas proteínas, los genes que las codifican y las secuencias de DNA que reconocen, y para situar en el genoma todos los genes específicos u los que regulan.

CÓMO FUNCIONAN LOS INTERRUPTORES GENÉTICOS

En la sección anterior se han descrito los componentes básicos de los interruptores genéticos: las proteínas de regulación génica y las secuencias específicas de DNA que estas proteínas reconocen. En esta sección expondremos cómo actúan estos componentes activando e inactivando genes en respuesta a una variedad de señales.

A mediados del siglo XX, la idea de que los genes se podían activar e inactivar fue revolucionaria. Este concepto constituyó un gran avance y nació del estudio de cómo la bacteria *E. coli* era capaz de adaptarse a cambios en la composición del medio de crecimiento. Estudios paralelos realizados con el bacteriófago lambda llegaron a muchas conclusiones similares y contribuyeron a establecer los mecanismos implicados. Muchos de estos principios se aplican a las células eucariotas. Sin embargo, la enorme complejidad de la regulación génica en los organismos superiores, combinado con el empaquetamiento de su DNA en forma de cromatina, genera nuevas posibilidades para el control, como se verá más adelante. Comenzaremos con el ejemplo más sencillo: un interruptor conectado/desconectado en bacterias que responde a una sola señal.

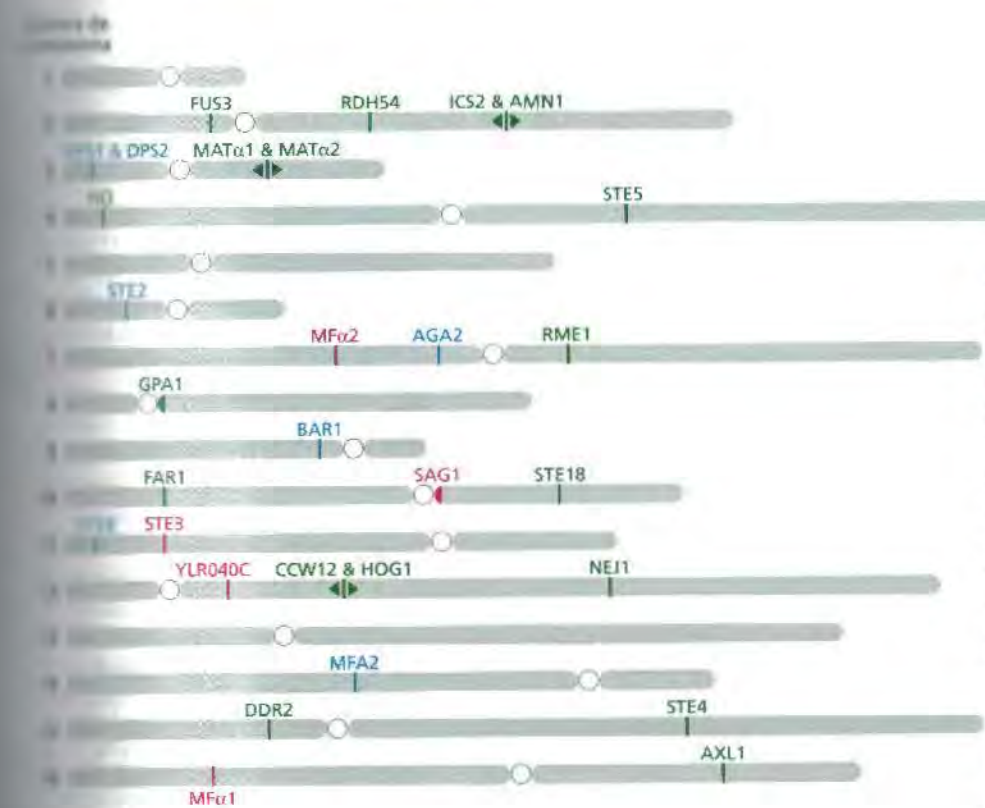


Figura 7–33 Un circuito de regulación génica: el conjunto completo de genes controlados por tres proteínas reguladoras clave en la levadura de cerveza. Las proteínas reguladoras –denominadas Mata1, Matα1 y Matα2– especifican los dos tipos distintos de apareamiento haploide (análogos a los gametos de macho y hembra) de este organismo unicelular. Se muestran (*gris*) los 16 cromosomas del genoma de la levadura, con barras de colores que indican sitios a los que se unen diferentes combinaciones de las tres proteínas reguladoras. Encima de cada sitio de unión se muestra el nombre de cada producto proteico del gen diana regulado. Matα1, actuando en un complejo con otra proteína, Mcm1, activa la expresión de los genes marcados en *rojo;* Matα2, actuando en un complejo con Mcm1, reprime los genes marcados en *azul;* y Mata1, en un complejo con Matα2, reprime los genes marcados en *verde* (véase Figura 7–21 y 7–65). Las *puntas de flecha dobles* representan los genes transcritos de forma divergente, los cuales están controlados por las proteínas de regulación génica indicadas. Este mapa completo de las proteínas reguladoras unidas, se obtuvo utilizando una combinación de inmunoprecipitación de la cromatina del genoma completo (véase Figura 7–32) y huella filogenética (véase Figura 7–29). La resolución de circuitos transcripcionales completos como este, muestra que las redes transcripcionales no son infinitamente complejas, pese a que en un principio puedan parecerlo. Este tipo de estudios ayuda también a revelar la lógica global de los circuitos de transcripción utilizados en las células actuales. (De D.J. Galgoczy et al., *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 101:18069-18074, 2004. Con la autorización de National Academy of Sciences.)

El represor de triptófano es un interruptor sencillo que activa y desactiva genes en bacterias

El cromosoma de la bacteria *E. coli*, un organismo unicelular, es una molécula de DNA circular de alrededor de 4,6 × 10⁶ pares de bases. Este DNA codifica alrededor de 4300 proteínas, aunque simultáneamente la célula sólo fabrica algunas de estas proteínas. La expresión de muchos genes se regula de acuerdo con la disponibilidad de fuentes de alimento que son accesibles en el medio. Ejemplo de ello son los cinco genes que en *E. coli* codifican las enzimas responsables de la producción del aminoácido triptófano. Estos genes están organizados en un único **operón**, es decir, se hallan adyacentes y se transcriben desde un solo promotor como una larga molécula de mRNA (**Figura 7–34**). Sin embargo, cuando hay triptófano presente en el medio y éste penetra en la célula (p. ej. cuando la bacteria se encuentra en el tracto digestivo de un animal que acaba de ingerir proteínas), estas enzimas ya no se necesitan y su producción se detiene.

Actualmente conocemos con gran detalle las bases moleculares de este interruptor. Tal como se ha descrito en el Capítulo 6, el promotor es la secuencia de DNA que dirige la unión de la RNA polimerasa al DNA, abriendo la doble hélice e iniciando la síntesis de una molécula de RNA. Dentro del promotor que dirige la transcripción de los genes biosintéticos de triptófano se encuentra un elemento regulador, denominado **operador** (véase Figura 7–34). Se trata simplemente de una corta región de DNA regulador, de secuencia definida, que es reconocida por una proteína reguladora hélice-giro-hélice denominada **represor del trip-**

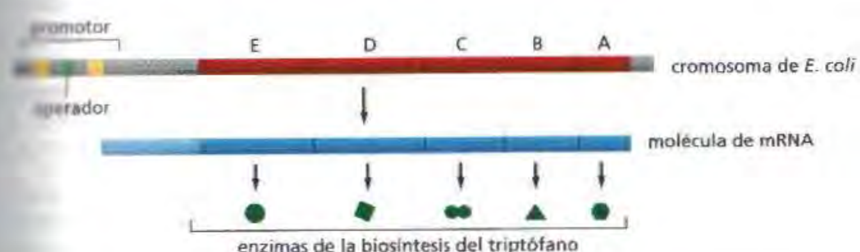


Figura 7–34 Los genes agrupados que codifican las enzimas que sintetizan el aminoácido triptófano en *E. coli*. Estos cinco genes del operón *Trp* –denominados *TrpA, B, C, D* y *E*– se transcriben como una sola molécula de mRNA, lo que permite que su expresión sea regulada de manera coordinada. Los grupos de genes transcritos como un sólo mRNA son comunes en bacterias. A cada uno de esos grupos se le denomina un operón.

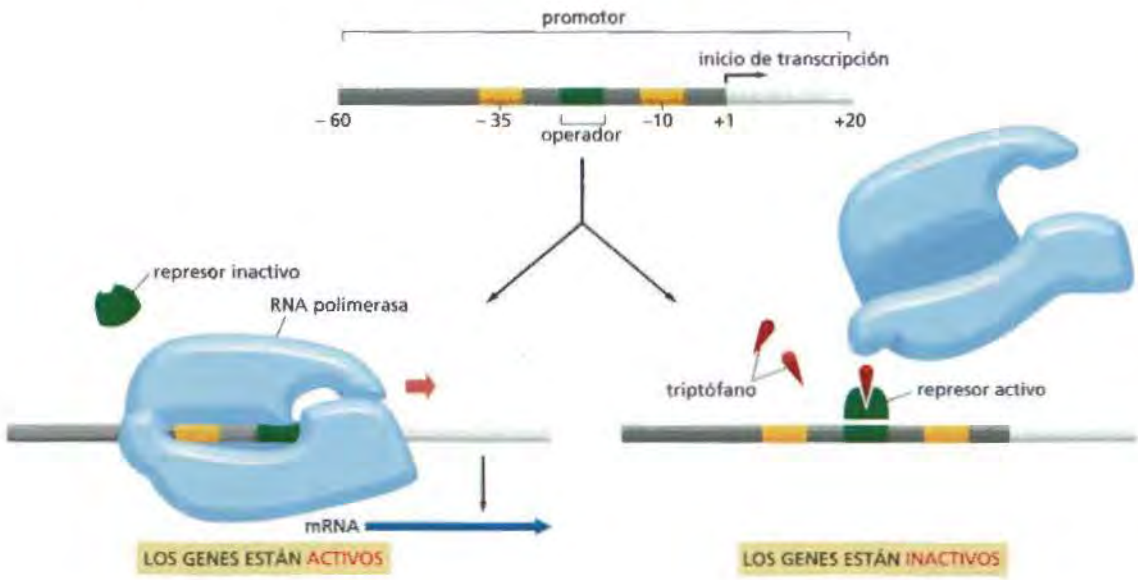


Figura 7-35 Activación e inhibición de los genes del triptófano. Si en el interior de la célula el nivel de triptófano es bajo, la RNA polimerasa se une al promotor y transcribe los cinco genes del operón de triptófano (*Trp*). Sin embargo, si el nivel de triptófano es alto, el represor de triptófano se activa uniéndose al operador e impide la unión de la RNA polimerasa al promotor. Siempre que el nivel de triptófano se reduzca, el represor libera su triptófano y se inactiva, permitiendo que la polimerasa inicie la transcripción de estos genes. El promotor incluye dos bloques esenciales de información en la secuencia del DNA, las regiones –35 y –10 destacadas en *amarillo* (véase Figura 6-12).

tófano (véase Figura 7-11). El promotor y el operador se encuentran organizados de forma que cuando el operador está unido al represor del triptófano se bloquea el acceso de la RNA polimerasa al promotor, de modo que se impide la expresión de las enzimas productoras de triptófano (**Figura 7-35**).

El bloqueo de la expresión génica está regulado de una forma ingeniosa: la proteína represora sólo puede unirse al DNA del operador cuando se ha unido a su vez a dos moléculas del aminoácido triptófano. Como se ve en la **Figura 7-36**, la unión de triptófano desplaza los motivos hélice-giro-hélice del represor de modo que se pueden presentar de manera apropiada en el surco mayor del DNA; sin triptófano, los motivos quedan en el interior de la proteína y la proteína es incapaz de unirse al operador. Así pues, el represor del triptófano es un dispositivo sencillo que controla la producción de las enzimas biosintéticas del triptófano, mediante la activación o desactivación de la producción en función de la disponibilidad de triptófano libre. A este modo de regulación se le denomina **control negativo**, ya que la forma activa de la proteína de unión a DNA desactiva los genes, y a las proteínas reguladoras que actúan de este modo se las denomina *represores transcripcionales* o *proteínas represoras génicas*.

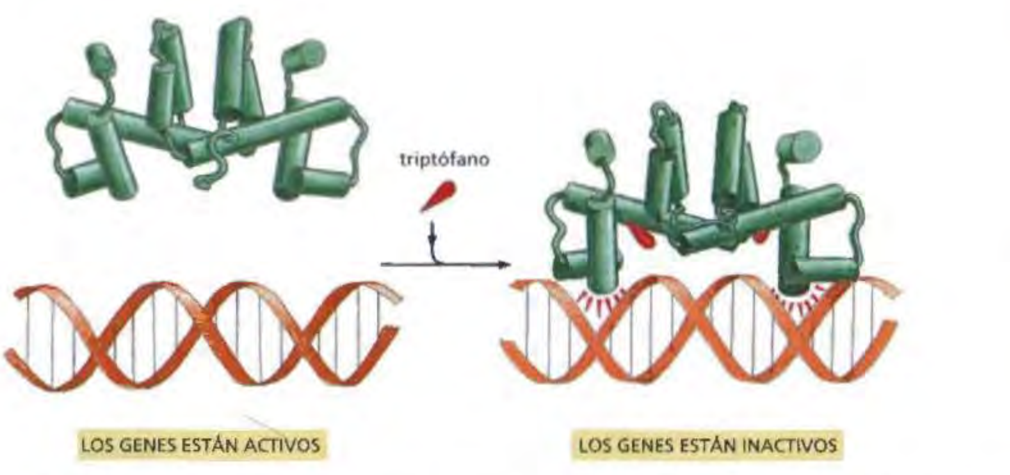


Figura 7-36 La unión del triptófano a la proteína represora del triptófano cambia su conformación. Este cambio estructural capacita a esta proteína reguladora para unirse fuertemente a una secuencia específica de DNA y bloquear la transcripción de los genes que codifican las enzimas necesarias para la producción de triptófano (el operón *Trp*). En la figura se muestra la estructura tridimensional de esta proteína bacteriana con motivos hélice-giro-hélice, tanto unida al triptófano como libre, determinada por difracción de rayos X. La unión del triptófano aumenta la distancia entre las dos hélices de reconocimiento del homodímero y permite al represor adaptarse estrechamente al operador. (Adaptado de R. Zhang y col., *Nature* 327:591-597, 1987. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

Los activadores transcripcionales activan los genes

En el Capítulo 6 se indicó que la RNA polimerasa de *E. coli* purificada (incluyendo la subunidad σ) puede unirse a un promotor e iniciar la transcripción del DNA. Sin embargo, muchos promotores bacterianos son poco funcionales por sí mismos, ya sea porque son mal reconocidos por la RNA polimerasa o porque ésta tiene dificultades en abrir la hélice de DNA en el inicio de la transcripción. En cualquier caso estos promotores poco funcionales pueden recuperar la función normal mediante proteínas reguladoras que se unen en un lugar próximo del DNA, uniéndose con la RNA polimerasa de forma que incrementan enormemente la probabilidad de que se inicie el transcrito. Este modo de regulación se denomina **control positivo** porque la forma activa de la proteína de unión al DNA activa los genes; las proteínas reguladoras que funcionan de este modo se denominan *activadores transcripcionales* o *proteínas activadoras génicas*. En algunos casos las proteínas activadoras de genes bacterianos favorecen la unión de la RNA polimerasa al promotor aportando una superficie de contacto adicional a la polimerasa. En otros casos, se unen a la RNA polimerasa y facilitan su transición desde la conformación inicial de la polimerasa unida al DNA a la forma transcripcionalmente activa, mediante la estabilización del estado de transición de la enzima. Como en el caso de los represores, las proteínas activadoras génicas tienen que estar unidas al DNA para ejercer su efecto. De este modo, cada proteína reguladora actúa de forma selectiva y sólo controla aquellos genes que contienen una secuencia que reconoce la proteína.

Las proteínas activadoras de unión al DNA pueden incrementar la velocidad de iniciación de la transcripción hasta 1000 veces, un valor que concuerda con la interacción relativamente débil e inespecífica entre el activador y la RNA polimerasa. Por ejemplo, un cambio de 1 a 1000 en la afinidad de la RNA polimerasa hacia su promotor implica un cambio en el ΔG de ~4 kcal/mol, que se podría explicar por el efecto de unas cuantas uniones débiles no covalentes. De este modo, las proteínas activadoras génicas actúan sencillamente proporcionando algunas interacciones favorables que facilitan la atracción de la polimerasa hacia el promotor.

Como en el caso del control negativo por un represor transcripcional, un activador transcripcional puede actuar como un interruptor genético sencillo. Por ejemplo, la proteína activadora bacteriana *CAP* (***catabolite activator protein***; proteína activadora por catabolito) activa los genes que capacitan a *E. coli* a utilizar fuentes alternativas de carbono cuando la glucosa, su fuente preferida, es inaccesible. La disminución de los niveles de glucosa en el medio causa un incremento del nivel de la molécula señalizadora intracelular AMP cíclico (cAMP, *cyclic AMP*), que se une a la proteína CAP, capacitándola para unirse a secuencias de DNA específicas próximas a ciertos promotores, y de este modo activa los genes adecuados. En este caso, la expresión del gen diana es inducida o reprimida en función de que los niveles de cAMP sean altos o bajos respectivamente. En la **Figura 7–37** se resumen las diferentes maneras en que se puede controlar un gen por control positivo o negativo.

Los activadores y los represores transcripcionales tienen un diseño similar. Por ejemplo, tanto el represor del triptófano como el activador transcripcional CAP presentan un motivo hélice-giro-hélice (véase Figura 7–11) y ambos requieren la presencia de un pequeño cofactor para unirse al DNA. De hecho, se sabe que algunas proteínas bacterianas (incluyendo CAP y el represor del bacteriófago lambda) actúan como activadores o como represores en función de la posición exacta de la secuencia de DNA que reconocen en relación al promotor: si el lugar de unión a la proteína solapa el promotor, la polimerasa no puede unirse y la proteína actúa como represor (**Figura 7–38**).

Un activador transcripcional y un represor transcripcional controlan el operón *Lac*

Es posible diseñar interruptores genéticos más complicados combinando controles negativos y positivos. Por ejemplo, el *operón Lac* en *E. coli*, a diferencia del *operón Trp*, está controlado por controles transcripcionales negativos y positivos: el represor *Lac* y la proteína CAP, respectivamente. El operón *Lac* codifica las proteínas necesarias para transportar el disacárido lactosa al interior de la célula para su utilización metabólica. CAP, como ya hemos visto, capacita a la bacteria para utilizar fuentes de carbono alternativas a la glucosa, como por ejemplo la lactosa. Sin embargo, resultaría inútil para CAP inducir el operón *Lac* si no hubiera lactosa disponible; el represor *Lac* asegura que el operón *Lac* esté inactivo en ausencia de lactosa. Esta organización permite al operón *Lac* responder integrando dos señales dife-

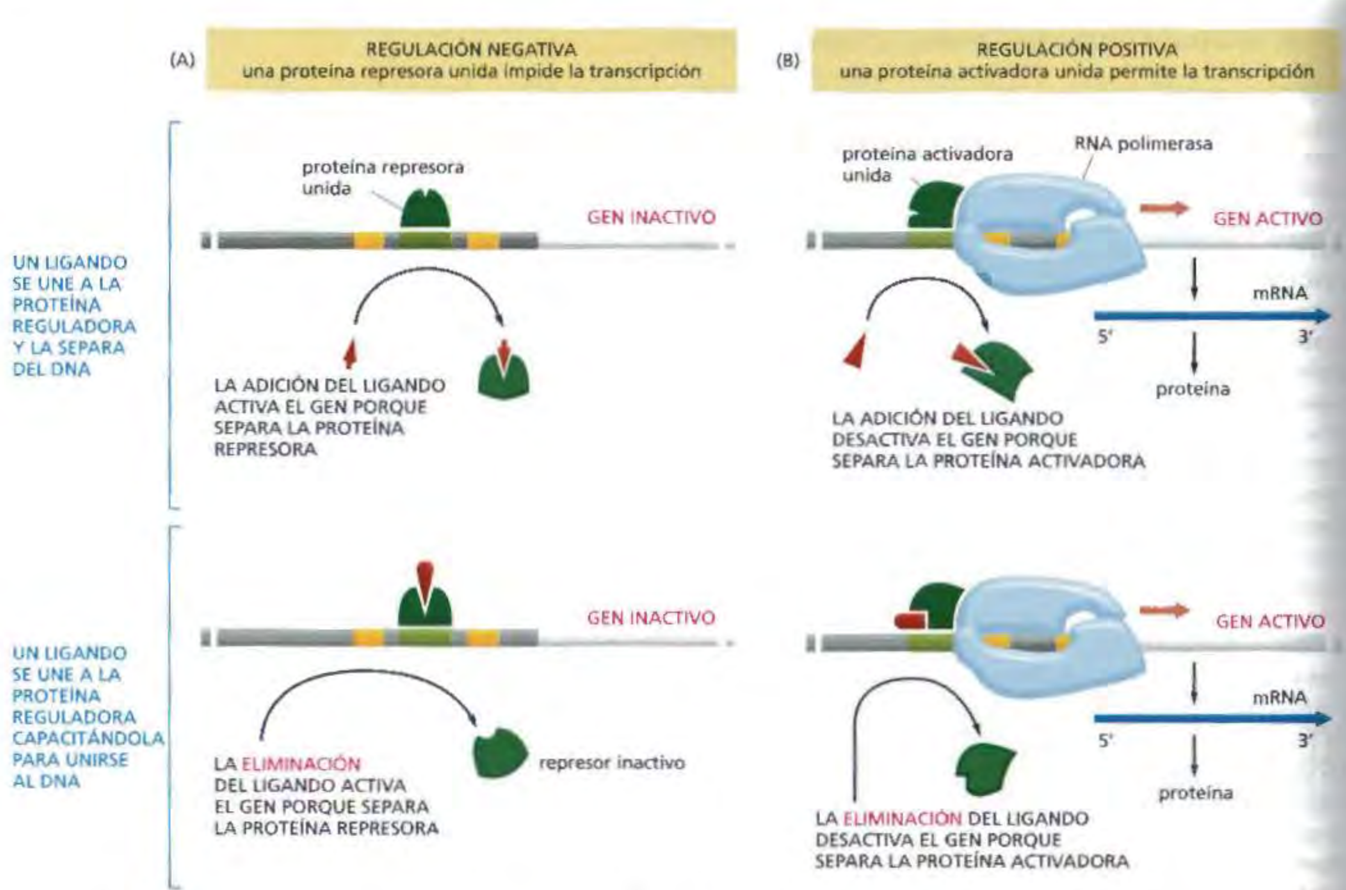


Figura 7–37 Resumen de los mecanismos que utilizan las proteínas reguladoras de genes para controlar la transcripción en los organismos procariotas. (A) Regulación negativa; (B) regulación positiva. Obsérvese que la adición de un ligando "inductor" puede activar un gen separando del DNA a una proteína represora de genes (*panel superior izquierdo*) o capacitando a una proteína activadora de genes para que se una al DNA (*panel inferior derecho*). Del mismo modo, la adición de un ligando "inhibidor" puede desactivar un gen separando del DNA a una proteína activadora de genes (*panel superior derecho*) o capacitando a una proteína represora de genes para que se una al DNA (*panel inferior izquierdo*).

rentes, de forma que sólo se activa cuando las condiciones son las adecuadas: no debe de haber glucosa pero sí lactosa. En cualquiera de las otras tres combinaciones posibles de señales, el conjunto de genes se mantiene inactivo (**Figura 7–39**).

La lógica sencilla de este interruptor genético ha atraído la atención de los biólogos desde la década de 1950. Como hemos explicado, las bases moleculares de este interruptor fueron descubiertas gracias a una combinación de genética y bioquímica y aportó los primeros detalles sobre cómo se realiza el control de la expresión de los genes.

Durante la regulación génica en bacterias tiene lugar la formación de bucles de DNA

Como se muestra en la Figura 7–39, el control del operón *Lac* es sencillo y económico, pero el estudio continuado de este y otros ejemplos de regulación génica en bacterias reveló una nueva característica de la regulación génica, conocida como la *formación de bucles de DNA*.

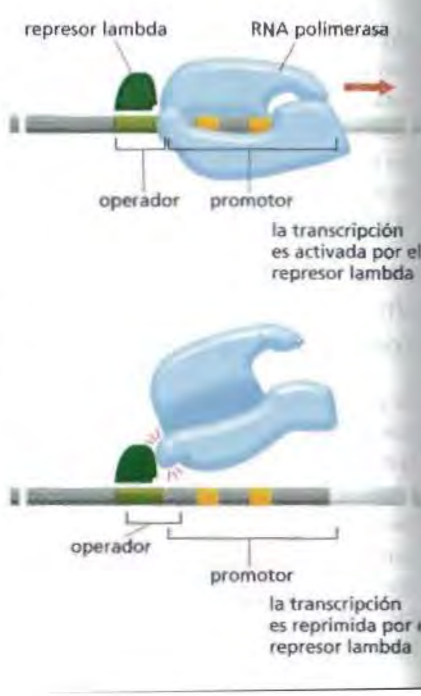


Figura 7–38 Algunas proteínas reguladoras bacterianas actúan como activadores o como represores de la transcripción dependiendo del emplazamiento concreto de sus secuencias de unión al DNA. Un ejemplo de ello es el represor del bacteriófago lambda. Para algunos genes, la proteína actúa como un activador transcripcional aportando un contacto favorable a la RNA polimerasa (*arriba*). En otros genes (*abajo*), el operador se localiza un par de bases más próximo al promotor y, en vez de ayudar a la polimerasa, compite con ella por la unión al DNA. El represor lambda reconoce a su operador mediante un motivo hélice-giro-hélice, como se muestra en la Figura 7–11.

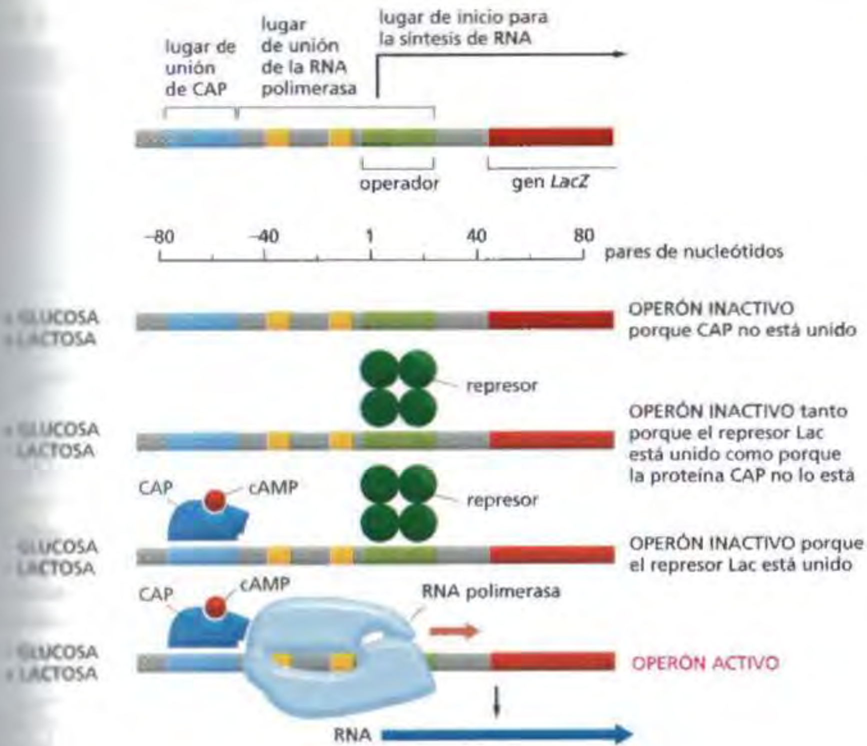


Figura 7–39 Control dual del operón *Lac*. Los niveles de glucosa y de lactosa controlan el inicio de la transcripción del operón *Lac* a través de sus efectos sobre CAP y sobre la proteína represora de *Lac*, respectivamente. *LacZ*, el primer gen del operón *Lac*, codifica la enzima β-galactosidasa, que convierte el disacárido lactosa en galactosa y glucosa. La adición de lactosa incrementa la concentración de alolactosa, un isómero de lactosa, que se une a la proteína represora y la separa del DNA. La adición de glucosa reduce el nivel de AMP cíclico; dado que la proteína represora CAP ya no está unida a AMP, la proteína CAP se libera del DNA y el operón se activa.

Esta figura resume las características esenciales del operón *Lac*, pero en realidad la situación es más compleja. Existen varios sitios de unión al represor *Lac* situados en distintas posiciones a lo largo del DNA. El que se ilustra, es el que ejerce el mayor efecto, pero los otros son necesarios para que se produzca una expresión completa (véase Figura 7–40). Además, la expresión del operón *Lac* nunca se reprime por completo. Una cierta cantidad de la enzima β-galactosidasa es necesaria para transformar la lactosa en alolactosa, permitiendo así que el represor *Lac* esté inactivado cuando se añade lactosa al medio de crecimiento.

Al principio, se pensó que el operón *Lac* contenía un único operador, pero los estudios posteriores revelaron operadores secundarios adicionales localizados cerca de él. Una sola molécula tetramérica del represor *Lac* puede unirse a dos operadores de forma simultánea, de manera que el DNA intermedio forma un bucle. La capacidad de este tipo de unión a dos operadores refuerza la interacción total del represor *Lac* con el DNA y posibilita así niveles mayores de represión en la célula (**Figura 7–40**).

La formación de bucles de DNA también permite que dos proteínas diferentes unidas a lo largo de una doble hélice de DNA se pongan en contacto una con otra. Podemos imaginar el DNA como una cuerda que ayuda a una proteína de unión al DNA a interactuar con otra, aunque quizás los sitios de unión de las dos proteínas estén separados por miles de pares de nucleótidos (**Figura 7–41**). A continuación veremos que la formación de bucles de DNA es especialmente importante en la regulación génica de los eucariotas. Sin embargo, también en bacterias desempeña papeles cruciales en muchos ejemplos de regulación génica, además del caso del operón *Lac*. Por ejemplo, la formación de bucles de DNA permite que la

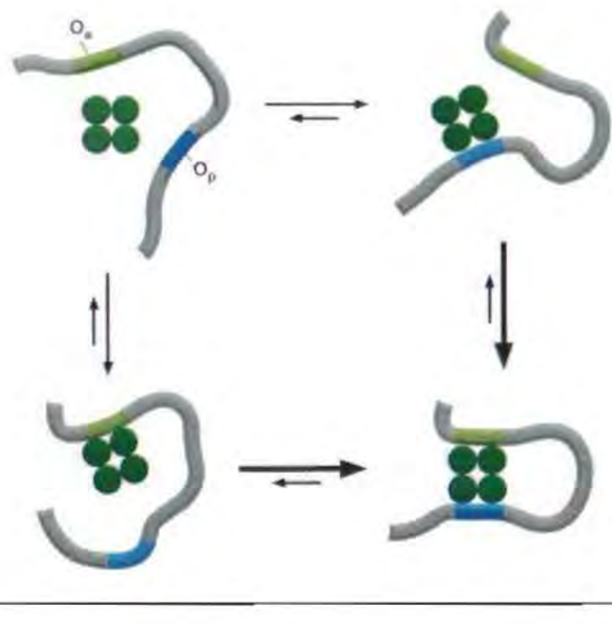


Figura 7–40 Los bucles de DNA pueden estabilizar las interacciones proteína-DNA. El represor *Lac*, un tetrámero, puede unirse simultáneamente a dos operadores. El operón *Lac* tiene en total tres operadores, pero para simplificar sólo se muestran dos de ellos: el operador principal (O_p) y el operador auxiliar (O_a). La figura muestra todos los estados posibles del represor *Lac* unido a estos dos operadores. A las concentraciones celulares de represor *Lac*, y en ausencia de lactosa, el estado inferior a la derecha es el más estable y para disociarse completamente del DNA, el represor *Lac* primero tiene que pasar por un estado intermedio en el que sólo se une a un único operador. En estos estados intermedios, la concentración local del represor es muy alta en relación a la del operador libre y se favorece la reacción hacia la forma de la doble unión frente a la reacción de disociación. De esta manera, incluso un sitio de baja afinidad (O_a) puede incrementar la ocupación de un sitio de alta afinidad (O_p) y dar niveles más altos de represión en la célula. (Adaptado de J.M.G. Vilar y S. Leibler, *J. Mol. Biol.* 331:981-989, 2003. Con la autorización de Academic Press.)

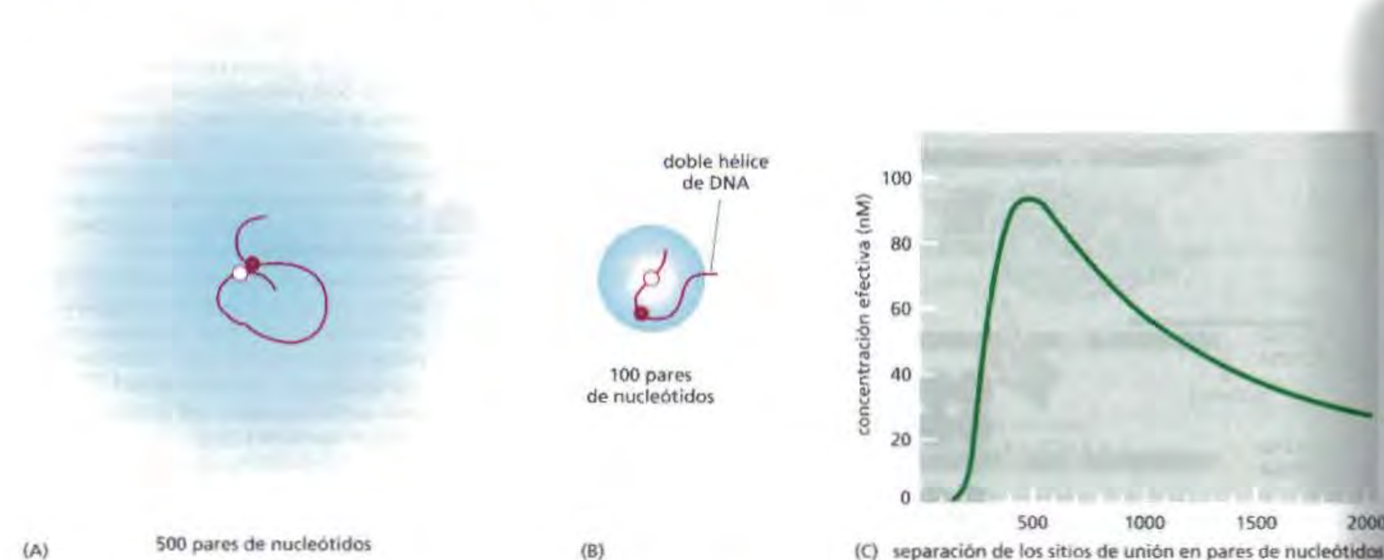


Figura 7–41 La unión de dos proteínas a lugares distantes en la doble hélice de DNA puede aumentar considerablemente la probabilidad de que ambas proteínas interactúen entre sí. (A) La unión de una proteína a la otra a través de un asa de DNA de 500 pares de nucleótidos, aumenta su frecuencia de colisión. En la figura, la intensidad del color *azul* en cada punto del espacio indica la probabilidad de que la proteína *roja* se encuentre a esa distancia respecto de la proteína *blanca*. (B) La flexibilidad del DNA es tal que una secuencia cualquiera forma un pliegue de 90°, de vértice redondeado, cada 200 pares de nucleótidos aproximadamente. Así, cuando dos proteínas están unidas por 100 pares de nucleótidos, el contacto entre esas dos proteínas queda relativamente restringido. En estos casos, la interacción proteica es mucho más fácil si los dos lugares de unión para las proteínas están separados por una distancia múltiple de 10 pares de nucleótidos, la cual sitúa a ambas proteínas sobre la misma cara de la hélice de DNA (que contiene 10 nucleótidos por vuelta) y, por lo tanto, en el interior del asa de DNA, donde es más fácil la interacción. (C) Concentración efectiva teórica de la proteína *roja* en la posición en la que está unida la proteína *blanca*, en función de la separación entre ambas. Hay estudios que sugieren que las concentraciones efectivas reales a distancias cortas son mayores que las predichas aquí. (C, cortesía de Gregory Bellomy, modificación de M.C. Mossing y M.T. Record, *Science* 233:889-892, 1986. Con la autorización de AAAS.)

proteína activadora génica bacteriana NtrC entre en contacto fácilmente con la RNA polimerasa de forma directa a pesar de que las dos proteínas están unidas al DNA a varios cientos de nucleótidos de distancia (**Figura 7–42**).

Las bacterias utilizan subunidades intercambiables de la RNA polimerasa que colaboran en el control de la transcripción génica

Ya hemos resaltado la importancia de las proteínas reguladoras que se unen a las secuencias reguladoras de DNA indicando al aparato transcripcional si se ha de iniciar o no la síntesis de

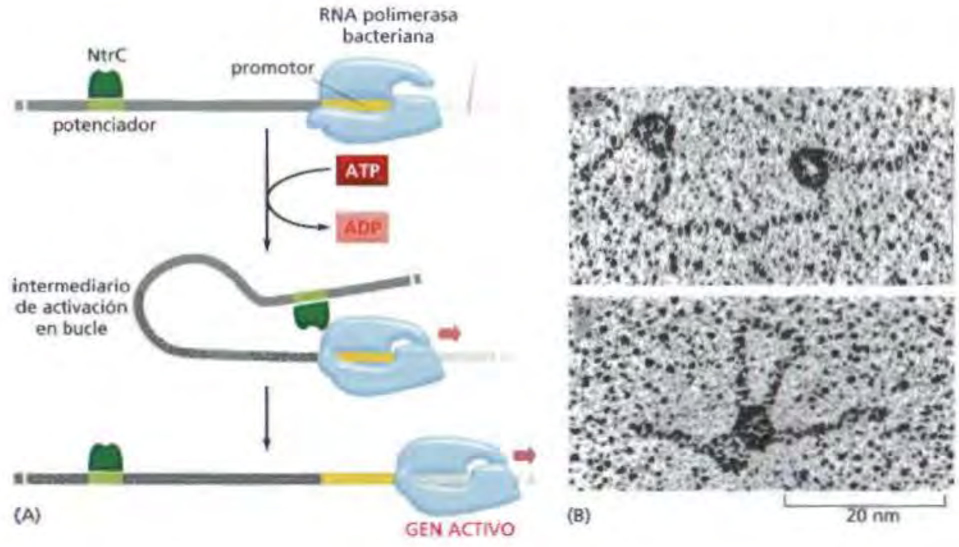


Figura 7–42 Activación génica a distancia. (A) NtrC es una proteína de regulación génica bacteriana que activa el proceso de transcripción mediante el contacto directo con la RNA polimerasa, provocando una transición entre la forma inicial de unión al DNA de la polimerasa y la forma transcripcionalmente competente (descrita en el Capítulo 6). La transición estimulada por NtrC requiere el aporte de energía por hidrólisis de ATP aunque esta condición no es frecuente en el inicio de la transcripción en bacterias. (B) En el microscopio electrónico se puede ver la interacción de NtrC con la RNA polimerasa, así como el bucle de DNA que las separa. (B, cortesía de Harrison Echols y Sydney Kustu.)

Tabla 7–2 Factores sigma de *E. coli*

FACTOR SIGMA	PROMOTORES RECONOCIDOS
[illegible]	la mayoría de genes
[illegible]	genes inducidos por choque térmico
[illegible]	genes para fase estacionaria y respuesta al estrés
[illegible]	genes implicados en movilidad y quimiotaxis
[illegible]	genes para el metabolismo del nitrógeno
[illegible]	genes relacionados con proteínas mal plegadas en el periplasma

Las denominaciones de los factores sigma hacen referencia a sus pesos moleculares aproximados en kilodalton.

la cadena de RNA. Aunque éste es el principal mecanismo de control del inicio de la transcripción tanto en eucariotas como en procariotas, algunas bacterias y sus virus utilizan una estrategia adicional basada en subunidades intercambiables de la RNA polimerasa. Como se describió ya en el Capítulo 6, la subunidad sigma (σ) es necesaria para que la RNA polimerasa reconozca un promotor. Muchas bacterias producen diferentes subunidades sigma, cada una de las cuales interactúa con el núcleo de la RNA polimerasa y la dirige específicamente hacia diferentes conjuntos de promotores (**Tabla 7–2**). Esta estrategia permite desactivar un gran grupo de genes y activar otro, simplemente reemplazando una subunidad sigma por otra; la estrategia es eficiente ya que evita la necesidad de actuar sobre los genes uno a uno y es utilizada con frecuencia por los virus de forma subversiva aprovechando la polimerasa del huésped y activando conjuntos de genes víricos de forma rápida y secuencial (**Figura 7–43**).

Algunos interruptores complejos han evolucionado controlando la transcripción génica en eucariotas

Bacterias y eucariotas comparten muchos principios de regulación génica, incluyendo el papel clave que tienen las proteínas de regulación génica que se unen estrechamente a segmentos pequeños de DNA, la importancia de las interacciones débiles proteína-proteína en la activación génica y la versatilidad que proporciona la formación de bucles. Sin embargo, en comparación, la regulación génica en eucariotas implica muchas más proteínas, segmentos más largos de DNA y a menudo parece extraordinariamente compleja. Este aumento de la complejidad proporciona una importante ventaja a la célula eucariota. Como hemos visto, en las bacterias los interruptores genéticos normalmente responden a una o unas cuantas señales. En cambio, en eucariotas es común que docenas de señales converjan en un único promotor y que la maquinaria de transcripción integre todas estas señales diferentes produciendo el nivel adecuado de mRNA. Antes de iniciar la descripción de la regulación génica en eucariotas, es necesario resumir las características principales que la diferencian de la regulación génica en bacterias.

- Como se ha descrito en el Capítulo 6, la RNA polimerasa II, que transcribe todos los genes codificantes de proteínas, requiere cinco factores de transcripción generales (27 subunidades en total, véase Tabla 6–3, p. 341), mientras que la RNA polimerasa bacteriana necesita un solo factor de transcripción general, la subunidad sigma. El

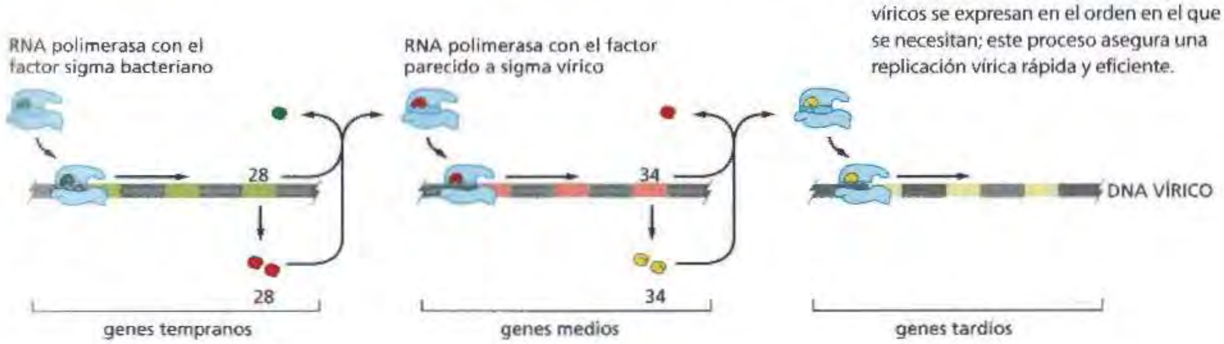


Figura 7–43 Subunidades intercambiables de la RNA polimerasa como estrategia para controlar la expresión génica en un virus bacteriano. El virus bacteriano SPO1, que infecta la bacteria *B. subtilis*, utiliza la polimerasa bacteriana para transcribir sus genes tempranos inmediatamente después de que el DNA vírico entre en la célula. Uno de los genes tempranos, denominado 28, codifica un factor parecido a sigma que se une a la RNA polimerasa y desplaza el factor sigma bacteriano. Esta nueva forma de polimerasa inicia específicamente la transcripción de los genes "medios" de SPO1. Uno de los genes medios codifica un segundo factor parecido a sigma, denominado 34, que desplaza el producto de 28 y dirige la RNA polimerasa a que transcriba los genes "tardíos". Este último conjunto de genes produce proteínas que empaquetan el cromosoma vírico dentro de la cápside del virus y lisan la célula. Con esta estrategia, distintos conjuntos de genes víricos se expresan en el orden en el que se necesitan; este proceso asegura una replicación vírica rápida y eficiente.

proceso de ensamblaje de los factores de transcripción en un promotor eucariota proporciona varias etapas en las que la célula puede aumentar o disminuir la velocidad de inicio de la transcripción como respuesta a proteínas de regulación génica.

- Las células eucariotas no tienen operones –conjuntos de genes relacionados que son transcritos como una sola unidad– y por lo tanto tienen que regular cada gen de forma individual.
- Cada gen bacteriano está controlado generalmente por una o unas cuantas proteínas de regulación génica, pero en eucariotas es habitual que los genes estén controlados por muchas proteínas reguladoras diferentes (a veces centenares de ellas). Como veremos, esta complejidad es posible porque muchas proteínas eucariotas reguladoras de genes pueden actuar a grandes distancias (decenas de miles de pares nucleotídicos) a lo largo del DNA, permitiendo que un número casi ilimitado de estas proteínas influyan en la regulación de un solo gen.
- Un componente principal de la regulación en eucariotas es el *Mediador*, un complejo de 24 subunidades que actúa como intermediario entre las proteínas de regulación génica y la RNA polimerasa (véase Figura 6–19). El Mediador proporciona una extensa área de contacto para las proteínas reguladoras de genes comparada con la que proporciona la RNA polimerasa sola, como en las bacterias.
- El empaquetamiento del DNA eucariota en forma de cromatina genera muchas posibilidades de regulación transcripcional inexistentes en las bacterias.

En el Capítulo 6 se han descrito los factores generales de transcripción de la RNA polimerasa II (véase pp. 340-343); todo seguido nos centraremos en las cuatro últimas de estas características y en cómo se utilizan en el control de la expresión de genes eucariotas.

Una región de control eucariota está formada por un promotor y por las secuencias de DNA reguladoras

Las proteínas reguladoras típicas controlan la transcripción incluso cuando se encuentran unidas al DNA lejos del promotor, por lo que las secuencias de DNA que controlan la expresión de un gen pueden estar dispersas sobre largas extensiones de DNA. El término **región de control del gen** indica la región de DNA implicada en la regulación e iniciación de la transcripción de un gen, incluido el **promotor**, en que se ensamblan los factores generales de transcripción y la polimerasa, más todas las **secuencias reguladoras** a las que se unen las proteínas reguladoras controlando la velocidad de este proceso de ensamblaje sobre el promotor (**Figura 7–44**). En animales y en plantas no es inusual encontrar las secuencias reguladoras de un gen dispersas a distancias tan grandes como 50.000 pares de nucleótidos. La mayor parte de este DNA actúa como "espaciador", secuencias de DNA que las proteínas de regulación génica no reconocen directamente, pero que pueden proporcionar la flexibilidad necesaria para una formación eficiente del bucle de DNA. En este contexto, cabe tener en cuenta que, al igual que otras regiones de los cromosomas eucariotas, la mayor parte del DNA de las regiones de control de genes se encuentra empaquetado mediante nucleosomas y otros niveles de mayor orden de complejidad de la cromatina, lo cual compacta su longitud y altera sus propiedades.

En este capítulo se utiliza el término **gen** de forma general para indicar el DNA que se transcribe a RNA (véase Figura 7–44). No obstante, la idea clásica de gen incluye también la región de control, lo cual hace que la mayoría de genes eucariotas sean bastante más largos. El descubrimiento de la maduración alternativa ha complicado aún más la definición de gen –aspecto ya descrito brevemente en el Capítulo 6 y al cual volveremos más adelante en este mismo capítulo.

Las proteínas reguladoras de genes permiten que los genes de un organismo sean activados o desactivados individualmente. En contraste con el pequeño número de factores generales de transcripción, que son proteínas abundantes y se ensamblan en los promotores de todos los genes transcritos por la RNA polimerasa II, existen miles de diferentes proteínas reguladoras. Por ejemplo, de los aproximadamente 25.000 genes humanos, se estima que un 8% (~2000 genes) codifican proteínas reguladoras de genes. Muchas de ellas reconocen secuencias de DNA utilizando uno de los motivos estructurales de unión a DNA descritos. No es sorprendente que la célula eucariota regule cada uno de sus numerosos genes de un modo único. Dado el gran número de genes de las células eucariotas y la complejidad de su regulación, ha sido difícil formular reglas sencillas para la regulación génica que se puedan

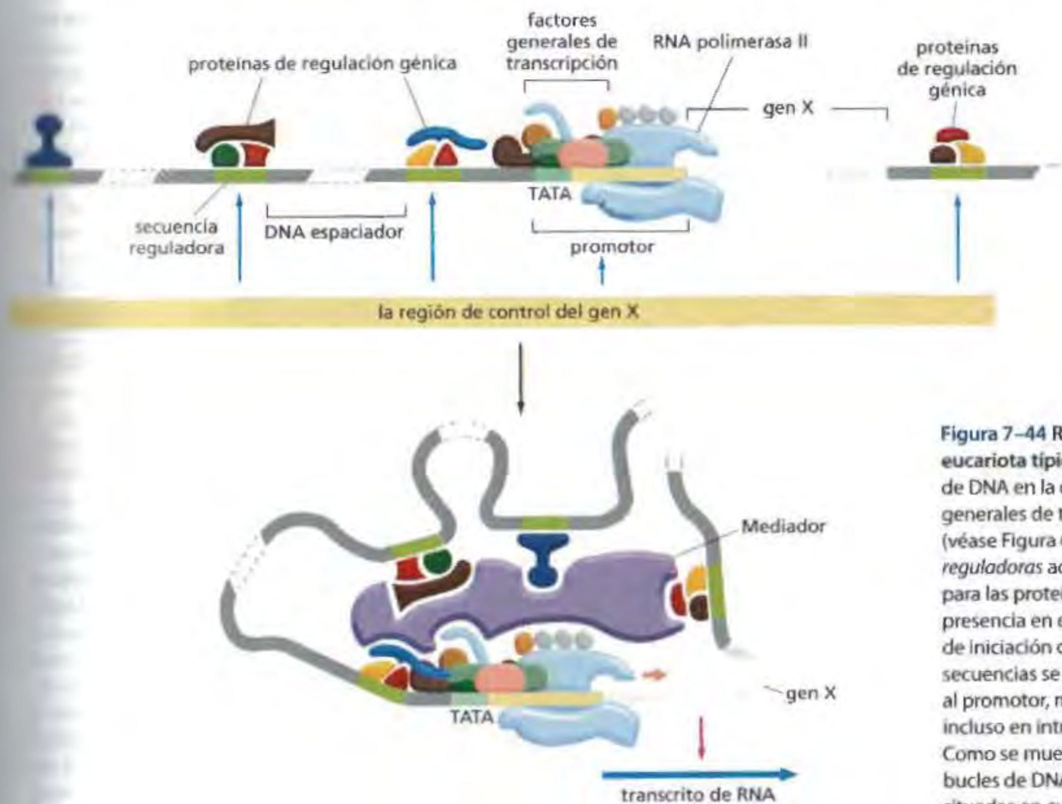


Figura 7–44 Región de control de un gen eucariota típico. El *promotor* es la secuencia de DNA en la que se ensamblan los factores generales de transcripción y la polimerasa (véase Figura 6–16). Las *secuencias reguladoras* actúan como lugares de unión para las proteínas reguladoras, cuya presencia en el DNA afecta a la velocidad de iniciación de la transcripción. Estas secuencias se pueden encontrar adyacentes al promotor, muy lejanas corriente arriba, o incluso en intrones o corriente abajo del gen. Como se muestra en el panel inferior, los bucles de DNA permiten que las proteínas situadas en cualquiera de estas posiciones interactúen con las proteínas que se ensamblan en el promotor. Muchas proteínas de regulación génica actúan a través del Mediador, mientras que otras modifican los factores generales de transcripción y la RNA polimerasa directamente. A pesar de que aquí no se muestra, muchas proteínas reguladoras también modifican la estructura de la cromatina de la región control del DNA de forma que afectan a la iniciación de la transcripción de manera indirecta (véase Figura 4–45). Tal como se indica en el texto y para simplificar, cuando nos referimos al "gen X" nos referimos a la secuencia codificante dentro del gen.

Mientras que el Mediador y los factores generales de transcripción son los mismos para todos los genes transcritos por la RNA polimerasa II, las proteínas reguladoras y las posiciones de sus secuencias de unión en relación con el promotor son distintas para cada gen.

...a cada caso. No obstante, podemos hacer algunas generalizaciones acerca de cómo las proteínas reguladoras de genes, una vez unidas a regiones de control del DNA, ponen en marcha la serie de eventos que conducen a la activación o a la represión génica.

Las proteínas activadoras de genes eucariotas facilitan el ensamblaje de la RNA polimerasa y de los factores generales de transcripción en el lugar de inicio de la transcripción

Inicialmente, los sitios de DNA a los que se unen las proteínas activadoras de genes eucariotas fueron denominados *potenciadores* (*enhancers*) porque su presencia "potenciaba" la velocidad de inicio de la transcripción. Fue una sorpresa descubrir que estas proteínas activadoras génicas podían estar situadas a decenas de miles de pares nucleotídicos de distancia del promotor, pero, como hemos visto, la formación de bucles de DNA proporciona al menos una explicación para este descubrimiento inicialmente desconcertante.

Las proteínas activadoras de genes más sencillas tienen un diseño modular que consiste en dos dominios diferentes. Habitualmente uno de ellos contiene uno de los motivos estructurales capaces de reconocer una secuencia específica en el DNA que hemos descrito previamente. El segundo dominio –llamado algunas veces *dominio de activación*– acelera la frecuencia de inicio de transcripción. Este tipo de diseño modular fue demostrado mediante experimentos en los cuales utilizando técnicas de ingeniería genética se generaron proteínas quiméricas que contenían el dominio de activación de una proteína fusionado con el dominio de unión a DNA de otra proteína diferente (**Figura 7–45**).

Cuando las proteínas activadoras de genes se han unido al DNA ¿de qué forma aumentan la velocidad de transcripción? Como veremos a continuación, existen distintos mecanismos para ello y, en muchos casos, estos diferentes mecanismos actúan de forma concertada sobre un mismo promotor. No obstante, y con independencia del mecanismo bioquímico preciso, la función final de las proteínas activadoras es atraer, ubicar y modificar los factores generales de transcripción, el Mediador y la RNA polimerasa II de forma que pueda iniciarse la transcripción. Este proceso lo efectúan tanto por acción directa sobre estos elementos como, de forma indirecta, mediante modificaciones de la estructura de la cromatina en la zona del promotor.

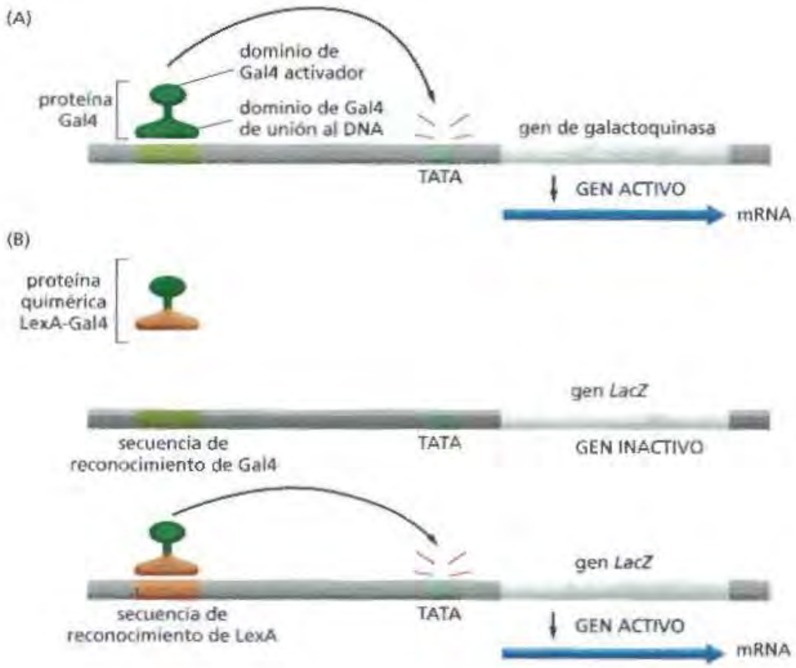


Figura 7–45 Estructura modular de una proteína de activación génica. Esquema de un experimento que revela la presencia de dominios independientes de unión a DNA y de activación de la transcripción en la proteína activadora génica Gal4 de levaduras. Es posible reconstituir un activador funcional a partir de una porción del extremo C-terminal de la proteína Gal4 de levadura fusionándolo, mediante técnicas de ingeniería genética, con el dominio de unión a DNA de una proteína reguladora bacteriana (la proteína LexA). Cuando la proteína híbrida resultante, levadura-bacteria, se sintetiza en células de levadura, activa la transcripción de los genes de levadura que presenten insertada en su proximidad la secuencia de reconocimiento de la proteína bacteriana. (A) Normalmente Gal4 es responsable de activar la transcripción de los genes de levadura que codifican las enzimas que transforman galactosa en glucosa. (B) Una proteína de regulación génica quimérica, producida mediante técnicas de ingeniería genética, requiere una secuencia de reconocimiento de LexA para activar la transcripción. En el experimento que se muestra, la región de control de uno de los genes controlados por LexA se fusionó con el gen *LacZ* de *E. coli*, que codifica la enzima β-galactosidasa (véase Figura 7–39). β-galactosidasa es una enzima muy fácil de detectar y, por ello, es un sistema adecuado para seguir los niveles de expresión determinados por una región de control génico. Tal como se utiliza en este experimento, se dice que *LacZ* sirve como *gen reportero*, ya que "informa" de la actividad de una región de control génico.

Algunas proteínas activadoras se unen de forma directa a uno o más de los factores generales de transcripción, acelerando su ensamblaje a un promotor que esté unido a este activador a través del DNA. Otros interaccionan con el Mediador y lo llevan hacia el DNA, dónde puede facilitar el ensamblaje de la RNA polimerasa y de los factores generales de transcripción en el promotor (véase la Figura 7–44). En este sentido, los activadores eucariotas se parecen a los bacterianos en su capacidad de reclutar a la RNA polimerasa hacia lugares específicos del DNA para que pueda empezar a transcribir.

Las proteínas activadoras de genes eucariotas también modifican la estructura local de la cromatina

Parece que los factores generales de transcripción, el Mediador y la RNA polimerasa son incapaces de ensamblarse por sí mismos sobre un promotor empaquetado en nucleosomas estándar. De hecho, se ha propuesto que dicho empaquetamiento puede haber evolucionado evitando una transcripción "imprecisa". Además de sus acciones directas sobre el ensamblaje de la maquinaria de transcripción sobre el promotor, las proteínas activadoras de genes también favorecen el inicio de la transcripción mediante cambios en la estructura de la cromatina en las regiones reguladoras y en los promotores de los genes.

Como se describió en el Capítulo 4, cuatro de los sistemas más importantes para modificar localmente la cromatina son las modificaciones covalentes de las histonas y la remodelación, la eliminación y la sustitución de los nucleosomas. Las proteínas activadoras de genes utilizan estos cuatro mecanismos atrayendo las enzimas modificadoras de histonas, los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP y las chaperonas de histonas, las cuales alteran la estructura de la cromatina de los promotores sobre los que actúan (**Figura 7–46**). En términos generales parece que estas alteraciones locales de la estructura de la cromatina hacen que el DNA sea más accesible y facilitan así el ensamblaje de los factores generales de transcripción, del Mediador y de la RNA polimerasa sobre el promotor. Además, la modificación local de la cromatina permite la unión de proteínas reguladoras de genes a la región de control del gen. Sin embargo, probablemente el papel más importante de las modificaciones covalentes de las histonas en la transcripción no es el de cambiar directamente la estructura de la cromatina sino que, como se describe en el Capítulo 4, estas modificaciones proporcionan interacciones favorables para la unión de un gran grupo de proteínas que leen un "código de histonas". Para la iniciación de la transcripción estas proteínas incluyen otras enzimas modificadoras de histonas (complejos de lectura/escritura), complejos remodeladores de la cromatina y al menos uno de los factores generales de transcripción (**Figura 7–47**).

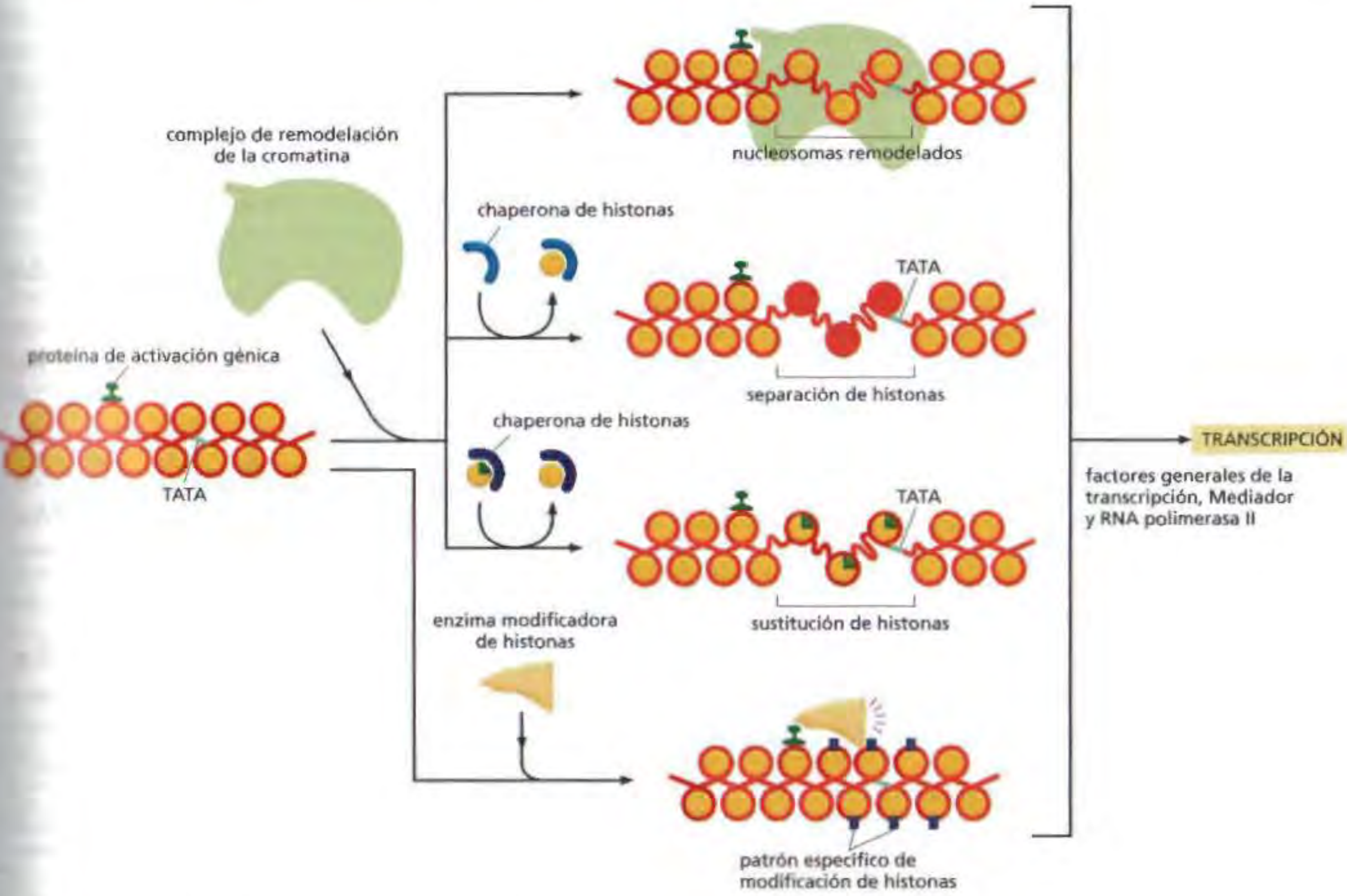


Figura 7–46 Cuatro maneras a través de las que las proteínas activadoras eucariotas pueden dirigir las alteraciones locales de la estructura de la cromatina estimulando la iniciación de la transcripción. Pese a que se muestran como vías separadas, a menudo estos mecanismos trabajan juntos durante la activación de un gen. Por ejemplo, la acetilación previa de las histonas facilita que las chaperonas las separen de los nucleosomas. En la Figura 4–44 se enumeran algunos patrones de modificación de las histonas que facilitan el inicio del proceso de transcripción y en la Figura 7–47 se da un ejemplo específico. La remodelación de nucleosomas y la separación de histonas favorece la iniciación de la transcripción incrementando la accesibilidad del DNA y, por lo tanto, facilitando la unión del Mediador, la RNA polimerasa y los factores generales de transcripción, así como proteínas activadoras adicionales. La iniciación de la transcripción y la formación de una estructura compacta de la cromatina, pueden verse como reacciones bioquímicas de ensamblaje competitivas; las enzimas que aumentan –incluso de forma transitoria– la accesibilidad del DNA en la cromatina, tenderán a favorecer el inicio de la transcripción.

Las alteraciones de la estructura de la cromatina que se producen durante la iniciación de la transcripción pueden persistir durante periodos de tiempo distintos. En algunos casos, en cuanto la proteína de regulación génica se disocia del DNA, las modificaciones de la cromatina revierten con rapidez devolviendo al gen a su estado preactivado. Esta reversión es muy importante para aquellos genes que la célula debe activar y desactivar rápidamente en respuesta a señales externas, como en el caso de la hormona glucocorticoide de la que hemos tratado en este capítulo. Sin embargo, en otros casos parece que la estructura modificada de la cromatina persiste incluso después de que la proteína reguladora que indujo el cambio se disocie del DNA. En principio, esta memoria puede extenderse a la siguiente generación de células porque, como se ha descrito en el Capítulo 4, la estructura de la cromatina puede autorrenovarse (véase Figura 4–52). Es interesante considerar la posibilidad de que diferentes modificaciones de las histonas puedan persistir durante tiempos distintos y proporcionar a la célula un mecanismo de memoria de los patrones de expresión génica a larga, medio y corto plazo.

Un tipo especial de modificación de la cromatina se produce a medida que la RNA polimerasa II transcribe un gen. En la mayoría de los casos, los nucleosomas que se encuentran justo delante de la polimerasa son acetilados por complejos de escritura de esta enzima, retirados por chaperonas histonas y depositados detrás de la polimerasa en movimiento. Entonces estos nucleosomas son desacetilados y metilados rápidamente, también por complejos de lectura/escritura de la polimerasa, que van dejando atrás nucleosomas muy resistentes a la transcripción. Aunque este importante proceso pueda parecer totalmente ilógico, es probable que se desarrollara para evitar una falsa reiniciación de la transcripción detrás de una polimerasa en movimiento, que lo que hace en esencia es despejar un camino a través de la cromatina. Más adelante en este capítulo, cuando describamos el *RNA de interferencia*, se harán especialmente obvios los peligros potenciales para la célula de una transcripción inadecuada.

Acabamos de ver que las proteínas activadoras de genes pueden influir en gran medida en la estructura de la cromatina. Sin embargo, incluso antes de que entren en juego estas proteínas activadoras, muchos genes son "preparados" para ser activados rápidamente. Por ejemplo, las regiones reguladoras de muchos genes están "marcadas" por una región corta,

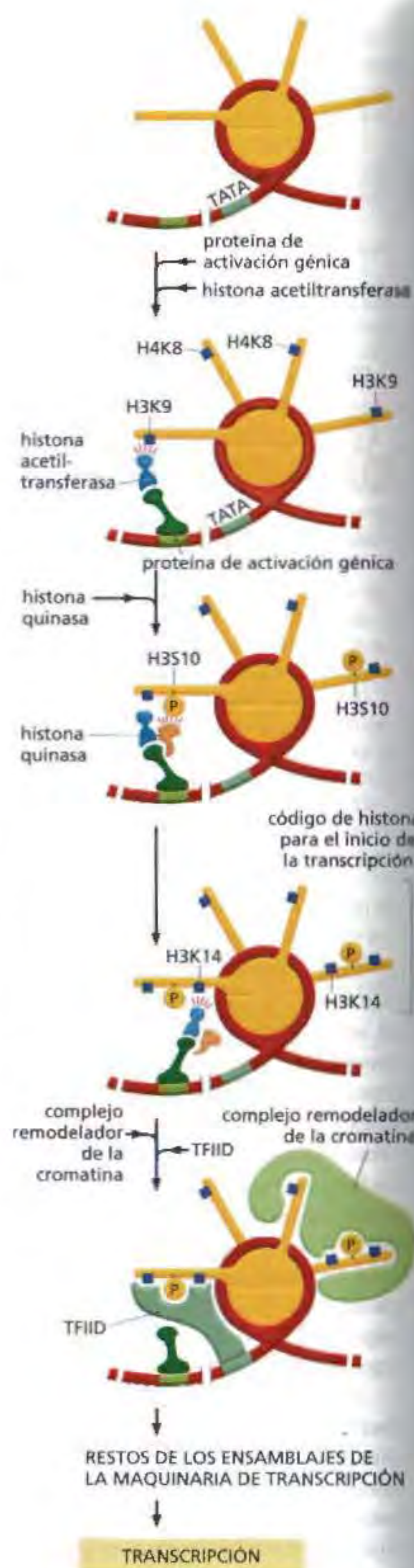


Figura 7-47 Escritura y lectura del código de histonas durante el inicio de la transcripción. En este ejemplo, tomado del promotor génico del interferón humano, una proteína de activación génica se une a DNA empaquetado dentro de la cromatina y atrae una histona acetiltransferasa para acetilar la lisina 9 de la histona H4. Después, una quinasa de histonas, atraída por la proteína activadora, fosforila la serina 10 de la histona H3, pero sólo puede hacerlo si la lisina 9 ha sido acetilada. Entonces la modificación de la serina indica a la acetiltransferasa que acetile la posición K14 de la histona H3. En este punto ha quedado escrito el código de histonas necesario para que se inicie la transcripción mediante la unión de la proteína activadora. Obsérvese que la escritura es secuencial, cada modificación de histonas depende de la modificación anterior.

La lectura final del código se lleva a cabo cuando se unen el factor general de transcripción TFIID y el complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF, facilitando ambos los pasos siguientes de la iniciación de la transcripción. TFIID y SWI/SNF reconocen colas de histonas acetiladas mediante un *bromodominio*, un dominio proteico especializado en leer este tipo de marca particular en las histonas; una subunidad de cada complejo proteico contiene un bromodominio. (Adaptado de T. Agalioti, G. Chen y D. Thanos, *Cell* 111:381-392, 2002. Con la autorización de Elsevier.)

libre de nucleosomas y flanqueada por nucleosomas que contienen la variante histónica H2AZ. Esta disposición, que viene especificada por la secuencia de DNA, ofrece a las proteínas de regulación génica libre acceso hacia la región libre de nucleosomas; además, parece que los nucleosomas que contienen la variante H2AZ son fáciles de desensamblar, facilitando aún más la iniciación de la transcripción.

Las proteínas activadoras de genes actúan de forma sinérgica

Las proteínas activadoras de genes eucariotas pueden influir sobre distintas etapas del inicio de la transcripción. En general, cuando distintos factores actúan en conjunto incrementando una velocidad de reacción, el efecto conjunto no es simplemente la suma de los incrementos que produce cada factor de forma individual, sino su producto. Por ejemplo, si el factor A disminuye el umbral de energía libre para una reacción hasta un cierto nivel y aumenta la velocidad de reacción 100 veces, y el factor B, actuando sobre otro aspecto de la reacción ejerce un efecto similar, A y B actuando en paralelo disminuirán el umbral en el doble y, por tanto, aumentarán la velocidad de reacción 10.000 veces. Aunque A y B actúen simplemente atrayendo la misma proteína, la afinidad de esta proteína hacia el sitio de reacción se incrementará de forma geométrica. Así, a menudo las proteínas activadoras de genes muestran *sinergia transcripcional*, mediante la que varias proteínas activadoras que actúan de forma conjunta producen una velocidad de transcripción mucho mayor que la que producirían los activadores actuando por separado (**Figura 7-48**). No resulta difícil imaginar de qué forma actúan conjuntamente varias proteínas reguladoras de genes, cada una de las

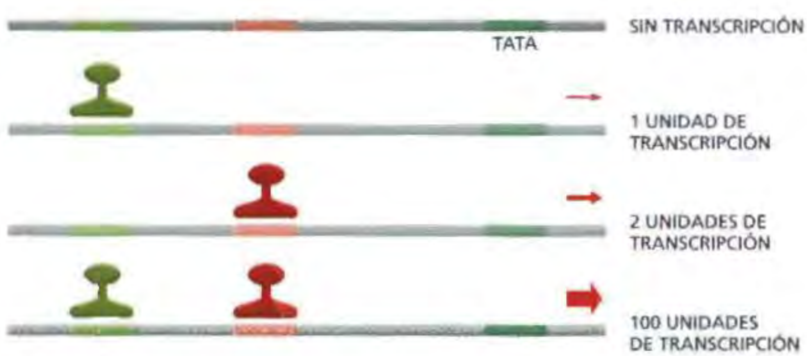


Figura 7-48 Sinergia transcripcional. Este experimento compara la tasa de transcripción producida por tres regiones reguladoras construidas de forma experimental en células eucariotas y pone de manifiesto la sinergia transcripcional, es decir, un efecto mayor que la suma de los efectos individuales de los diferentes activadores. Normalmente se observa sinergia transcripcional entre distintas proteínas activadoras de un mismo organismo e incluso entre proteínas activadoras de especies de eucariotas distintas cuando se las introduce experimentalmente en una misma célula. Esta última observación refleja el elevado grado de conservación de la elaborada maquinaria responsable del inicio de la transcripción en eucariotas.

que se une a distintas secuencias reguladoras del DNA, controlando la velocidad final de transcripción de un gen eucariota.

Las proteínas activadoras de genes pueden afectar distintas etapas en la vía de activación transcripcional, por lo que debe considerarse si estas etapas se dan siempre en un orden establecido. Por ejemplo, ¿la remodelación de la cromatina precede siempre a la modificación de histonas, como en el ejemplo de la Figura 7–47? ¿El Mediador actúa antes o después que la RNA polimerasa? La respuesta a estas cuestiones parece ser distinta para los distintos genes e incluso para un mismo gen bajo la influencia de distintas proteínas reguladoras (**Figura 7–49**). Cualesquiera que sean los mecanismos concretos y el orden en que se produzcan, una proteína reguladora de genes ha de unirse al DNA para afectar directa o indirectamente la transcripción de su gen diana; la velocidad de transcripción dependerá en última instancia del conjunto de proteínas reguladoras unidas corriente arriba y corriente abajo del inicio de transcripción.

Las proteínas represoras de genes eucariotas pueden inhibir la transcripción de diferentes formas

Como ocurre en las bacterias, los organismos eucariotas regulan la transcripción de sus genes utilizando tanto proteínas activadoras como **proteínas represoras de genes**. Sin embargo, debido a las diferencias en el inicio de la transcripción de los eucariotas y de las bacterias, los represores eucariotas tienen muchos más mecanismos posibles de acción. Hemos visto en el Capítulo 4 que grandes regiones del genoma pueden desactivarse mediante el empaquetamiento del DNA formando la heterocromatina. Sin embargo, los genes no suelen estar agrupados en el genoma según su función, por lo que esta estrategia no es útil para la mayoría de ejemplos de regulación génica. En lugar de esto, la mayoría de represores tienen que actuar gen a gen. A diferencia de los represores bacterianos, la mayoría de represores de los organismos eucariotas no compiten directamente con la RNA polimerasa para su acceso al DNA, sino que utilizan mecanismos distintos, algunos de los cuales se ilustran en la **Figura 7–50**. Como las proteínas activadoras de genes, muchas proteínas represoras eucariotas actúan sobre un determinado gen diana a través de más de un mecanismo, dando lugar a una represión eficaz y potente.

La represión génica es sobre todo importante para animales y plantas, cuyo crecimiento depende de programas de desarrollo minuciosos y complejos. La expresión errónea de un solo gen en un momento crítico puede tener consecuencias desastrosas para el individuo. Por esta razón, muchos de los genes que codifican las proteínas reguladoras del desarrollo más importantes se mantienen fuertemente reprimidos cuando no son necesarios.

Las proteínas reguladoras de genes de células eucariotas frecuentemente se unen de forma cooperativa al DNA

Cuando las proteínas activadoras y represoras eucariotas se unen a secuencias específicas de DNA, ponen en marcha una compleja serie de acontecimientos que culmina con la iniciación de la transcripción o, por el contrario, con su represión. Sin embargo, estas proteínas no suelen reconocer el DNA como polipéptidos individuales. En realidad, en las células eucariotas la unión eficiente al DNA requiere normalmente que varias proteínas de unión al DNA específicas de secuencia actúen de forma conjunta. Por ejemplo, dos proteínas reguladoras de genes, que presenten una baja afinidad una por la otra, pueden cooperar entre sí uniéndose a una secuencia de DNA, secuencia a la que son incapaces de unirse por sí mismas independientemente. En un caso bien estudiado, un dímero proteico cuando está unido al DNA expone una superficie que es reconocida por una tercera proteína portadora de un dominio de activación que activa la transcripción. Este ejemplo ilustra un principio general importante: algunas interacciones proteína-proteína que son demasiado débiles para formar complejos en solución, pueden hacerlo sobre DNA, de forma que la secuencia de DNA actúa como un centro de "cristalización" para el ensamblaje de diversos complejos de proteínas.

Como se muestra en la **Figura 7–51**, una proteína reguladora de genes determinada puede participar en más de un tipo de complejo regulador. Una proteína puede actuar en un caso como parte de un complejo que activa la transcripción y, en otro caso, como parte de un complejo que la inhibe. Así, cada una de las proteínas reguladoras eucariotas no tiene



Figura 7–49 Orden de acontecimientos que dan lugar al inicio de la transcripción de un gen determinado. En este ejemplo de la levadura *S. cerevisiae* estudiado con precisión, las etapas hacia el inicio de la transcripción se producen en un orden concreto; sin embargo, este orden es diferente en genes diferentes. Por ejemplo, en otro gen la modificación de histonas ocurre primero, a continuación se produce el reclutamiento de la RNA polimerasa y después el reclutamiento del complejo de remodelación de la cromatina. La Figura 7–47 muestra otro orden posible de los acontecimientos.

necesariamente una función activadora o represora sino que actúan como partes reguladoras que se utilizan para construir complejos cuya función final dependerá del ensamblaje de todos sus componentes. Este ensamblaje final dependerá a su vez tanto de la disposición de secuencias en la región de control del DNA como de las proteínas reguladoras concretas presentes de forma activa en la célula. Por lo tanto, cada gen eucariota está regulado por un "comité" de proteínas, cada una de las cuales tiene que estar presente para que el gen se exprese al nivel adecuado.

En algunos casos, la secuencia concreta de DNA a la que se unen directamente las proteínas reguladoras puede afectar la conformación de esta proteína y modificar así su actividad transcripcional. Por ejemplo, cuando el receptor de hormonas esteroideas se une a una secuencia de DNA determinada, interactúa con un correpresor y da lugar a una inhibición de la transcripción. Si se une a una secuencia de DNA ligeramente distinta, adopta una conformación distinta e interactúa con un coactivador, dando lugar a un estímulo de la transcripción.

En general, unas cuantas secuencias de nucleótidos relativamente cortas determinan el ensamblaje sobre el DNA de un grupo de proteínas reguladoras (véase Figura 7–51). Sin embargo, en algunos casos extremos de regulación por comité se forma una estructura más

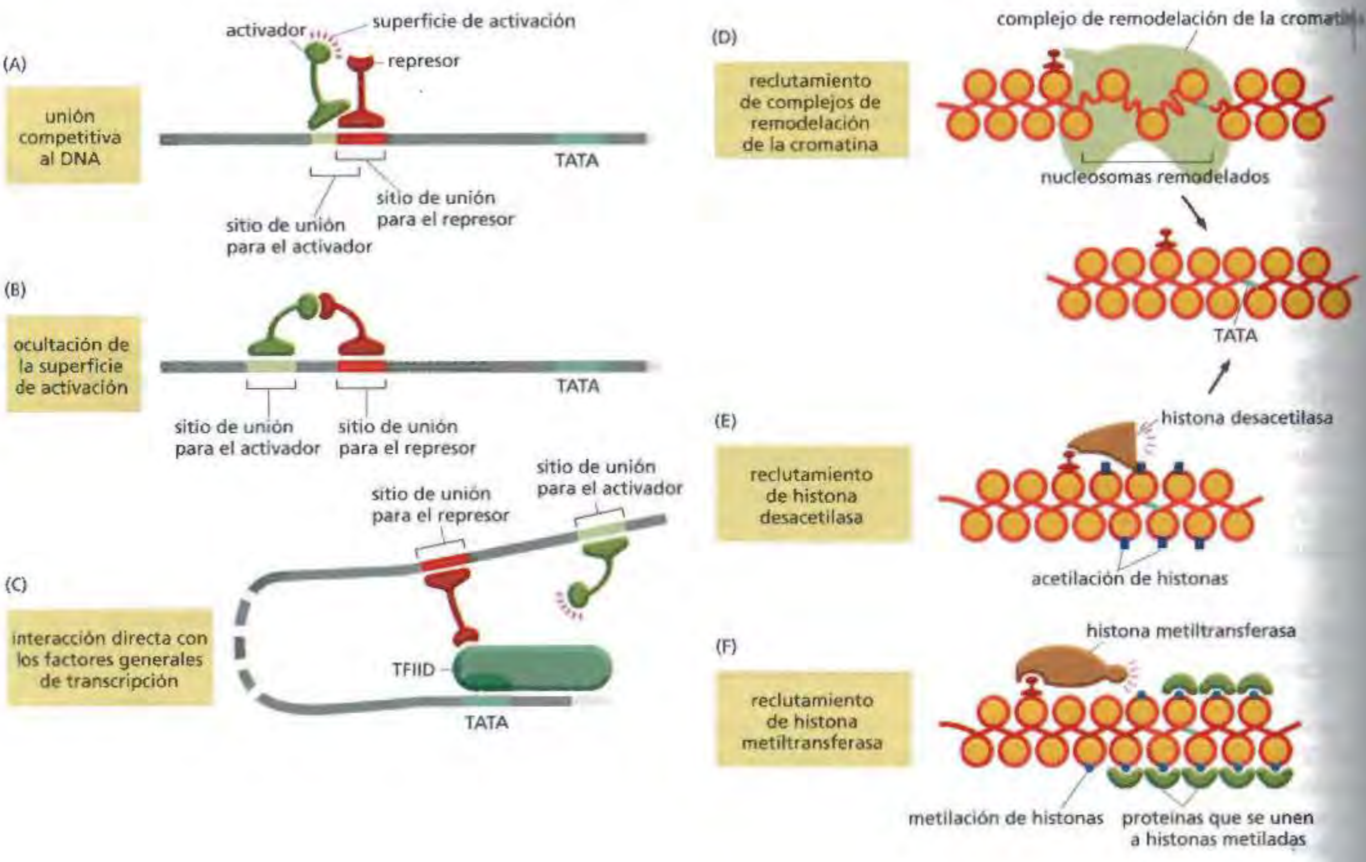


Figura 7–50 Seis formas en que pueden actuar las proteínas represoras de genes de organismos eucariotas. (A) Las proteínas activadoras de genes y las proteínas represoras compiten por la unión de una misma secuencia de DNA reguladora. (B) Ambas proteínas pueden unirse al DNA pero la proteína represora se une al dominio de activación de la proteína activadora, evitando así que efectúe su función activadora. En una variación de esta estrategia, el represor se une fuertemente al activador sin necesidad de unirse de forma directa al DNA. (C) El represor bloquea el ensamblaje de los factores generales de transcripción. Algunos represores también pueden actuar en etapas tardías del inicio de la transcripción, por ejemplo evitando que la RNA polimerasa se separe de los factores generales de transcripción. (D) El represor recluta un complejo de remodelación de la cromatina que devuelve a la región del promotor al estado nucleosómico pretranscripcional. (E) El represor atrae a la histona desacetilasa hacia el promotor. Como hemos visto, la acetilación de las histonas estimula el inicio de la transcripción (Figura 7–47) y el represor simplemente invierte esta modificación. (F) El represor atrae una histona transferasa que modifica ciertas posiciones en las histonas que, a su vez, están unidas por proteínas que mantienen la cromatina en la forma transcripcionalmente silenciosa. Por ejemplo, en *Drosophila*, la histona metiltranferasa Suv39 metila la posición K9 de la histona H3, una modificación a la que se une la proteína HP1. En otro ejemplo, E(z) metila la posición K27 de la histona H3 y la proteína Policomb se une a esta modificación. HP1 y Policomb reconocen las lisinas metiladas a través de un *cromodominio*. Como se muestra, pueden actuar de manera local inactivando genes específicos o pueden ocupar toda una región de un cromosoma reprimiendo un conjunto de genes. Un séptimo mecanismo de control negativo –inactivación de un activador transcripcional mediante heterodimerización– se ilustra en la Figura 7–24. Para que la presentación fuese más sencilla, se han omitido los nucleosomas en (A)-(C) y las escalas de (D)-(F) se han reducido en relación a (A)-(C).

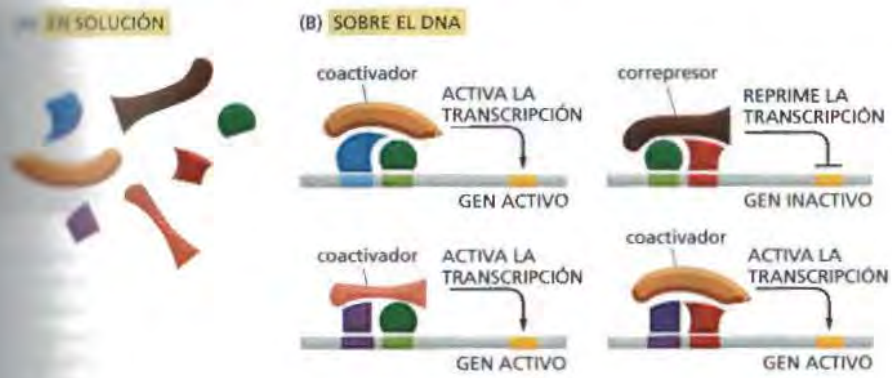


Figura 7–51 A menudo, las proteínas reguladoras de genes de organismos eucariotas se ensamblan sobre el DNA formando complejos. En (A) se muestran siete proteínas reguladoras de genes. La naturaleza y la función del complejo que forman depende de la especificidad de la secuencia de DNA que nuclea su ensamblaje. En (B), algunos complejos ensamblados activan la transcripción génica mientras que otros reprimen la transcripción. Nótese que tanto la proteína dibujada en *rojo* como la dibujada en *verde* forman parte de ambos complejos, activador y represor. Las proteínas que no se unen directamente al DNA sino que se ensamblan con otras proteínas de regulación génica, a menudo se denominan coactivadores o correpresores. Sin embargo, estos términos generan confusión porque abarcan una gran variedad de proteínas, incluyendo las proteínas de lectura y escritura, los complejos de remodelación de la cromatina y muchas otras clases de proteínas. Algunas no tienen actividad intrínseca por sí mismas sino que simplemente actúan como "andamiaje" para atraer aquellas proteínas que sí tienen actividad.

...ada DNA-proteínas (**Figura 7–52**). Debido a que el ensamblaje final requiere la presencia de varias proteínas reguladoras génicas, constituye una forma sencilla de asegurar que un gen se exprese sólo cuando la célula presenta la combinación correcta de estas proteínas. La formación en solución de heterodímeros da lugar a un mecanismo combinatorio para el control de la expresión génica. El ensamblaje de complejos de proteínas reguladoras de genes sobre el DNA constituye un segundo mecanismo importante para el control combinatorio, que da lugar a posibilidades más amplias.

Los interruptores genéticos complejos que regulan el desarrollo de *Drosophila* están formados por módulos menores

Dado que las proteínas reguladoras se pueden situar en muchos lugares situados a largas distancias en el DNA, que pueden ensamblarse formando complejos en cada uno de estos lugares y que los complejos influyen tanto en la estructura de la cromatina como en el ensamblaje de la maquinaria general de transcripción del promotor, podría existir un número casi ilimitado de posibilidades de generar mecanismos de control de la regulación de la transcripción de los genes en los organismos eucariotas.

Un ejemplo especialmente interesante de un complejo de ese tipo, un interruptor genético de varios componentes, es el que controla la transcripción del gen de *Drosophila* *even skipped (Eve)*, cuya expresión desempeña un papel importante en el desarrollo del embrión de *Drosophila*. Si el gen se inactiva por mutación, dejan de formarse muchas partes del embrión y éste muere en una fase temprana del desarrollo. Tal como se expone en el Capítulo 22, en la etapa del desarrollo en la que se empieza a expresar *Eve*, el embrión es una sola célula gigante que contiene muchos núcleos y un solo citoplasma común. El citoplasma no es homogéneo, sino que contiene una mezcla de proteínas reguladoras que se distribuyen de forma no uniforme a lo largo del eje del embrión, suministrando información posicional que diferencia entre una parte del embrión y otra (**Figura 7–53**). (En el Capítulo 22 se describe cómo se establecen estas diferencias.) A pesar de que inicialmente los núcleos son idénticos, rápidamente empiezan a expresar genes diferentes, ya que están expuestos a proteínas reguladoras diferentes. Por ejemplo, el núcleo próximo al extremo anterior del embrión en desarrollo está expuesto a un conjunto de proteínas reguladoras que es diferente al que influye sobre el núcleo del extremo posterior del embrión.

Las secuencias de DNA regulador que controlan el gen *Eve* detectan las concentraciones de las proteínas reguladoras en cada posición a lo largo del eje del embrión e interpretan esta información de forma que el gen *Eve* se expresa en siete franjas, cada una de las cuales tiene una anchura de cinco a seis núcleos, y que están situadas con precisión sobre el eje anteroposterior del embrión (**Figura 7–54**) ¿Cómo se ha podido procesar esta información? A pesar de que no se conocen todos los detalles moleculares, del estudio de *Eve* y de otros genes de *Drosophila* que presentan una regulación similar ya se han podido extraer algunos principios generales.

La región reguladora del gen *Eve* es muy larga (aproximadamente 20.000 pares de bases). Está formada por una serie de módulos reguladores sencillos, cada uno de los cuales contiene varias secuencias reguladoras y es responsable de una franja de expresión de *Eve* en el embrión. Esta organización modular se pone de manifiesto en experimentos en los que un módulo concreto (p. ej., el que especifica la franja 2) se extrae de su posición normal co-

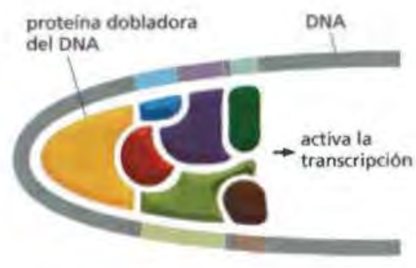


Figura 7–52 Descripción esquemática de un complejo de proteínas de regulación génica unidas a un potenciador. A la proteína mostrada en *amarillo* se la denomina proteína arquitectónica en tanto que su función principal es doblar al DNA para permitir el ensamblaje cooperativo de otros componentes. La estructura mostrada se basa en la observada en la región de control del gen que codifica una subunidad del receptor de la célula T (descrito en el Capítulo 25) y activa la transcripción en un promotor cercano. Sólo algunas células del sistema inmunológico en desarrollo, que finalmente darán lugar a las células T maduras, presentan el conjunto completo de componentes proteicos necesarios para formar esta estructura.

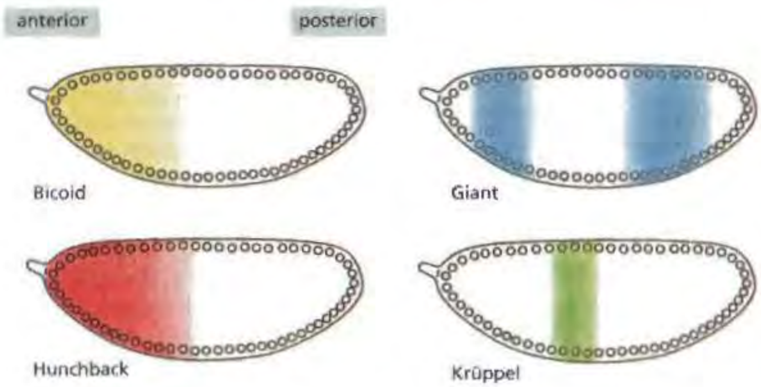


Figura 7–53 Distribución no uniforme de cuatro proteínas reguladoras en un embrión temprano de *Drosophila*. En este estadio, el embrión es un sincitio, con muchos núcleos en un citoplasma común. Aunque en estos dibujos no está indicado, todas estas proteínas se concentran en los núcleos.

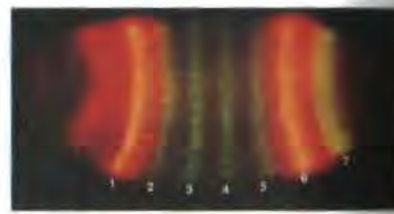


Figura 7–54 Las siete franjas de la proteína codificada por el gen *Even-skipped (Eve)* en un embrión de *Drosophila* en desarrollo. Dos horas y media después de tener lugar la fecundación, el huevo se fijó y se tiñó con anticuerpos que reconocen la proteína Eve (*verde*) y con anticuerpos que reconocen la proteína Giant (*rojo*). Cuando las proteínas Eve y Giant se encuentran presentes a la vez, la tinción aparece de color *amarillo*. En este momento del desarrollo, el huevo contiene aproximadamente 4000 núcleos. Tanto la proteína Eve como la proteína Giant se encuentran situadas en el núcleo y las franjas de Eve tienen una anchura de unos cuatro núcleos. En la Figura 7–53 se muestra el patrón de tinción de la proteína Giant. (Cortesía de Michael Levine.)

rriente arriba del gen *Eve*, se sitúa con un gen reportero (véase Figura 7–45) y se reintroduce en el genoma de *Drosophila*. Cuando se examinan embriones en desarrollo derivados de moscas portadoras de esta construcción de DNA, se observa la expresión del gen reportero exactamente en la posición de la franja 2 (**Figura 7–55**). Experimentos similares a éste demuestran la existencia de otros módulos reguladores, cada uno de los cuales especifica una de las otras seis franjas o alguna otra parte del patrón de expresión del gen *Eve* que por lo general está presente en fases posteriores del desarrollo (véase Figura 22–39).

El gen *Eve* de *Drosophila* está regulado por controles combinatorios

El estudio detallado del módulo regulador de la franja 2 ha proporcionado indicios sobre la forma en que este módulo lee e interpreta la información posicional. Esta región contiene secuencias de reconocimiento para dos proteínas reguladoras (Bicoid y Hunchback), que activan la transcripción de *Eve*, y para otras dos proteínas reguladoras (Krüppel y Giant) que reprimen su transcripción (**Figura 7–56**). (Las proteínas reguladoras de *Drosophila* suelen tener nombres descriptivos que reflejan el fenotipo que se produce debido a la inactivación por mutación del gen que las codifica.) Las concentraciones relativas de estas cuatro proteínas determinan si los complejos que se forman en el módulo de la franja 2 activan la transcripción del gen *Eve*. La **Figura 7–57** muestra las distribuciones de las cuatro proteínas reguladoras en la región del embrión de *Drosophila* donde se forma la franja 2. Parece que para inactivar el módulo de la franja 2 es suficiente que cualquiera de los dos represores esté unido al DNA, mientras que para activarlo al máximo es necesario que se unan ambos activadores, Bicoid y Hunchback. Así pues, esta unidad integra las cuatro informaciones posicionales de forma que el módulo de la franja 2 se activa (y en consecuencia se activa la transcripción del gen *Eve*) sólo en aquellos núcleos en los que los niveles tanto de Hunchback como de Bicoid son elevados y no exista ni Krüppel ni Giant. Esta combinación de

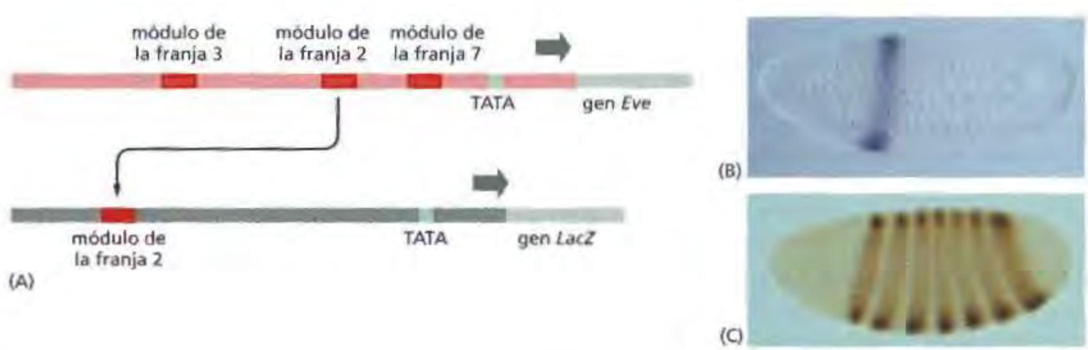


Figura 7–55 Experimento demostrativo de la construcción modular de la región reguladora de *Eve*. (A) Se tomó una región de 480 pares de bases de la región reguladora de *Eve* y se insertó por delante de un promotor que controla la síntesis de β-galactosidasa (el producto del gen *LacZ* de *E. coli*). (B) Cuando se introdujo esta construcción artificial en el genoma de embriones de *Drosophila*, los embriones expresaron β-galactosidasa (detectable mediante tinción histoquímica) precisamente en la posición de la segunda de las siete franjas de Eve (C). (B y C, Cortesía de Stephen Small y Michael Levine.)

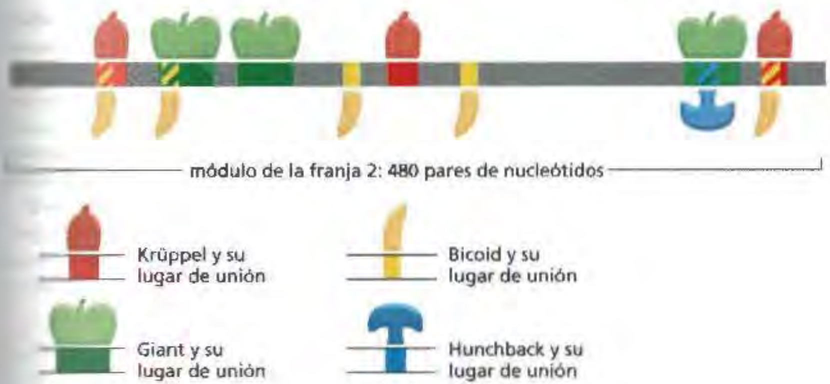


Figura 7–56 Detalle del módulo de la franja 2 de *Eve*. El segmento de la región de control de *Eve* identificado en la figura anterior contiene secuencias reguladoras, cada una de las cuales une alguna de las cuatro proteínas reguladoras. A partir de experimentos genéticos sabemos que estas cuatro proteínas son responsables de la expresión correcta de la franja 2 de *Eve*. Por ejemplo, las moscas deficientes en los dos activadores Bicoid y Hunchback no expresan la franja 2 de *Eve* de forma eficiente. Cuando las moscas son deficientes en cualquiera de los dos represores, Giant y Krüppel, la franja 2 se hace más amplia cubriendo una zona anormalmente grande del embrión. Las regiones de unión a DNA para estas proteínas se han determinado a partir de su clonación, sobreexpresión en *E. coli*, purificación y experimentos de determinación de huella en el DNA (véase Figura 7–29). El diagrama *superior* muestra que en algunos casos los sitios de unión para proteínas reguladoras de genes se pueden solapar de forma que las proteínas pueden competir por su unión al DNA. Por ejemplo, parece que la unión de Krüppel y de Bicoid en el lugar situado más a la derecha, es mutuamente excluyente.

activadores y represores sólo ocurre en una región del embrión temprano; así pues, en cualquier otro caso el módulo de la franja 2 está inactivo.

Previamente hemos descrito dos mecanismos de control combinatorio de la expresión génica: heterodimerización de las proteínas reguladoras en solución (véase Figura 7–20) y ensamblaje de combinaciones de proteínas reguladoras en pequeños complejos en el DNA (véase Figura 7–51). Es bastante probable que ambos mecanismos participen en la compleja regulación de la expresión de *Eve*. Además, la regulación del módulo de la franja 2 descrita ilustra un tercer tipo de control combinatorio. Dado que las secuencias reguladoras del módulo de la franja 2 se encuentran repetidas y dispersas por todo el DNA, muchos conjuntos de proteínas reguladoras se pueden unir simultáneamente en sitios distintos, influyendo así sobre el promotor del gen. El promotor integra las influencias sobre la transcripción de todas las proteínas unidas (**Figura 7–58**).

La regulación de la expresión de *Eve* es un ejemplo extremo de control combinatorio. Siete combinaciones de proteínas reguladoras –una combinación para cada franja– activan la expresión de *Eve*, mientras que muchas otras combinaciones (todas las que se encuentran en las regiones entre franjas) mantienen el gen silencioso. Parece que los otros módulos de franja tienen un diseño similar al descrito para el módulo de franja 2 y son capaces de leer información posicional suministrada por otras combinaciones de proteínas reguladoras. La región de control completa ocupa 20.000 pares de bases y es capaz de unir más de 20 proteínas reguladoras distintas. Así pues, una región compleja y grande está construida a partir de una serie de módulos de menor tamaño, cada uno de los cuales está formado por una serie de secuencias cortas de DNA reconocidas específicamente por proteínas reguladoras.

En mamíferos, las regiones de control también están formadas a partir de módulos reguladores sencillos

Tal vez el 8% de la capacidad de codificación de un genoma de mamífero está dedicado a la síntesis de proteínas que actúan como reguladores de la transcripción génica. Este elevado

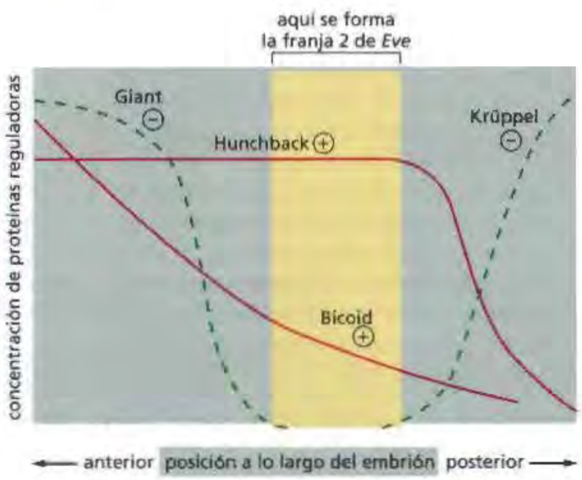


Figura 7–57 Distribución de las proteínas reguladoras responsables de asegurar que *Eve* se exprese en la franja 2. La distribución de estas proteínas se determinó mediante tinción de un embrión de *Drosophila* con anticuerpos dirigidos contra cada una de las cuatro proteínas (véase Figuras 7–53 y 7–54). La expresión de *Eve* en la franja 2 ocurre sólo en la posición donde están presentes los dos activadores (Bicoid y Hunchback) y están ausentes los dos represores (Giant y Krüppel). Por ejemplo, en embriones de moscas que carecen de Krüppel, la franja 2 se expande en dirección posterior. De una manera similar, si las secuencias de unión a DNA de Krüppel se inactivan mediante mutación, la franja 2 se expande en dirección posterior (véase Figura 7–56).

El propio gen *Eve* codifica una proteína reguladora que, después de que se establezca su patrón de distribución en siete franjas, regula a su vez la expresión de otros genes de *Drosophila*. A medida que progresa el desarrollo, el embrión se subdivide en regiones cada vez más finas que finalmente darán lugar a las diferentes partes del cuerpo de una mosca adulta, como se describe en el Capítulo 22.

Este ejemplo en embriones de *Drosophila* es poco habitual en el sentido de que los núcleos están expuestos directamente a determinantes posicionales en forma de concentraciones de proteínas reguladoras de genes. En los embriones de muchas otras especies, cada núcleo se halla en una célula, y la información posicional extracelular tiene que pasar a través de la membrana o, lo que es más usual, generar señales en el citosol que influyan en el genoma.

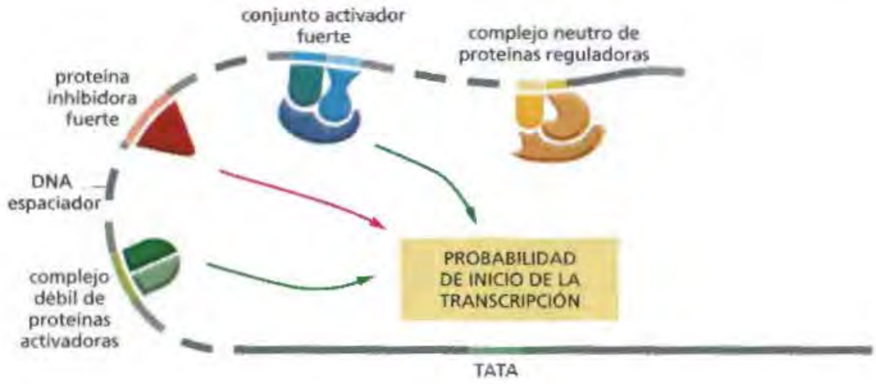


Figura 7–58 Integración de varias señales en un promotor. Varios grupos de proteínas reguladoras pueden actuar conjuntamente influyendo sobre un promotor, como hacen en el módulo de la franja 2 de *Eve* ilustrada en la Figura 7–56. Aún no se conoce en detalle cómo la célula consigue la integración de varias señales, pero es probable que la actividad transcripcional final de un gen resulte de la competencia entre activadores y represores que actúan mediante los mecanismos que se resumen en las Figuras 7–46 y 7–50.

número de genes refleja la gran complejidad de la red de control que regula la expresión de los genes en los mamíferos. Cada gen viene regulado por un conjunto de proteínas reguladoras génicas; cada una de estas proteínas es el producto de un gen que a su vez está regulado por un conjunto de otras proteínas, y así sucesivamente. Además, las propias proteínas reguladoras están reguladas a su vez por señales procedentes del exterior de la célula, lo cual puede activarlas o inactivarlas de varias formas (**Figura 7–59**). Así, el patrón de expresión génica de una célula puede considerarse como el resultante de un proceso computacional complejo efectuado por la red intracelular de control génico en respuesta al entorno celular. Volveremos a tratar de estas cuestiones con más detalle en los Capítulos 15 y 22, que tratan de la señalización celular y del desarrollo, pero la complejidad es destacable incluso en un solo interruptor genético que regula la actividad de un solo gen. Por ejemplo, no resulta poco frecuente encontrar un gen que tenga una región de control de 100.000 pares de bases de longitud con muchos módulos, cada uno de los cuales contenga un cierto número de secuencias reguladoras que unen proteínas reguladoras, y que se encuentren separados por largas secuencias de DNA no codificante.

Uno de los ejemplos mejor conocidos de región reguladora compleja en mamíferos es el del gen de β-globina humano, que sólo se expresa en los eritrocitos. La expresión del gen está controlada por un conjunto complejo de proteínas reguladoras, algunas de las cuales actúan como activadores y otras como represores (**Figura 7–60**). Las concentraciones (o actividades) de muchas de estas proteínas reguladoras cambian durante el desarrollo y sólo una combinación particular de todas ellas induce la transcripción del gen. El gen humano de la β-globina forma parte del grupo de genes de la globina (**Figura 7–61**A), que sólo se transcriben en su totalidad en células eritroblásticas, es decir, células sanguíneas del linaje de los eritrocitos, pero en una etapa diferente del desarrollo de los mamíferos (véase Figura 7–61B). El gen de la ε-globina se expresa en el embrión temprano, el γ en el embrión tardío y en el feto, y el δ y el β sobre todo en el adulto. Los productos génicos difieren ligeramente en sus propiedades de unión al oxígeno, adecuándose a las distintas condiciones de oxigenación del embrión, el feto y el adulto. Cada uno de los genes de la globina tiene su propio grupo de proteínas reguladoras necesarias para activar el gen en el momento y en el tejido apropiados.

Los genes de la globina son excepcionales porque se transcriben a velocidades muy elevadas en el momento y en el lugar adecuado: de hecho, los eritrocitos son poco más que bolsas de hemoglobina que sintetizaron las células precursoras. Para conseguir este nivel tan elevado de transcripción, los genes de las globinas, además de sus secuencias reguladoras individuales, comparten una región control llamada *locus de la región control* (LCR: *locus control region*), que se encuentra corriente arriba, lejos del conjunto de genes y que es necesaria para que se produzca una expresión adecuada de cada uno de estos genes (véase Figura 7–61A). La importancia de la LCR se pone de manifiesto en pacientes que presentan un tipo determinado de talasemia, una forma grave de anemia hereditaria. En estos pacientes, el sitio de la β-globina ha sufrido una deleción que elimina toda o una parte de la LCR. A pesar de que permanecen intactos tanto el gen de la β-globina como sus regiones reguladoras cercanas, este gen está silenciado transcripcionalmente, incluso en las células eritrocitarias.

No se conoce en detalle la manera en que actúa la LCR, pero se sabe que la proteína reguladora que se une a la LCR interactúa, mediante un bucle de DNA, con proteínas unidas a las regiones control de los genes de la globina que regulan. De este modo, las proteínas unidas a la LCR ayudan a atraer complejos remodeladores de la cromatina, enzimas modificadoras de histonas y componentes de la maquinaria de transcripción que actúan con-

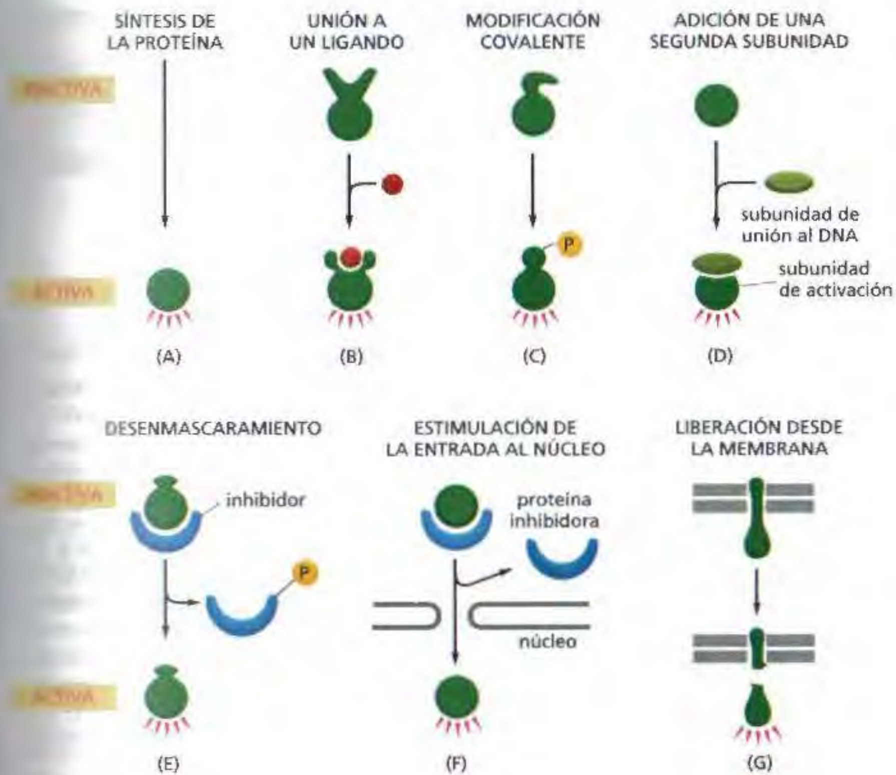


Figura 7–59 Algunos mecanismos de regulación de la actividad de las proteínas reguladoras en las células eucariotas. (A) La proteína reguladora de genes sólo se sintetiza cuando es necesaria y sufre una proteolisis rápida que evita su acumulación. (B) Activación por unión a un ligando. (C) Activación por modificación covalente. Aquí se muestra la fosforilación, pero son posibles muchas otras modificaciones (véase Tabla 3–3, p. 186). (D) Formación de un complejo entre una proteína de unión al DNA y otra proteína que actúa como dominio activador de la transcripción. (E) Desenmascaramiento de un dominio de activación por fosforilación de una proteína inhibidora. (F) Estimulación de la entrada al núcleo por eliminación de una proteína inhibidora que hacía que la proteína fuese incapaz de entrar al núcleo. (G) Liberación de una proteína reguladora de genes desde una bicapa membranosa mediante proteolisis regulada.

...mente con las regiones reguladoras específicas de cada uno de los genes de la globina. Además, la LCR incluye una *secuencia barrera* (véase Figura 4–47) que evita la expansión de heterocromatina vecina hacia el sitio de la β-globina, como se describe en el Capítulo 4. Esta propiedad dual distingue la LCR de la globina de muchos otros tipos de secuencias reguladoras del genoma humano; sin embargo, los genes de la globina no son los únicos que tienen una LCR, ya que otros genes específicos de tipo celular, que se transcriben de manera abundante, también presentan LCR corriente arriba. Probablemente deberíamos imagi-

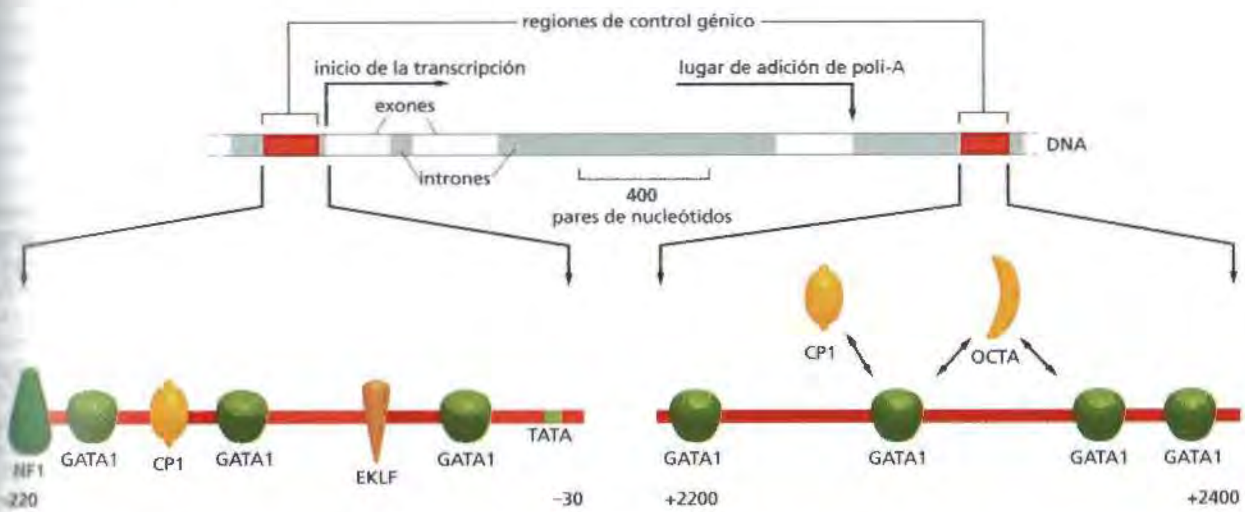


Figura 7–60 Modelo para el control del gen de la β-globina humano. El esquema muestra algunas de las proteínas reguladoras que controlan la expresión durante el desarrollo de los glóbulos rojos de la sangre (eritrocitos) (véase Figura 7–61). Algunas de las proteínas mostradas, como CP1, se encuentran en muchos tipos celulares, mientras que otras, como GATA1, son propias de algunos tipos celulares –incluyendo a los eritrocitos– por lo que se cree que contribuyen a la expresión específica del tipo celular de los genes de la β-globina. Como se indica con las *flechas de dos puntas*, algunas de las secuencias de GATA1 se solapan con las de otras proteínas reguladoras; parece que la ocupación de estos lugares por GATA1 excluye la unión de otras proteínas. Una vez unidas al DNA, las proteínas reguladoras de genes reclutan los complejos de remodelación de la cromatina, enzimas modificadoras de histonas, factores generales de transcripción, Mediador y RNA polimerasa hacia el promotor. (Adaptado de B. Emerson, en Gene Expression: General and Cell Type Specific [M. Karin ed.] pp. 116-161. Boston: Birkhauser, 1993.)

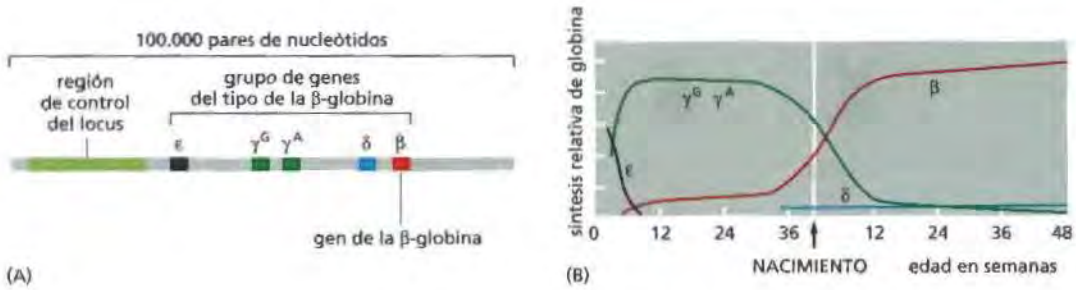


Figura 7–61 El grupo de genes del tipo de la β-globina de humanos. (A) La gran región cromosómica mostrada comprende 100.000 pares de nucleótidos y contiene los cinco genes de globina y una región de control del locus (LCR). (B) Variaciones de la expresión de los genes del tipo de la β-globina durante varias fases del desarrollo de los humanos. Cada una de las cadenas de globina codificadas por estos genes se combina con una cadena de la α-globina formando la hemoglobina de los glóbulos rojos (véase Figura 4–86). (A, según F. Grosveld, G.B. van Assendelft, D.R. Greaves, y G. Kollias, *Cell* 51:975-985, 1987. Con la autorización de Elsevier.)

nar a las LCR no como elementos de DNA únicos con propiedades especializadas, sino como combinaciones potentes de distintos tipos de secuencias reguladoras más elementales.

Los aislantes son secuencias de DNA que impiden que las proteínas reguladoras de genes eucariotas afecten a genes distantes

Todos los genes tienen regiones de control que determinan cuándo, bajo qué condiciones y en qué tejidos se expresará el gen. También hemos visto que las proteínas reguladoras de genes de organismos eucariotas pueden actuar sobre fragmentos de DNA muy alejados. ¿Cómo se evita que las regiones de control de distintos genes interfieran unas con otras? En otras palabras, ¿qué hace que una proteína reguladora génica que se halla unida a la región de control de un gen no afecte de forma inadecuada a otros genes adyacentes y tenga consecuencias negativas?

Para evitar esta intercomunicación, distintos tipos de elementos de DNA actúan compartimentando el genoma en dominios reguladores diferenciados. En el Capítulo 4 hemos tratado de las secuencias barrera que evitan que la heterocromatina se expanda hacia genes que deben ser expresados. Un segundo tipo de elemento de DNA, llamado aislante, evita que los potenciadores enloquezcan e inactiven genes inadecuados (**Figura 7–62**). Un aislante puede bloquear la comunicación entre un potenciador y un promotor, pero tiene que estar situado entre ambos. Aunque se han identificado las proteínas que se unen a aislantes, se desconoce cómo actúan neutralizando a los potenciadores de forma direccional.

A pesar de que sus mecanismos todavía no se conocen en su totalidad, se considera que la distribución de aislantes y de secuencias barrera divide el genoma en dominios independientes de regulación génica y de estructura de la cromatina (**Figura 7–63**). Algunos aspectos de esta organización se pueden observar con la tinción de los cromosomas para las proteínas específicas que se unen a estos elementos del DNA.

A pesar de que los cromosomas están organizados en dominios ordenados que disuaden a los potenciadores de actuar sin criterio, existen circunstancias especiales en las que un potenciador situado en un cromosoma es capaz de activar un gen situado sobre otro cromosoma. Un ejemplo destacable se da en la regulación de los receptores olfativos de los mamíferos. Estos receptores son proteínas que expresan las neuronas sensoriales, que permiten a los mamíferos discriminar con exactitud entre muchos miles de olores distintos (véase p. 917). Los humanos, por ejemplo, tenemos 350 genes que codifican receptores olfativos, los cuales están cuidadosamente regulados de modo que sólo se exprese uno de ellos en cada neurona sensorial. Los genes de los receptores olfativos están dispersos entre muchos cromosomas diferentes, pero sólo existe un solo potenciador para todos ellos. Cuando este potenciador activa un gen de los receptores asociándose a su región reguladora, permanece asociado de manera estable excluyendo así la activación de cualquiera de los otros genes de los receptores. Aunque este mecanismo todavía no es bien conocido, pone en evidencia la gran versatilidad de estrategias de regulación transcripcional que existen.

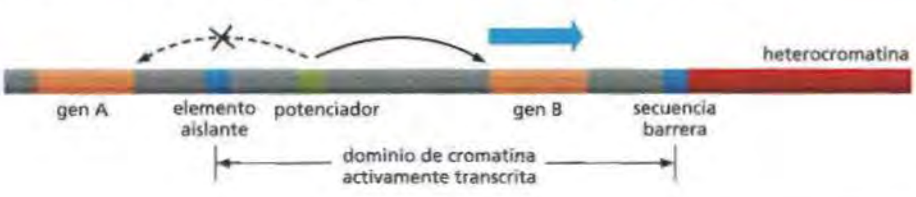


Figura 7–62 Diagrama esquemático que resume las propiedades de los aislantes y de las secuencias barrera. Los aislantes bloquean direccionalmente la acción de los incrementadores (*lado izquierdo*) y las secuencias barrera previenen la extensión de la heterocromatina (*lado derecho*). Así, el gen B está regulado de forma adecuada y se evita que el incrementador del gen B afecte a la transcripción del gen A. En la Figura 4–47 se muestra como actúan probablemente las secuencias barrera. Todavía no se conoce cómo producen sus efectos los aislantes; una posibilidad es que actúen como "señuelo", atando la maquinaria transcripcional y evitando que ésta interactúe con potenciadores auténticos. Otra posibilidad es que anclen el DNA a la envoltura nuclear, interfiriendo así con la formación de bucles de DNA entre un potenciador y un promotor inadecuado.



Figura 7–63 Localización de una proteína de unión a un aislante en cromosomas politénicos de *Drosophila*. Se tiñó un cromosoma politénico (véase Capítulo 4) con yoduro de propidio (*rojo*) para mostrar su patrón de bandas; las bandas aparecen en *rojo brillante* y las interbandas como interrupciones oscuras del patrón (*arriba*). Las posiciones de este cromosoma politénico, que se hallan unidas a una proteína aislante concreta (denominada BEAF), se encuentran teñidas de color *verde brillante* gracias a anticuerpos dirigidos contra la proteína (*abajo*). BEAF se localiza preferentemente en las regiones interbanda, lo cual refleja el papel que tiene en la organización de los cromosomas en dominios estructurales y funcionales. Para facilitar su comprensión, estas dos micrografías de un mismo cromosoma politénico están alineadas como imágenes especulares. (Cortesía de Uli Laemmli, a partir de K. Zhao et al. *Cell* 81: 879-889, 1995. Con la autorización de Elsevier.)

Los interruptores genéticos han evolucionado de forma rápida

Las regiones de control de los genes de los organismos eucariotas se distribuyen sobre largos fragmentos del DNA, mientras que las de los organismos procariotas suelen estar agrupadas alrededor del punto de inicio de la transcripción. Parece probable que el desarrollo de los interruptores génicos en estructuras densamente empaquetadas a partir de interruptores mayores sea la respuesta a una presión evolutiva de las bacterias hacia el mantenimiento de un genoma de pequeño tamaño. Sin embargo, esta compresión tiene un coste: la restricción de la complejidad y la adaptabilidad de los mecanismos de control. En cambio, la forma extendida de las regiones de control eucariotas –con módulos reguladores discretos separados por largas secuencias de DNA espaciador– facilita el mezclado de los módulos reguladores durante la evolución, tanto generando nuevos circuitos reguladores como modificando los ya existentes. Como se describió en los Capítulos 1 y 4, y se volverá a tratar en el Capítulo 22, la base de la gran variedad de vidas en la Tierra no es tanto la adquisición de nuevos genes como los cambios en la regulación génica. Desentrañar la historia evolutiva de las regiones modernas de control representa un reto fascinante para los biólogos y muchas de las claves para resolver este problema se hallan en las secuencias actuales de DNA.

Resumen

Las proteínas de regulación génica activan o desactivan la transcripción de cada uno de los genes de las células. En los organismos procariotas estas proteínas se unen habitualmente a secuencias específicas de DNA próximas al lugar de inicio de la transcripción por la RNA polimerasa y, según la naturaleza de la proteína reguladora y la localización precisa de su secuencia de unión, pueden tanto activar como reprimir la transcripción del gen. Sin embargo, la flexibilidad de la doble hélice de DNA permite que, al doblarse el DNA que los separa, algunas proteínas unidas en sitios distantes del gen influyan sobre la RNA polimerasa en el lugar promotor. La regulación de los genes de los eucariotas superiores es mucho más compleja como corresponde a un genoma más grande y a la gran variedad de tipos celulares que se forman. Un solo gen eucariota está controlado por muchas proteínas reguladoras unidas a secuencias que pueden distar miles de nucleótidos del promotor que controla la expresión del gen. Los activadores y represores eucariotas actúan mediante una amplia variedad de mecanismos –generalmente alterando la estructura de la cromatina y controlando el ensamblaje de factores generales de transcripción, el Mediador y la RNA polimerasa en el promotor. El momento y el lugar en el que se transcribe un gen, así como la velocidad de transcripción en distintas condiciones, dependen de la gama de proteínas de regulación génica que se unen a la región reguladora del gen.

MECANISMOS GENÉTICOS MOLECULARES QUE ORIGINAN TIPOS CELULARES ESPECIALIZADOS

Aunque todas las células han de ser capaces de activar y desactivar genes en respuesta a cambios en su entorno, las células de los organismos pluricelulares han desarrollado esta capacidad hasta un nivel máximo y mediante vías altamente especializadas han dado lugar a la formación de un conjunto organizado de tipos celulares diferenciados. En particular, cuando una célula de un organismo pluricelular queda determinada a diferenciarse hacia un tipo celular determinado, generalmente la célula mantiene esta elección a lo largo de muchas generaciones celulares, lo que significa que recuerda los cambios de expresión génica

implicados en la elección. Este fenómeno de *memoria celular* es un prerrequisito para la formación de tejidos organizados y para el mantenimiento de tipos celulares diferenciados. Por el contrario, tanto en los eucariotas como en la mayoría de los procariotas, otros cambios de la expresión génica son temporales. Por ejemplo, el represor de triptófano reprime la expresión de los genes del triptófano en la bacteria únicamente en presencia de triptófano; en cuanto desaparece del medio, los genes son activados de nuevo y los descendientes de la bacteria no tendrán memoria de que sus antecesores fueron expuestos al triptófano. Sin embargo, incluso en las bacterias es posible heredar algún tipo de cambios en la expresión génica.

En esta sección examinaremos no sólo los mecanismos de memoria celular, sino también de qué forma los mecanismos de regulación génica dan lugar a "circuitos lógicos" mediante los cuales las células pueden integrar señales, detenerse, recordar acontecimientos pasados y ajustar los niveles de expresión génica en el conjunto de cromosomas. Empezaremos considerando algunos de los mecanismos genéticos mejor conocidos de diferenciación celular que actúan en bacterias y en levaduras.

Los cambios de fase de las bacterias son provocadas por reorganizaciones del DNA

En las células eucariotas, la diferenciación generalmente no implica cambios detectables en las secuencias de DNA. En cambio, en algunas especies de procariotas se pueden alcanzar patrones de regulación génica hereditarios a base de reorganizaciones específicas del DNA que activan o desactivan genes concretos. Dado que un cambio en una secuencia de DNA será copiado con exactitud en todos los ciclos de replicación del DNA posteriores, cualquier estado de actividad génica alterado se heredará por toda la progenie de la célula en la que se ha producido la reorganización. Sin embargo, algunas de estas reorganizaciones son reversibles, de forma que ocasionalmente puede producirse un retorno a la configuración inicial del DNA. El resultado de este proceso es un patrón de actividad génica alternante que puede ser detectado en observaciones realizadas durante periodos de tiempo largos y muchas generaciones.

En la bacteria *Salmonella* se presenta un mecanismo de diferenciación celular de este tipo, conocido por **cambio de fase**, que ha sido muy estudiado. Aunque en organismos eucariotas superiores no existe ningún tipo de diferenciación equivalente a este, sí que puede tener un efecto importante sobre los animales, ya que es el mecanismo que utilizan algunas de las bacterias que provocan enfermedades para no ser detectadas por el sistema inmune. El cambio de la expresión génica en *Salmonella* se produce por la inversión esporádica de un segmento determinado de DNA de 1000 pares de nucleótidos. Este cambio altera la expresión de la proteína de la superficie celular flagelina, de la que la bacteria tiene dos genes distintos (**Figura 7–64**). Una enzima de recombinación específica de lugar cataliza la inversión y, por lo tanto, cambia la orientación de un promotor situado en el interior del DNA invertido. Con el promotor en una de las orientaciones, la bacteria sintetiza un tipo de flagelina; con el promotor situado en la otra orientación, la bacteria sintetiza el otro tipo de flagelina. Dado que las inversiones se dan muy raras veces, clones enteros de bacterias tendrán un tipo u otro de flagelina.

Casi con toda seguridad, el cambio de fase ha evolucionado como mecanismo de defensa porque protege a la población bacteriana contra la respuesta inmune de sus huéspedes vertebrados. Si el huésped fabrica anticuerpos contra un tipo de flagelina, las escasas bacterias cuya flagelina sea distinta debido al proceso que han sufrido de inversión génica podrán sobrevivir y multiplicarse.

Las bacterias que se aíslan de los medios naturales suelen presentar cambios de fase para uno o varios rasgos fenotípicos. Las cepas estándar del laboratorio pierden estas "inestabilidades" a lo largo del tiempo; sólo en algunos casos se han estudiado los mecanismos subyacentes a este proceso. No todos ellos consisten en inversiones de segmentos de DNA. Por ejemplo, una bacteria que provoca una enfermedad humana de transmisión sexual común (*Neisseria gonorrhoeae*) evita el ataque inmune mediante una variación hereditaria de las propiedades de su superficie, que no aparece por inversión génica sino por conversión génica (descrito en el Capítulo 5). Este mecanismo transfiere secuencias de DNA desde "casetes génicas" silenciosas a un lugar del genoma en el que los genes se expresan; tiene la ventaja de que así se generan muchas variantes de la proteína mayoritaria de la superficie bacteriana.

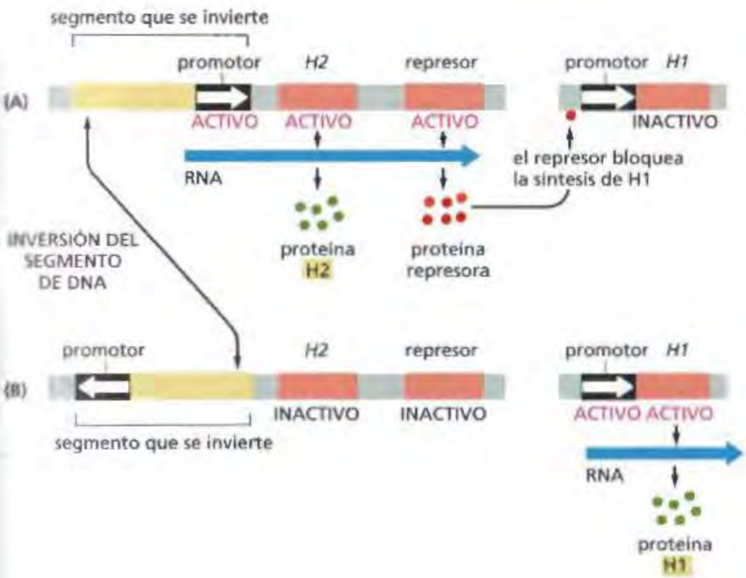


Figura 7–64 Cambios en la expresión génica mediante inversiones del DNA en bacterias. Transcripción alternante de dos genes de flagelina en una bacteria *Salmonella*, causada por un suceso sencillo de recombinación específica de lugar que invierte un pequeño segmento de DNA que contiene un promotor. (A) En una de las orientaciones, el promotor activa la transcripción del gen *H2* de flagelina y el de la proteína represora que bloquea la expresión del gen de flagelina *H1*. (B) Cuando el promotor se invierte, deja de activar al gen *H2* y al represor, de forma que el gen *H1*, que ahora está libre de represión, se expresa. El mecanismo de recombinación se activa en muy pocas ocasiones (alrededor de una vez cada 10^5 divisiones celulares). Así, la producción de uno u otro tipo de flagelina tiende a ser hereditario en cada clon de células.

En las levaduras de gemación, un conjunto de proteínas reguladoras génicas determina el tipo celular

Debido fundamentalmente a su gran facilidad de crecimiento y de manipulación genética, las levaduras se han analizado con gran detalle como un organismo modelo para el estudio de los mecanismos de control génico en organismos eucariotas. La levadura común para los productos de la panadería, *Saccharomyces cerevisiae*, ha sido especialmente interesante por su capacidad de diferenciarse en tres tipos celulares. *S. cerevisiae* es un eucariota unicelular que puede existir tanto en estado haploide como en estado diploide. Las células diploides se forman por un proceso denominado **apareamiento**, en el que dos células haploides se fusionan. Para que dos células haploides se puedan aparear han de tener un *tipo de apareamiento* (sexo) diferente. En *Saccharomyces cerevisiae*, existen dos tipos de apareamiento, α y **a**, especializados en el apareamiento mutuo. Cada uno de ellos produce una molécula señal determinada (factor de apareamiento) que difunde y una proteína receptora específica en la superficie celular. Estas moléculas capacitan a la célula para reconocer y ser reconocida por el tipo celular opuesto, con el que entonces puede fusionarse. Las células diploides resultantes, denominadas **a**/α, son distintas de cada uno de los dos tipos paternos: no son aptas para el apareamiento pero en cambio pueden formar esporas (pueden esporular), generando células haploides por meiosis en situaciones de carencia de nutrientes (descrito con más detalle en el Capítulo 21).

Los mecanismos por los cuales se establecen y se mantienen estos tres tipos de células ilustran algunas de las estrategias que se han descrito previamente para cambiar el patrón de expresión génica. El tipo de apareamiento de la célula haploide viene determinado por un solo locus genético, el **locus del tipo de apareamiento** (**Mat:** ***mat****ing-type locus*), que en la célula de tipo **a** codifica una sola proteína reguladora, **a1**, y en una célula de tipo α codifica dos proteínas reguladoras, Matα1 y Matα2. La proteína **a1** no tiene ningún efecto sobre la propia célula haploide de tipo **a**, pero lo tendrá más tarde en la célula diploide resultante del apareamiento. En cambio, la proteína α2 actúa en la célula α como un represor transcripcional que reprime los genes específicos de **a**, mientras que α1 actúa como un activador transcripcional que activa los genes específicos de α. Cuando se fusionan células de los dos tipos de apareamiento, la combinación de las proteínas reguladoras **a1** y α2 genera un patrón de expresión génica completamente distinto al de cualquiera de las células progenitoras. En la **Figura 7–65**, se esquematiza el mecanismo por el cual se expresan los genes específicos del tipo de apareamiento en cada uno de los tres tipos celulares. Se trata de uno de los primeros ejemplos de control génico combinatorio y todavía sigue siendo uno de los mejor conocidos a nivel molecular.

Aunque en muchos laboratorios las cepas de *S. cerevisiae* se mantienen estables durante muchas generaciones, algunas cepas aisladas del medio natural cambian repetidamente entre los tipos celulares **a** y α por un mecanismo de reorganización génica que recuerda las reorganizaciones de DNA en *N. gonorrhoeae*, aunque el mecanismo exacto parece ser carac-

terístico de la levadura. En cada uno de los extremos del locus *Mat* del cromosoma de la levadura existe un locus silencioso que codifica las proteínas reguladoras específicas del tipo de apareamiento: en un lado codifica Matα1 y Matα2; en el otro lado, el locus silencioso codifica Mata1. Aproximadamente en cada división celular sucesiva, el gen activo del locus *Mat* es eliminado y es sustituido por una nueva copia del locus silencioso del tipo de apareamiento opuesto. Este mecanismo se ha denominado *mecanismo casete*, ya que el cambio elimina un gen de la posición "activa" y lo sustituye por otro. El cambio es reversible porque aunque se elimina el gen original del locus *Mat*, siempre queda una copia silenciosa en el genoma. Nuevas copias de DNA realizadas a partir de los genes silenciosos actúan como casetes desechables que serán insertados alternativamente en el locus *Mat* que actúa como "cabezal lector" (**Figura 7-66**).

Las casetes silenciosas se empaquetan en formas especializadas de cromatina y se mantienen en una forma que puede considerarse transcripcionalmente inactiva. El estudio de estas casetes –que se realiza desde hace casi 40 años– ha proporcionado muchos de los descubrimientos clave sobre el papel que desempeña la estructura de la cromatina en la regulación génica.

Dos proteínas que reprimen mutuamente su síntesis, determinan el estado heredable del bacteriófago lambda

Como se indicó al principio de este capítulo, el núcleo de cada célula diferenciada contiene toda la información genética necesaria para construir un vertebrado o una planta. Esta observación elimina la posibilidad de que la causa principal de la diferenciación de las células eucariotas superiores sean los cambios irreversibles en el DNA, a pesar de que en la diferenciación de los linfocitos sí que se producen cambios de este tipo (descrito en el Capítulo 25). Aunque, en principio, los cambios *reversibles* de secuencias de DNA, similares a los descritos en los casos de *Salmonella* y de las levaduras, pueden ser responsables de algunos de los cambios hereditarios de expresión génica que se observan en los organismos eucariotas superiores, actualmente no disponemos de evidencias que indiquen que estos mecanismos sean utilizados de forma generalizada.

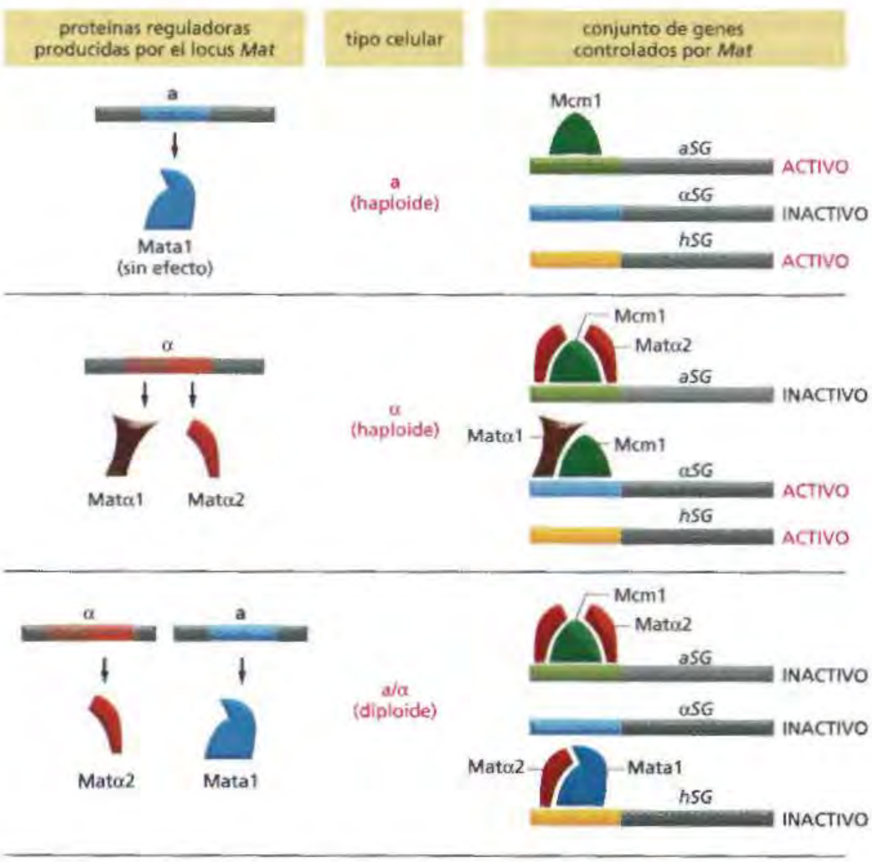


Figura 7-65 Control del tipo celular en levaduras. Tres proteínas reguladoras (Matα1, Matα2 y Mata1) producidas por el locus *Mat* determinan el tipo celular en levaduras. En las células haploides de tipo **a**, en las células haploides de tipo α y en las células diploides (de tipo a/α) se transcriben grupos diferentes de genes. Las células haploides expresan una serie de genes característicos de la célula haploide (*hSG*) y un grupo de genes característicos de a (*aSG*) o de α (*αSG*). Las células diploides no expresan ninguno de estos genes. En cada uno de estos tipos celulares, las proteínas reguladoras Mat controlan muchos genes diana mediante su unión, en diferentes combinaciones, a las secuencias reguladoras situadas corriente arriba de estos genes. Es de destacar que la proteína Matα1 es activadora, mientras que la proteína Matα2 es represora. Ambas actúan en combinación con una proteína reguladora denominada Mcm1 que se halla en los tres tipos de células. En la célula diploide, Matα2 y Mata1 forman un heterodímero (se muestra con detalle en la Figura 7-21) que desactiva un grupo distinto de genes (entre los que se incluye el gen que codifica la proteína activadora Matα1) de los que inactivaba Matα2 y Mcm1. Este caso relativamente sencillo de control génico es un buen ejemplo de control combinatorio de la expresión génica.

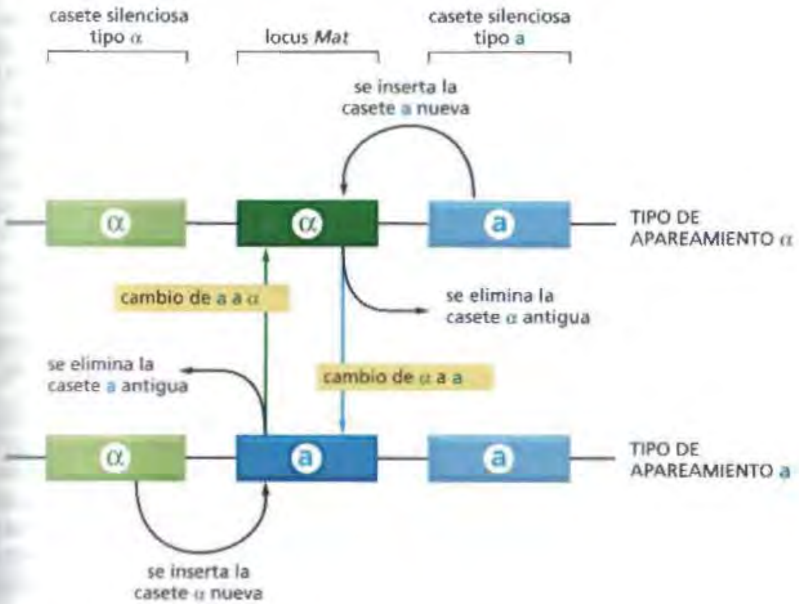


Figura 7–66 Modelo de las casetes para la alternancia de tipo de apareamiento en la levadura. El cambio de casetes se produce por un proceso de conversión génica que requiere la actuación de una enzima especializada (la nucleasa HO) que realiza un corte de doble cadena en una determinada secuencia del DNA en el locus *Mat*. A continuación, se elimina el DNA cerca del corte y se sustituye por una copia de la casete silenciosa del tipo de apareamiento opuesto. El mecanismo de esta forma especializada de conversión génica es similar a la reparación de las rupturas de cadena doble descrita en el Capítulo 5 (pp. 308-309).

Sin embargo, existen otros mecanismos, como los que ya hemos descrito en este capítulo, que son capaces de producir patrones de expresión génica que pueden heredarse por las siguientes generaciones de células. Uno de los mecanismos más sencillos se halla en el virus bacteriano (bacteriófago) lambda en el que un interruptor genético puede causar una conversión en el virus, de tipo "flip-flop", entre dos estados estables. Este tipo de interruptor se puede considerar como un prototipo de interruptores similares, aunque más complejos, que actuarían en el desarrollo de los eucariotas superiores.

Previamente hemos descrito que el bacteriófago lambda puede permanecer integrado en el DNA de una célula de *E. coli* en condiciones favorables, de forma que se replica de forma automática cada vez que la bacteria se divide. Alternativamente, el virus puede multiplicarse en el citoplasma y matar a su huésped (véase la Figura 5–78). Unas proteínas codificadas por el genoma vírico median el cambio entre estos dos estados. El genoma consta de unos 50 genes que en uno u otro estado se transcriben siguiendo patrones muy diferentes. Por ejemplo, en un virus que se va a integrar, se ha de producir la proteína *integrasa*, necesaria para insertar el DNA del virus en el genoma de la bacteria, pero al mismo tiempo se ha de reprimir la producción de las proteínas víricas que están implicadas en la replicación del virus. Cuando se ha escogido entre uno de los dos patrones de expresión, éste se mantiene estable.

En el corazón de este complejo sistema regulador de la expresión génica se encuentran dos proteínas reguladoras de genes sintetizadas por el virus: la **proteína represora lambda** (proteína cI), descrita anteriormente, y la **proteína Cro**. Cada una de estas proteínas bloquea la síntesis de la otra; esta organización sólo permite, por lo tanto, dos estados posibles (**Figura 7–67**). En el estado 1 (el *estado de profago*), el represor lambda ocupa el operador, bloqueando la síntesis de Cro y activa su propia síntesis. En el estado 2 (el *estado lítico*), la proteína Cro ocupa un lugar diferente en el operador, bloqueando la síntesis del represor y activando su propia síntesis. En el estado de profago, la mayor parte del DNA del virus integrado de forma estable, no se transcribe; en el estado lítico, este DNA se transcribe de forma intensa, se replica, se empaqueta en nuevos bacteriófagos y se libera cuando se produce la lisis de la célula huésped.

Cuando la bacteria huésped va creciendo a buen ritmo sin sufrir limitaciones externas, el virus tiende a adoptar el estado 1, permitiendo que el DNA del virus se multiplique con rapidez conjuntamente con el cromosoma huésped. Cuando se daña de algún modo la célula huésped, un virus integrado se transforma del estado 1 al estado 2, se multiplica en el citoplasma de la célula y se escapa rápidamente de ella. Esta conversión está inducida por la respuesta del huésped al daño en el DNA, lo cual inactiva a la proteína represora. Sin embargo, en ausencia de tales interferencias el represor de lambda bloquea la producción de la proteína Cro y activa su propia síntesis, y este *bucle de retroalimentación positiva* es el que ayuda a mantener el estado de profago.



Figura 7–67 Versión simplificada del sistema regulador que determina la forma de crecimiento del bacteriófago lambda en la célula huésped *E. coli*. En el estado estable 1 (estado de profago), el bacteriófago sintetiza una proteína represora, que activa su propia síntesis e inactiva la síntesis de varias proteínas del fago, entre las que se cuenta la proteína Cro. En el estado estable 2 (estado lítico), el bacteriófago sintetiza la proteína Cro, la cual inactiva la síntesis de la proteína represora, de forma que se sintetizan muchas proteínas víricas y comienza la replicación libre del DNA del virus en la célula de *E. coli*, produciendo finalmente numerosas partículas víricas que matarán a la célula. Este ejemplo muestra cómo pueden combinarse dos proteínas reguladoras en un circuito produciendo dos estados estables. Tanto el represor de lambda como la proteína Cro reconocen al operador mediante un motivo hélice-giro-hélice (véase Figura 7–11).

Mediante circuitos de regulación génica sencilla se pueden construir mecanismos de memoria

Los circuitos de retroalimentación positiva constituyen una estrategia general sencilla para la memoria celular, es decir, para el establecimiento y mantenimiento de patrones heredables de transcripción génica. La **Figura 7–68** muestra el principio básico de este mecanismo en su forma más sencilla. Las células eucariotas utilizan diferentes variaciones de esta estrategia. Por ejemplo, varias proteínas reguladoras de genes que están implicadas en el establecimiento del plan de desarrollo del cuerpo en *Drosophila* (descrito en el Capítulo 22) estimulan su propia transcripción dando lugar a una circuito de retroalimentación positiva que estimula su síntesis de forma continua; al mismo tiempo muchas de estas proteínas reprimen la transcripción de genes que codifican otras proteínas importantes de regulación génica. De esta forma, unas cuantas proteínas reguladoras que se afectan unas a otras en su síntesis y actividad pueden determinar un sofisticado patrón de comportamiento heredable.

Los circuitos de transcripción permiten que la célula lleve a cabo operaciones lógicas

Se pueden combinar interruptores sencillos de regulación génica generando todos los tipos de dispositivos de control, del mismo modo que se pueden unir elementos sencillos de conmutación electrónica en un ordenador para realizar muchos tipos de operaciones. El análisis de circuitos de regulación génica ha revelado que ciertos tipos de disposiciones sencillas se encuentran una y otra vez en las células de especies muy diferente. Por ejemplo, los *circuitos de retroalimentación* positiva y negativa son muy comunes en todas las células (**Figura 7–69**). Como hemos visto, el primero de ellos proporciona un dispositivo sencillo de memoria; el segundo a menudo se utiliza para mantener la expresión de un gen cerca de un nivel estándar independientemente de variaciones de las condiciones bioquímicas dentro de una célula. Su-

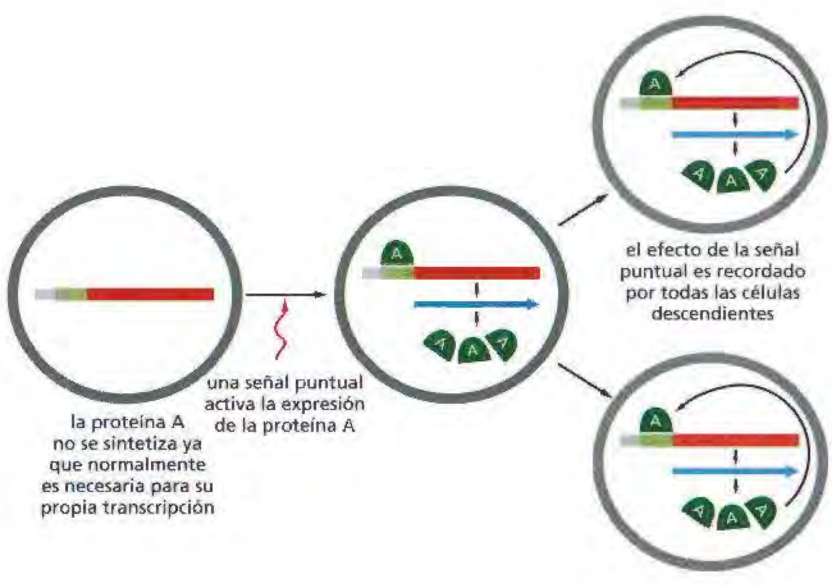


Figura 7–68 Esquema que muestra cómo un bucle de retroalimentación positiva puede generar memoria celular. La proteína A es una proteína reguladora que activa su propia transcripción. Todos los descendientes de la célula original "recordarán" que la célula progenitora recibió la señal transitoria que inició la producción de la proteína.

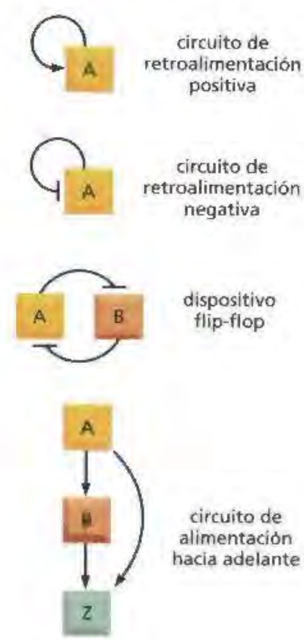


Figura 7–69 Tipos de motivos de red frecuentes en los circuitos transcripcionales. A y B representan proteínas de regulación génica, las flechas indican control transcripcional positivo y las líneas con barras muestran control transcripcional negativo. En las Figuras 7–70 y 7–71 se dan descripciones más detalladas sobre los circuitos de retroalimentación positiva y los dispositivos flip-flop, respectivamente. En los circuitos de alimentación hacia adelante, A y B representan proteínas reguladoras que activan la transcripción de un gen diana, Z.

Supongamos, por ejemplo, que una proteína represora de la transcripción se une a la región reguladora de su propio gen y ejerce una retroalimentación negativa fuerte de forma que la transcripción se lleva a cabo a una velocidad muy baja cuando la concentración de proteína represora está por encima de un cierto valor crítico (determinado por su afinidad hacia su sitio de unión al DNA) y a una velocidad muy alta cuando está por debajo de este valor crítico. De este modo la concentración de la proteína se mantendrá cerca del valor crítico, ya que cualquier circunstancia que cause una caída por debajo de ese valor conducirá a un aumento brusco de la síntesis, y cualquier incremento por encima de ese valor provocará una inactivación de la síntesis. Sin embargo, los ajustes de este tipo requieren tiempo, de modo que un cambio súbito de las condiciones causará una perturbación en la expresión génica, fuerte pero en todo caso transitoria. Como describimos con detalle en el Capítulo 15, el sistema de retroalimentación negativa puede funcionar como un detector de cambios repentinos. Por otro lado, si existe un retraso en el bucle de retroalimentación, pueden producirse oscilaciones espontáneas en la expresión del gen (véase Figura 15–28). Los detalles cuantitativos asociados al bucle de retroalimentación negativa determinan cuál de estos posibles comportamientos ocurrirá.

Con dos o más genes, la posible gama de circuitos de control y de comportamientos de los mismos se hace rápidamente más compleja. Como hemos visto, el bacteriófago lambda constituye un ejemplo de un tipo común de circuito de dos genes que puede alternar entre la expresión de un gen y la expresión del otro. Otra disposición común es un *circuito de alimentación hacia adelante* (*feed-forward*) (véase Figura 7–69); entre otras cosas, puede actuar como un filtro, respondiendo a señales de entrada prolongadas pero ignorando las que son breves (**Figura 7–70**). Una célula puede utilizar estos diferentes motivos de redes como dispositivos lógicos en miniatura para procesar la información de modos sorprendentemente sofisticados.

En una célula eucariota típica, se combinan dispositivos sencillos como los que acabamos de ver y dan como resultado circuitos muy complejos (**Figura 7–71**). Cada una de las células de un organismo pluricelular en desarrollo está equipada con esta maquinaria de control y tiene que utilizar un sistema complejo de interruptores transcripcionales entrelazados para calcular cómo debería comportarse a cada momento en respuesta a la gran cantidad de señales diferentes de entrada, antiguas y actuales, que recibe. En la actualidad, sólo estamos en los inicios de la comprensión de cómo podemos estudiar estas complejas redes de control intracelular. De hecho, sin información cuantitativa mucho más exacta y completa de la que tenemos en este momento, es imposible predecir el comportamiento de un sistema como el que se muestra en la Figura 7–71: el diagrama del circuito no es suficiente por sí mismo.

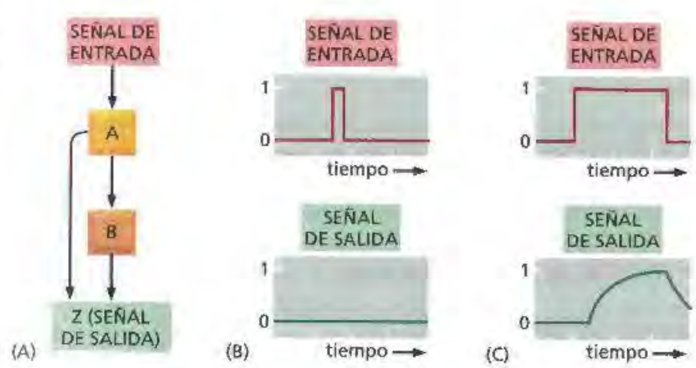


Figura 7–70 Cómo un circuito de alimentación hacia adelante puede medir la duración de una señal. (A) En este ejemplo teórico, las dos proteínas activadoras génicas A y B son necesarias para la transcripción de Z; A sólo es activa cuando está presente una señal de entrada.
(B) Si la señal de entrada para A es breve, A no permanece activa el tiempo suficiente para que se acumule B, por lo tanto el gen Z no se transcribe. (C) Si la señal para A persiste, B se acumula, A permanece activa y Z se transcribe. Esta disposición permite que la célula ignore fluctuaciones rápidas en la señal de entrada y sólo responda a niveles persistentes. Esta estrategia podría utilizarse, por ejemplo, para distinguir entre ruido al azar y una señal verdadera.

El comportamiento mostrado aquí fue calculado para un grupo concreto de valores paramétricos que describen las propiedades cuantitativas de A, B y Z y de su síntesis. Con valores diferentes de estos parámetros, los circuitos de alimentación hacia adelante pueden, en principio, realizar otro tipo de "cálculos". Se han descubierto muchos circuitos de alimentación hacia adelante en las células y los análisis teóricos ayudan a los investigadores a valorar y posteriormente examinar las distintas formas posibles de funcionamiento. (Adaptado de S.S. Shen-Orr, R. Milo, S. Mangan y U. Alon, *Nat. Genet.* 31:64-68, 2002. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

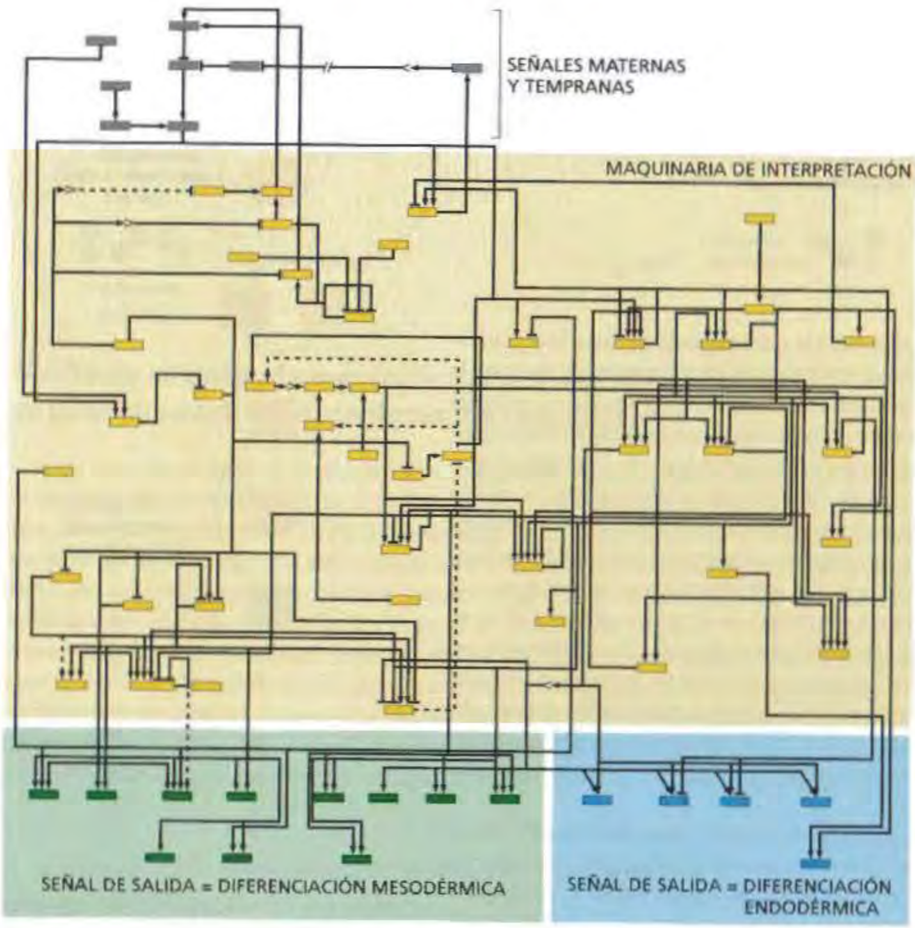


Figura 7-71 El circuito génico complejo que especifica una parte del embrión en desarrollo del erizo de mar. Cada *rectángulo pequeño coloreado* representa un gen diferente. Los que están coloreados de *amarillo* codifican proteínas de regulación génica y los *verdes* y *azules* codifican proteínas que proporcionan las características específicas a las células del mesodermo y del endodermo, respectivamente. Los genes representados en *gris* son muy activos en la madre y proporcionan al huevo indicaciones necesarias para el desarrollo adecuado. Las *flechas* representan casos en los que una proteína de regulación génica activa la transcripción de otro gen. Las líneas que acaban en *barra* indican ejemplos de represión génica.

La biología sintética da lugar a nuevos dispositivos a partir de partes biológicas ya existentes

Nuestro discurso se ha centrado en los circuitos transcripcionales que se producen de forma natural, pero también es ilustrativo para diseñar y construir circuitos artificiales en el laboratorio e introducirlos en células para examinar su comportamiento. Por ejemplo, una bacteria modificada puede oscilar entre tres estados en un orden predeterminado y funcionar así como un oscilador o un reloj sencillo (véase **Figura 7-72**). La construcción de estos dispositivos nuevos a partir de partes ya existentes se denomina habitualmente *biología sintética*. Los científicos utilizan esta aproximación para comprobar si entienden las propiedades de cada una de las piezas por separado; si es así, deberían ser capaces de combinar estas piezas de formas nuevas y predecir con exactitud las características que presenta el nuevo dispositivo. El hecho de que estas predicciones por lo general fallen ilustra lo lejos que estamos de llegar a entender realmente bien los detalles de los diferentes comportamientos de la célula. Nuestro conocimiento tiene grandes lagunas que requerirán una futura aplicación experta de los enfoques cuantitativos de las ciencias físicas hacia sistemas biológicos complejos.

Los relojes circadianos se basan en circuitos de retroalimentación de la regulación génica

La vida en la Tierra ha evolucionado en presencia de un ciclo diario de día y noche, y muchos organismos actuales (desde las arqueas hasta las plantas o los humanos) presentan un ritmo interno que dicta distintos comportamientos en momentos distintos del día. Estos comportamientos van desde el cambio cíclico de las actividades metabólicas de un hongo hasta los complejos ciclos sueño-vigila de los humanos. A los osciladores internos que controlan estos ritmos diurnos se les denomina relojes circadianos.

Gracias a su propio reloj circadiano, un organismo puede anticipar los cambios constantes en su entorno y adoptar medidas con anticipación. Por supuesto, el reloj interno no

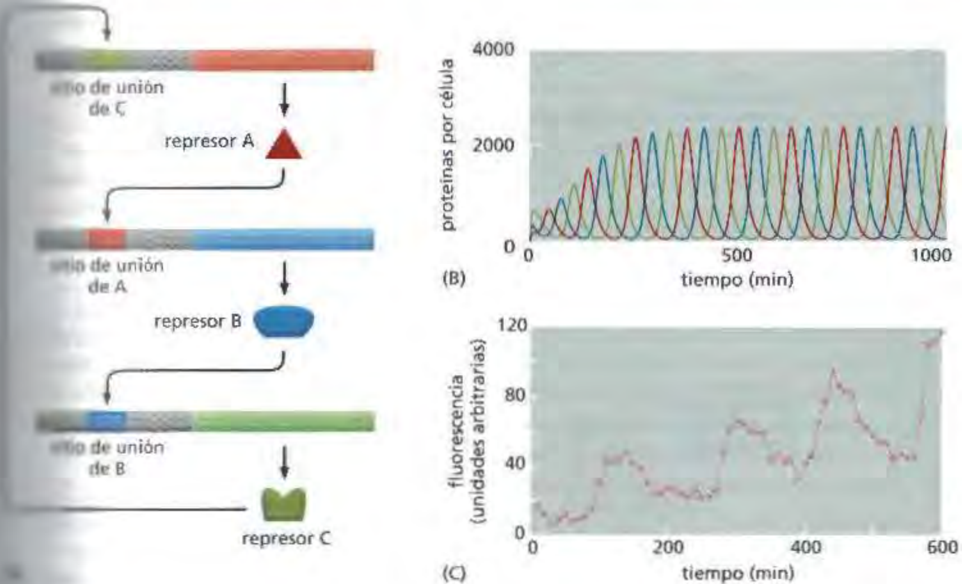


Figura 7–72 Un oscilador o "reloj" genético sencillo diseñado en el laboratorio. (A) Se utilizaron técnicas de DNA recombinante para generar tres genes artificiales, cada uno de los cuales codifica una proteína represora bacteriana diferente y está controlado por el producto de otro gen del conjunto, generando un circuito regulador, tal como se muestra. Estos represores (denominados A, B y C en la figura) son el represor *Lac* (véase Figura 7–39), el represor *Tet*, que regula la expresión de varios genes en respuesta a la tetraciclina, y el represor lambda (véase Figura 7–67). Cuando se introducen en una célula bacteriana, estos tres genes forman un circuito de retroalimentación negativa con retraso: por ejemplo, el producto del gen A, actúa a través de los genes B y C inhibiendo indirectamente su propia expresión. La retroalimentación negativa con retraso da lugar a oscilaciones. (B) Predicción por ordenador del comportamiento oscilatorio. La célula pasa por una serie de estados de forma repetida y circular, expresando A, luego B, luego C, luego otra vez A, y así continuamente, ya que cada producto génico escapa cada vez a la inhibición que ejerce el anterior y reprime al siguiente. (C) Oscilaciones reales observadas en una célula que contiene los tres genes artificiales de (A), revelados con un indicador fluorescente de la expresión de uno de estos genes. La amplitud creciente de la señal fluorescente refleja el crecimiento de la célula bacteriana. (Adaptado a partir de M.B. Elowitz y S. Leibler, *Nature* 403: 335-338, 2000. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

puede ser perfectamente preciso por lo que ha de ser capaz de reajustarse mediante estímulos externos como la luz del día. Así, los relojes circadianos se mantienen en funcionamiento incluso cuando desaparecen los factores del entorno (cambios en la luz u oscuridad), aunque el periodo de este ritmo de funcionamiento independiente es ligeramente más corto o más largo que 24 h. Las señales externas que indican el momento del día provocan pequeños ajustes en el funcionamiento del reloj, de forma que el organismo se sincroniza con su entorno. Como consecuencia de cambios más drásticos, los ciclos circadianos se reajustan de forma gradual a un nuevo ciclo de luz y oscuridad, como sabe cualquiera que después de un viaje haya experimentado un *jet lag*.

Podríamos esperar que el reloj circadiano de un organismo tan complejo como un ser humano se basara en un mecanismo pluricelular, formado por distintos grupos de células responsables de las distintas partes de los mecanismos de oscilación. Sin embargo, resulta que en casi todos los organismos –incluidos los humanos– los controladores temporales son células individuales. Así, un reloj que actúa en cada uno de los miembros de un grupo especializado de células del cerebro (las células SCN del núcleo supraquiasmático del hipotálamo) controla nuestros ciclos diurnos de sueño y vigilia, la temperatura corporal y la liberación de hormonas. Aunque estas células fuesen extraídas del cerebro y se dispersasen en una placa de cultivo, seguirían oscilando individualmente, presentando un patrón cíclico de expresión génica con un periodo aproximado de 24 horas. En el cuerpo, las células SCN reciben impulsos neuronales desde la retina, acoplándolas al ciclo diario de luz y oscuridad, y envían información sobre el momento del día a otra área del cerebro, la glándula pineal, que informa de la señal temporal al resto del cuerpo mediante la liberación de la hormona melatonina de forma acoplada temporalmente al reloj.

Pese a que en los mamíferos las células SCN desempeñan un papel central como ajustadoras del tiempo, no son las únicas células del cuerpo de los mamíferos que presentan un reloj circadiano interno o la capacidad de reajustarse en respuesta a la luz. De forma parecida, muchos tipos distintos de células de *Drosophila*, incluyendo células del tórax, del abdomen, de las antenas, de las patas, del ala y de los testículos, mantienen un ciclo circadiano cuando se las extrae del resto de la mosca. Los relojes que funcionan en estos tejidos aislados, como en el caso de las células SCN, pueden ser reajustados por ciclos externos de luz y oscuridad.

Por lo tanto, la actividad de los relojes circadianos es un problema fundamental de la biología celular. Pese a que no conocemos aún todos sus detalles, los estudios realizados en una amplia variedad de organismos han mostrado muchos de sus principios básicos y de sus componentes moleculares. La mayoría de lo que conocemos de animales procede de estudios en *Drosophila* a través de mutaciones que hacen que el reloj circadiano tenga un funcionamiento más rápido, más lento o que se detenga; estos trabajos dieron lugar al descubrimiento de que muchos de sus componentes también están implicados en el reloj circadiano de los mamíferos.

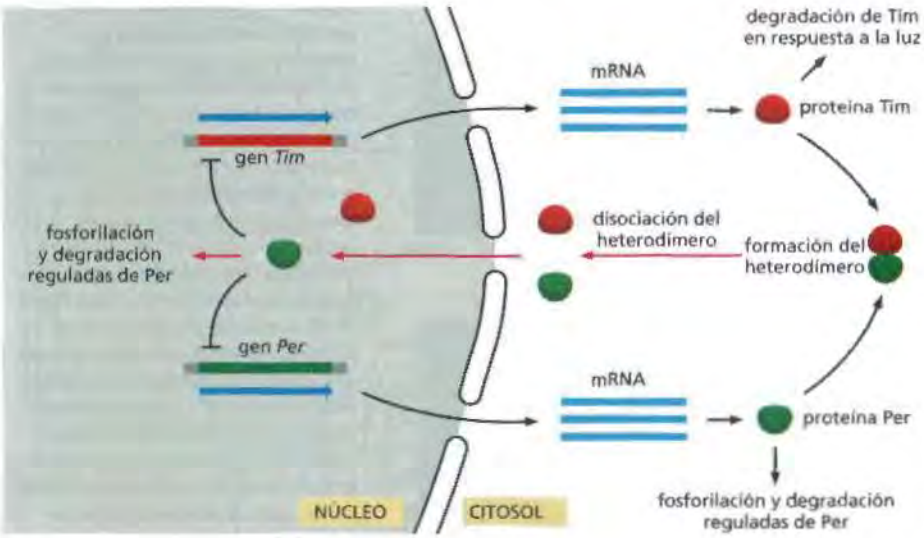


Figura 7–73 Esquema simplificado del mecanismo de reloj circadiano en las células de *Drosophila*. Una característica central del reloj es la acumulación y disminución periódicas de dos proteínas reguladoras de genes, Tim (forma corta de *timeless*, sin tiempo, en base al fenotipo de una mutación génica) y Per (forma corta de periodo). Los mRNA que codifican estas proteínas se traducen en el citosol y, cuando cada proteína se ha acumulado hasta un nivel crítico, forman heterodímeros. Pasado un tiempo de retraso, el heterodímero se disocia y Tim y Per son transportadas al núcleo, donde regulan un conjunto de productos génicos que median efectos del reloj. Una vez en el núcleo, Per también reprime los genes *Tim* y *Per* y genera un sistema de retroinhibición que da lugar a que los niveles de Tim y Per disminuyan. Además de esta retroinhibición transcripcional, el reloj depende de un conjunto de otras proteínas. Por ejemplo, la degradación controlada de Per indicada en el diagrama impone retrasos en la acumulación periódica de Tim y de Per, lo cual es crucial para el funcionamiento del reloj. Las etapas en las que se establecen los retrasos específicos se muestran en *rojo*.

Se produce un ajuste (reseteo) del reloj en respuesta a nuevos ciclos de luz-oscuridad. Pese a que la mayoría de las células de *Drosophila* no tienen fotorreceptores auténticos, la luz es detectada por flavoproteínas intracelulares, también conocidas como criptocromos. En presencia de luz, estas proteínas se asocian con la proteína Tim y provocan su degradación, dando lugar a un reajuste del reloj. (Adaptado de J.C. Dunlap, *Science* 311:184-186, 2006. Con la autorización de AAAS.)

Un esquema del mecanismo del reloj de *Drosophila* (que se resume en la **Figura 7-73**), permite observar que en el centro del oscilador hay un circuito de retroalimentación que tiene un retraso temporal asociado: la acumulación de determinados productos génicos clave inhibe la transcripción de sus genes, pero con cierto retraso, de forma que –hablando en términos generales– la célula oscila entre un estado en el que los productos se hallan presentes y la transcripción está inhibida y otro en el que los productos se hallan ausentes y la transcripción está activada.

Pese a la relativa sencillez del principio básico que da lugar a los relojes circadianos, los detalles son complejos. Una de las razones de esta complejidad es que los relojes han de estar protegidos frente a cambios de la temperatura, la cual acelera o hace más lentas las asociaciones moleculares. Tienen que funcionar de forma precisa pero al mismo tiempo tienen que ser capaces de reajustarse. Pese a que aún desconocemos cómo funcionan los relojes biológicos a velocidad constante pese a los cambios de temperatura, el mecanismo de reajuste del reloj en *Drosophila* consiste en la destrucción inducida por la luz de una proteína clave de regulación génica (véase Figura 7–73).

Una sola proteína de regulación génica puede coordinar la expresión de un conjunto de genes

Las células han de ser capaces de activar o reprimir cada uno de sus genes, pero también han de coordinar la expresión de amplios grupos de genes distintos. Por ejemplo, cuando una célula eucariota quiescente recibe una señal para dividirse, muchos genes que no se expresaban hasta ese momento son activados en conjunto y desencadenan los sucesos que darán lugar a la división celular (descritos en el Capítulo 17). Una de las formas que utilizan las bacterias para coordinar la expresión de un conjunto de genes consiste en agruparlos en un *operón* bajo el control de un solo promotor (véase Figura 7–34). Sin embargo, en los eucariotas cada gen se transcribe a partir de un promotor individual.

¿Cómo coordinan, pues, la expresión génica los organismos eucariotas? Éste es un tema especialmente importante porque, como hemos descrito, la mayoría de las proteína reguladoras de genes de los eucariotas actúa formando parte de un comité de proteínas reguladoras, cuyos miembros son necesarios para que el gen se exprese en la célula adecuada, en el momento adecuado, en respuesta a las señales adecuadas y a niveles adecuados. Así, ¿de qué forma las células eucariotas pueden activar grupos enteros de genes de forma rápida y decisiva?

La respuesta es que, aunque el control de la expresión génica sea de tipo combinatorio, el efecto de una sola proteína reguladora de genes puede ser decisivo activando o inhibiendo un gen determinado, sencillamente completando la combinación de proteínas necesaria para una máxima activación o represión del gen. Es una situación análoga a la introducir el último número de una combinación de una caja de caudales: la caja se abrirá con esta simple adición si todos los demás números se han introducido. Además, este último número

puede completar la combinación de distintas cajas. De forma análoga, la adición de una proteína determinada puede activar muchos genes distintos.

Un ejemplo en humanos es el control de la expresión génica por parte de la proteína que constituye el *receptor de glucocorticoides*. Para poderse unir a los lugares de regulación del DNA, primero esta proteína de regulación génica ha de formar un complejo con una molécula de hormona esteroidea del tipo de los glucocorticoides, como por ejemplo el cortisol (véase Figura 15–13). El organismo libera esta hormona en periodos de falta de alimento o intensa actividad física y, entre otras actividades, estimula en las células hepáticas la producción de glucosa a partir de aminoácidos y de otras moléculas pequeñas. Para responder de esta forma, las células hepáticas aumentan la expresión de muchos genes distintos que codifican enzimas del metabolismo u otros productos génicos. Pese a que todos estos genes tienen regiones de control complejas y distintas entre sí, su expresión máxima depende de la unión del complejo hormona-receptor de glucocorticoides a un lugar de regulación del DNA de cada uno de estos genes. Cuando el organismo se ha recuperado y la hormona ya no se halla presente, la expresión de cada uno de estos genes en el hígado deciende a su nivel normal. De esta forma, una sola proteína reguladora de genes puede controlar la expresión de muchos genes distintos (**Figura 7–74**).

Los efectos del receptor de glucocorticoides no están limitados a las células del hígado. En otros tipos celulares, la activación hormonal de esta proteína de regulación génica también produce cambios en los niveles de expresión de muchos genes; sin embargo generalmente los genes afectados son diferentes de los que se afectan en las células hepáticas. Como hemos visto, cada tipo celular tiene un conjunto individualizado de proteínas reguladoras y, debido al control combinatorio, estas proteínas influyen de forma crítica sobre la acción del receptor de glucocorticoides. Dado que el receptor es capaz de unirse a muchos conjuntos diferentes de proteínas reguladoras específicas del tipo celular, su activación con hormonas produce en cada tipo celular un espectro de efectos diferente.

La expresión de una proteína reguladora crítica puede disparar la expresión de una batería de genes situados corriente abajo

La capacidad de activar o de inhibir muchos genes de forma coordinada no sólo es importante para la regulación del día a día de la función celular. También constituye el mecanismo mediante el cual las células eucariotas se diferencian en tipos celulares especializados durante el desarrollo embrionario. El desarrollo del músculo proporciona un ejemplo destacado de este proceso.

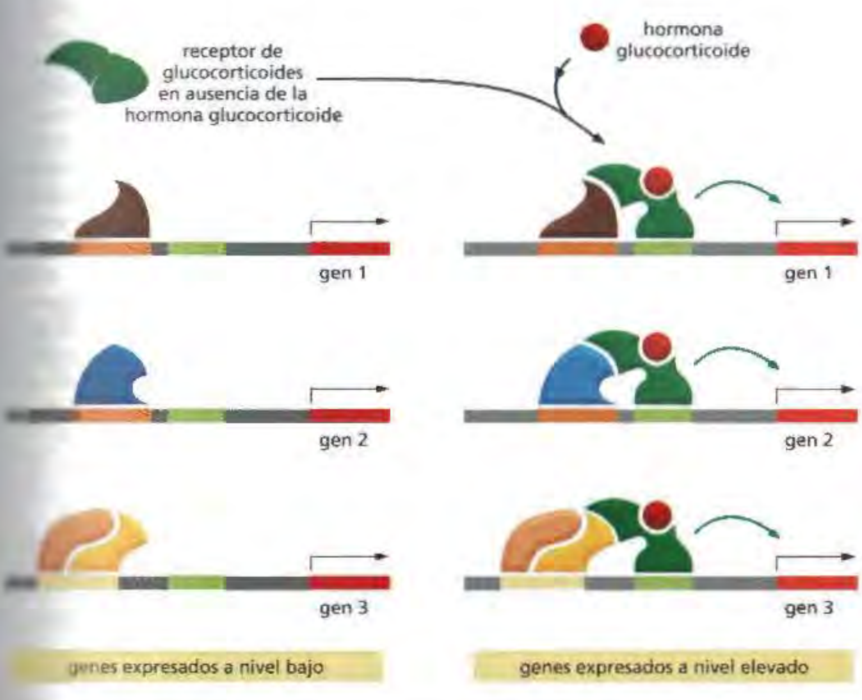


Figura 7–74 Una sola proteína de regulación génica coordina la expresión de varios genes distintos. Se ilustra de una forma esquemática la acción del receptor de glucocorticoides. A la izquierda se muestra una serie de genes, cada uno de los cuales tiene varias proteínas activadoras de genes unidas a su región reguladora. No obstante, estas proteínas reguladoras no bastan por sí mismas para activar plenamente la transcripción. A la derecha se muestran los efectos de añadir una proteína reguladora de genes adicional –el receptor específico de glucocorticoides formando complejo con la hormona glucocorticoide– que puede unirse a la región reguladora de cada gen. El receptor de glucocorticoides completa la combinación de proteínas reguladoras de genes necesaria para que se produzca el inicio máximo de la transcripción, y así los genes son activados en conjunto. En ausencia de la hormona, el receptor de glucocorticoides es incapaz de unirse al DNA.

Además de activar la expresión de los genes, la forma de este receptor de glucocorticoides unida a la hormona reprime la transcripción de ciertos genes, según las proteínas reguladoras que se encuentren ya presentes en las regiones de control. Por lo tanto, el efecto del receptor de glucocorticoides dependerá del tipo de célula, de las proteínas reguladoras de genes que haya en ella y de la región reguladora del gen. La estructura de la parte del receptor de glucocorticoides que se une al DNA, se muestra en la Figura 7–16.

Como hemos descrito en el Capítulo 16, una fibra muscular de mamífero es una célula gigante muy peculiar, formada por la fusión de muchas células precursoras denominadas *mioblastos*, que, por lo tanto, contiene muchos núcleos. La fibra muscular madura sintetiza un gran número de proteínas características, que incluyen tipos específicos de actina, miosina, tropomiosina y troponina (todas ellas forman parte del sistema contráctil), creatina fosfoquinasa (propia del metabolismo típico de las células musculares) y receptores de acetilcolina (que hacen que la membrana sea sensible a la estimulación nerviosa). En mioblastos proliferantes estas proteínas específicas de músculo y sus mRNA están ausentes o se encuentran presentes en baja concentración. Cuando los mioblastos empiezan a fusionarse unos con otros, todos estos genes se activan mediante un proceso coordinado que es parte de la transformación general que presenta su patrón de expresión génica.

Todo este programa de diferenciación del músculo se puede disparar en fibroblastos de la piel en cultivo y en algunos otros tipos celulares, mediante la introducción de cualquier gen que codifique uno de los miembros de una familia de proteínas hélice-bucle-hélice: las denominadas *proteínas miogénicas* (p.ej. MyoD, Myf5, MyoG y Mrf4), que normalmente sólo se expresan en fibras musculares (**Figura 7–75A**). En el DNA adyacente a muchos genes característicos de músculo, se pueden detectar secuencias de unión a estas proteínas; las proteínas miogénicas activan de este modo directo la transcripción de estos genes. Además, las proteínas miogénicas estimulan su propia transcripción así como la de otras proteínas reguladoras de genes implicadas en el desarrollo del músculo esquelético, generando una compleja serie de circuitos de retroalimentación positiva y de alimentación hacia adelante que amplifican y mantienen el programa de desarrollo del músculo, incluso cuando la señal inicial ha desaparecido (Figura 7–75B; véase también Capítulo 22).

Es probable que los tipos celulares que se convierten en fibras musculares por las proteínas miogénicas acumulen una serie de proteínas reguladoras que pueden cooperar con las proteínas miogénicas activando los genes específicos del músculo. Otros tipos celulares no se transforman en fibras musculares por acción de miogenina o proteínas relacionadas; probablemente estas células no habían acumulado las otras proteínas reguladoras necesarias.

La transformación de un tipo celular (fibroblasto) en otro (músculo esquelético) mediante la acción de una sola proteína reguladora de genes muestra de nuevo uno de los principios más importantes señalados en este capítulo: diferencias en la expresión génica pueden dar lugar a enormes diferencias entre tipos celulares distintos –de tamaño, forma, propiedades químicas y función.

El control génico combinatorio da lugar a muchos tipos celulares distintos en los organismos eucariotas

Se ha expuesto cómo pueden actuar de modo combinado varias proteínas reguladoras controlando la expresión de un determinado gen. Sin embargo, como demuestra el ejemplo de las proteínas miogénicas, el control combinatorio significa un paso más: no sólo ocurre que cada uno de los genes está regulado por la acción de numerosas proteínas reguladoras, sino que cada proteína reguladora participa en el control de muchos genes. Además, aunque algunas proteínas reguladoras son específicas de un solo tipo celular, es más frecuente que una proteína reguladora determinada esté activa en una variedad de tipos celulares, en diferentes partes del cuerpo y en distintos momentos del desarrollo. En la **Figura 7–76** se ilustra esquemáticamente de qué forma el control génico combinatorio hace posible generar una gran complejidad biológica incluso con un número relativamente reducido de proteínas reguladoras.

El control combinatorio permite que una proteína reguladora dada no tenga necesariamente una función única y claramente definida, como por ejemplo la de activación de un grupo determinado de genes o la de determinación de un cierto tipo celular. Estas proteínas se podrían comparar con las palabras de un idioma: se utilizan con diferentes sentidos en una gran variedad de contextos y raramente se utilizan aisladas; una combinación adecuada de ellas es la que contiene la información necesaria para especificar un proceso de regulación génica.

Uno de los requerimientos del control combinatorio es que muchas proteínas reguladoras de genes tienen que ser capaces de actuar de forma conjunta controlando la tasa final de transcripción. Experimentalmente se ha demostrado que incluso proteínas reguladoras de genes que no tienen relación entre sí y que proceden de especies eucariotas muy distintas pueden cooperar cuando se las introduce en una misma célula. Este hecho refleja el elevado grado de conservación de la maquinaria de la transcripción. Parece ser que el modo de

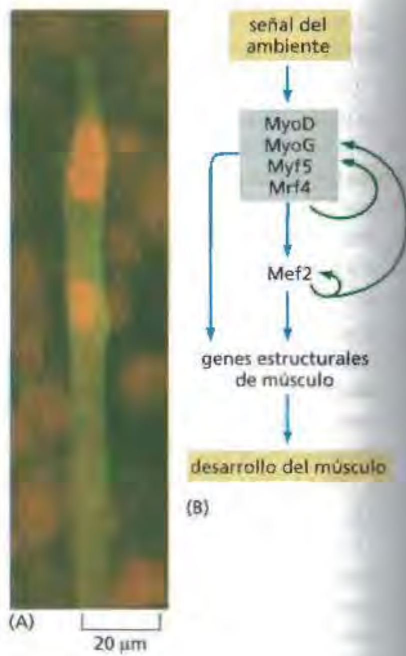


Figura 7–75 Papel que tienen las proteínas reguladoras miogénicas en el desarrollo del músculo. (A) Efecto de la expresión de la proteína MyoD en fibroblastos. Como se muestra en la micrografía mediante inmunofluorescencia, los fibroblastos de la piel de embrión de pollo se han transformado en fibras musculares por efecto de la expresión inducida experimentalmente del gen *MyoD*. Los fibroblastos que han sido inducidos a expresar el gen *MyoD* se han fusionado formando células alargadas, plurinucleadas, de tipo muscular, que se muestran teñidas de *verde* con un anticuerpo que detecta una proteína específica del músculo. Los fibroblastos que no expresan el gen *MyoD* son apenas visibles dentro del conjunto. (B) Esquema simplificado que muestra algunas proteínas reguladoras de genes implicadas en el desarrollo del músculo esquelético. Determinadas señales externas conducen a la síntesis de cuatro proteínas miogénicas reguladoras de genes, MyoD, Myf5, MyoG y Mrf4, muy relacionadas entre ellas. Estas proteínas de regulación génica activan su propia síntesis, y también la de otras proteínas, en una serie de circuitos de retroalimentación complejos, algunos de los cuales se muestran en la figura. Estas proteínas, a su vez, activan de forma directa la transcripción de genes musculares estructurales así como del gen *Mef2*, que codifica otra proteína reguladora de genes. Mef2 actúa en combinación con las proteínas miogénicas en un circuito de alimentación hacia adelante: activa la transcripción de genes estructurales del músculo y genera un bucle de retroalimentación que colabora en el mantenimiento de la transcripción de los genes miogénicos. (A, cortesía de Stephen Tapscott y Harold Weintraub; B, adaptado de J.D. Molkentin y E.N. Olson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 9366-9373, 1996. Con la autorización de National Academy of Sciences.)

acción multifuncional combinatorio de las proteínas reguladoras de genes ha supuesto una estricta limitación para su evolución: han de entrelazarse con otras proteínas reguladoras de genes, con los factores generales de transcripción, con el Mediador, con la RNA polimerasa y con las enzimas de modificación de la cromatina.

Una consecuencia importante del control génico combinatorio es que el efecto de añadir una nueva proteína reguladora a una célula dependerá de la historia anterior de la célula, ya que esta historia determina qué proteínas reguladoras se encuentran ya presentes en la célula. Así, durante el desarrollo una célula puede acumular una serie de proteínas reguladoras que pueden no alterar la expresión génica. La adición de los últimos miembros de la combinación requerida de proteínas reguladoras completa el mensaje regulador y provoca grandes cambios en el patrón de expresión génica. Este modelo, como ya hemos visto, puede explicar el fenómeno de transformación drástica de un fibroblasto en una fibra muscular por la adición de una sola proteína reguladora. Además, podría justificar la diferencia, descrita en el Capítulo 22, entre los procesos de *determinación celular*, por los cuales una célula queda determinada a seguir una cierta ruta de diferenciación y un destino, y el proceso de *diferenciación celular* por el cual una célula determinada expresa su carácter especializado.

Una sola proteína reguladora puede dar lugar a la formación de un órgano completo

A pesar de que lo normal en los genes de los organismos eucariotas es que se regulen por control, una sola proteína reguladora, si completa la combinación adecuada de proteínas reguladoras, puede ser decisiva en la activación o inactivación de un conjunto de genes, o incluso puede transformar un tipo celular en otro. Una extensión de este principio procede de estudios acerca del desarrollo del ojo en *Drosophila*, en el ratón o en humanos. En este caso es crucial una proteína reguladora denominada Ey (abreviatura de *Eyeless*) en moscas y Pax6

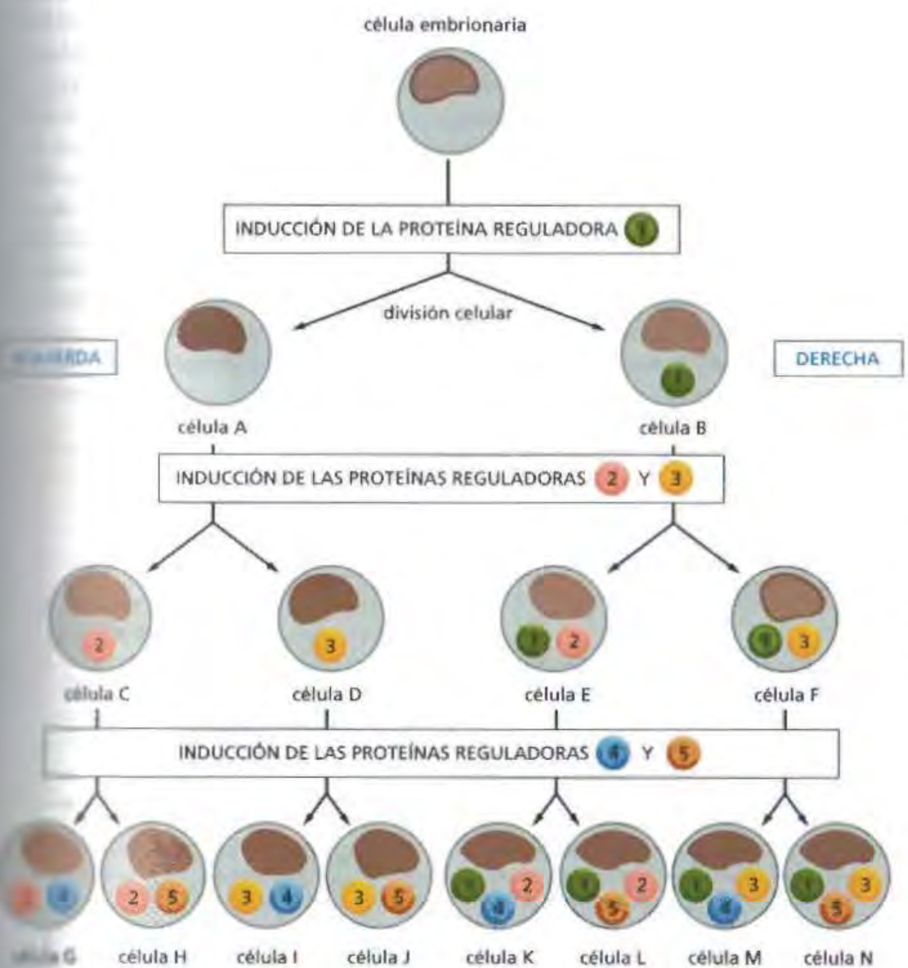


Figura 7–76 La importancia del control combinatorio en el desarrollo. Las combinaciones de unas cuantas proteínas reguladoras pueden generar muchos tipos celulares diferentes durante el desarrollo. En este esquema sencillo, la "decisión" de sintetizar una de entre un par de proteínas reguladoras (representadas por *círculos* numerados) se toma después de cada división celular. Detectando su posición en el embrión, la célula hija situada hacia la *izquierda* del embrión siempre escoge sintetizar la proteína par, mientras que la situada hacia la *derecha* del embrión sintetizará la impar. Se asume que la producción de cada proteína reguladora es autoperpetuante una vez ha sido iniciada. (véase Figura 7-68) De esta forma, mediante la memoria celular, se construye paso a paso una especificación combinatoria final. Es de destacar que en este ejemplo, puramente hipotético, cinco proteínas reguladoras de la expresión génica distintas han generado ocho tipos celulares (G-N).

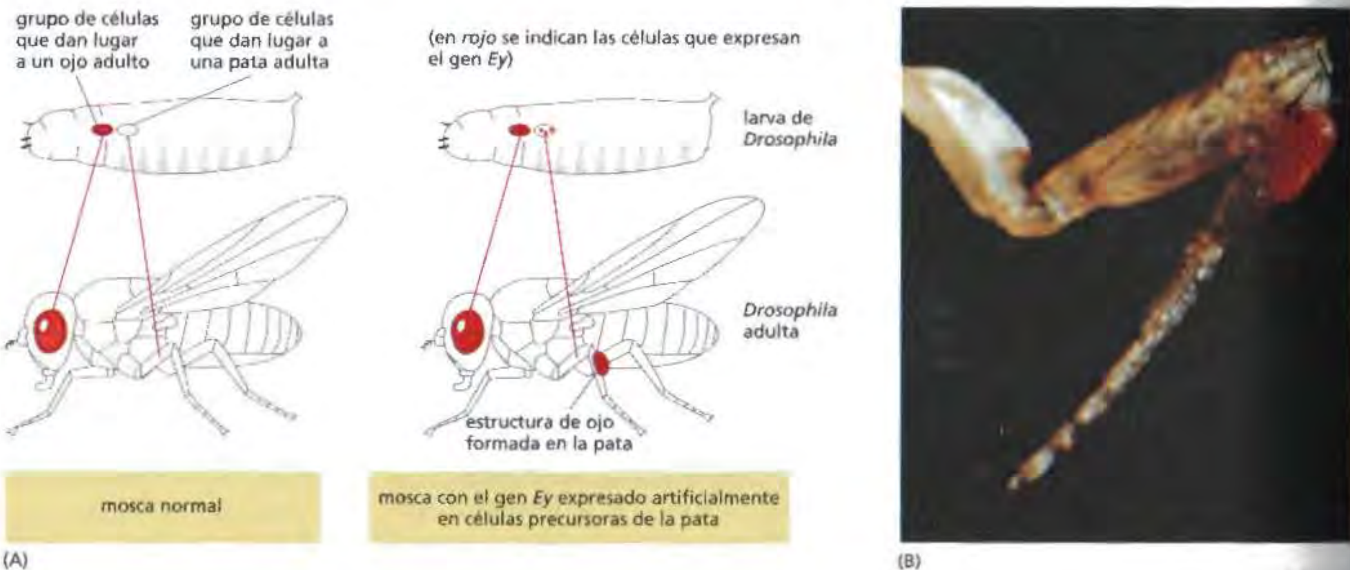


Figura 7–77 La expresión del gen *Ey* de *Drosophila* en células precursoras de la pata origina el desarrollo de un ojo en la pata. (A) Esquemas simplificados de lo que ocurre cuando en una larva de la mosca de la fruta el gen *Ey* se expresa normalmente (*izquierda*) o cuando un gen *Ey* adicional se expresa de forma experimental en células que normalmente dan lugar a tejidos de la pata (*derecha*). (B) Fotografía de una pata anormal que contiene un ojo (véase también la Figura 22–2). (B, cortesía de Walter Gehring.)

en vertebrados. Cuando se expresa en el contexto adecuado, Ey puede desencadenar la formación no únicamente de un solo tipo celular sino también de un órgano completo (un ojo), compuesto de distintos tipos celulares, todos ellos organizados de forma adecuada en el espacio tridimensional.

La evidencia más potente del papel que desempeña Ey en este proceso procede de experimentos en moscas de la fruta en las que durante el desarrollo se les provocó artificialmente la expresión del gen *Ey* de forma prematura en grupos de células que normalmente darían lugar a partes de la pata. Esta expresión anormal del gen provoca el desarrollo de ojos en las patas (**Figura 7–77**).

El ojo de *Drosophila* está compuesto por miles de células, y la cuestión de cómo una proteína coordina la construcción de todo un órgano es una cuestión central de la *biología del desarrollo*. Como se describe en al Capítulo 22, este proceso implica tanto interacciones célula-célula como proteínas intracelulares reguladoras de genes. En este caso, cabe destacar que Ey controla directamente la expresión de muchos otros genes mediante la interacción con sus regiones reguladoras. A su vez, algunos de los genes controlados por Ey codifican proteínas reguladoras de genes que también controlan la expresión de otros genes. Además, algunos de estos productos génicos reguladores actúan sobre el propio gen *Ey* generando un circuito de retroalimentación positiva que asegura la continuidad en la síntesis de la proteína Ey a medida que la célula se va dividiendo y diferenciando (**Figura 7–78**). De esta forma, la acción de una sola proteína reguladora puede activar permanentemente toda una cascada de proteínas reguladoras de genes y de mecanismos basados en interacciones célula-célula, cuyas acciones dan lugar a un grupo organizado de varios tipos celulares. Podemos, pues, empezar a vislumbrar cómo mediante aplicaciones repetidas de este principio, se puede montar pieza a pieza un organismo en toda su complejidad y hasta el más mínimo de sus detalles.

Figura 7–78 Proteínas reguladoras de genes que especifican el desarrollo del ojo en *Drosophila*. *Toy* (*Twin of eyeless*) y *Ey* (*Eyeless*) codifican proteínas reguladoras similares, Toy y Ey, cada una de las cuales puede dar lugar al desarrollo del ojo cuando se expresa ectópicamente. En el desarrollo normal del ojo, la expresión de *Ey* necesita el gen *Toy*. Cuando Toy ha activado su transcripción, Ey activa la transcripción de *So* (*Sine oculis*) y *Eya* (*Eyes absent*) que actúan de forma conjunta y activan el gen *Dac* (*Dachsund*). Como se indica mediante las *flechas verdes*, algunas de las proteínas reguladoras forman una serie de bucles de retroalimentación positiva entrelazados que refuerzan la decisión inicial de desarrollo del ojo. Se sabe que la proteína Ey se une directamente a muchos genes diana para el desarrollo del ojo, incluyendo los que codifican proteínas del cristalino, rodopsinas y otras proteínas fotorreceptoras. (Adaptado a partir de T. Czerny et al. *Mol. Cell* 3: 297-307, 1999. Con la autorización de Elsevier.)



Cuando las células de vertebrados se dividen, pueden heredar el patrón de metilación del DNA

Hasta el momento hemos destacado la regulación de la transcripción génica mediante proteínas que se asocian a DNA. Sin embargo, el propio DNA también se puede modificar de forma covalente. En las secciones siguientes veremos que este fenómeno también puede regular la expresión génica. En vertebrados, la metilación de la citosina constituye un poderoso mecanismo a través del cual las células de la descendencia reciben los patrones de expresión génica. La forma metilada de la citosina, 5-metil-citosina (5-metil C) tiene la misma relación con la citosina que tiene la timidina con el uracilo y, como en aquel caso, no afecta al apareamiento de bases (**Figura 7–79**). La **metilación del DNA** de vertebrados está restringida a los nucleótidos citosina (C) en la secuencia CG, que está apareada con esta misma secuencia (en sentido opuesto) de la otra hebra de la hélice del DNA. Así, un sencillo mecanismo permite que un patrón preexistente de metilación del DNA sea heredado de forma directa por las moléculas de DNA hijas. Una enzima llamada *metil transferasa de mantenimiento* actúa preferentemente sobre las secuencias CG apareadas previamente con una secuencia CG metilada. A consecuencia de ello, el patrón preexistente de metilación de la cadena paterna de DNA actúa como un molde para la metilación de las cadenas de DNA hijas, haciendo que el patrón sea heredado directamente a través de la replicación del DNA (**Figura 7–80**).

La herencia estable de los patrones de metilación del DNA puede explicarse por las metil transferasas de mantenimiento de DNA. Sin embargo, los patrones de metilación del DNA son dinámicos durante el desarrollo de los vertebrados. Poco tiempo después de la fecundación se produce un proceso global de desmetilación del conjunto del genoma durante el cual son eliminados la gran mayoría de grupos metilo del DNA. Esta desmetilación puede darse por una supresión de la actividad metil transferasa de mantenimiento, lo cual da lugar a una pérdida pasiva de grupos metilo en cada ciclo de replicación del DNA o mediante una enzima desmetiladora. Más tarde durante el desarrollo, se establecen nuevos patrones de metilación debido a la acción de varias *DNA metil transferasas de novo*, las cuales son dirigidas hacia el DNA por proteínas de unión al DNA, donde modifican los nucleótidos CG. Cuando se han establecido los nuevos patrones de metilación, se propagan a lo largo de ciclos de replicación del DNA mediante las metil transferasas de mantenimiento.

La metilación del DNA tiene distintas utilidades en las células de los vertebrados. Tal vez el papel más importante sea el de actuar en combinación con otros mecanismos de control de la expresión génica y establecer una forma especialmente eficiente de represión génica que puede pasarse fielmente a las células de la descendencia (**Figura 7–81**). Esta combinación de mecanismos asegura que algunos genes eucariotas innecesarios puedan ser reprimidos de forma muy marcada. Por ejemplo, la velocidad a la que se transcribe un gen de vertebrado puede tener una variación del orden de 10^6 entre un tejido y otro. Los genes no expresados de los vertebrados son mucho menos "permeables" en términos de transcripción que los genes procariotas, en los que las diferencias de velocidad de transcripción más grandes que se conocen entre el estado génico de expresión y el estado de no expresión son del orden de 1000.

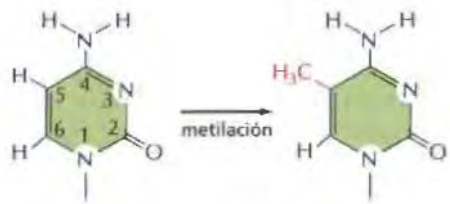
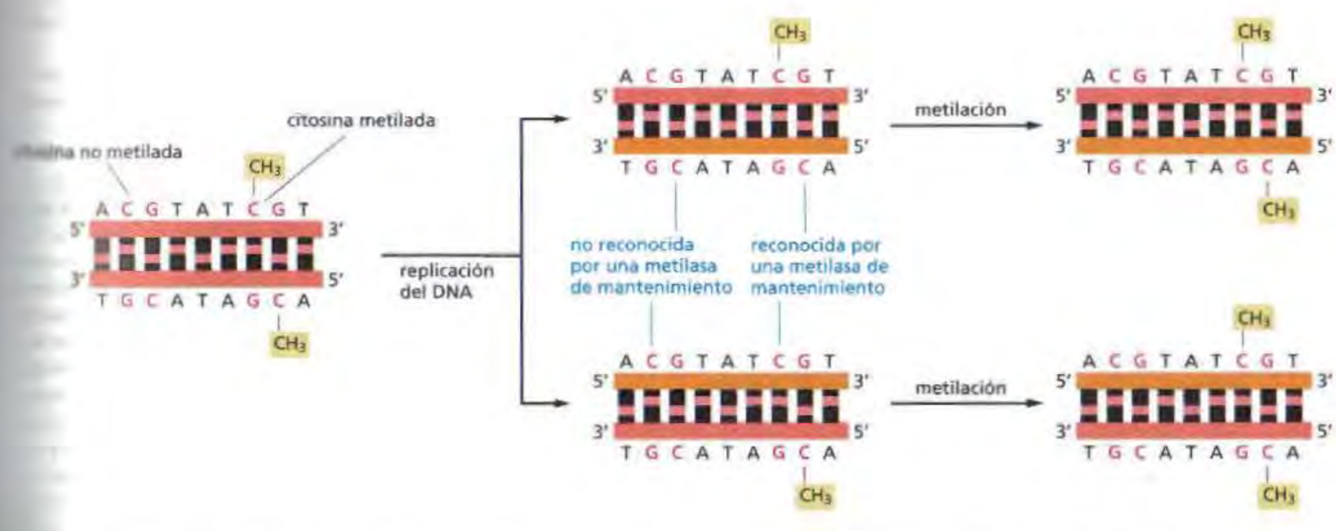


Figura 7–79 Formación de 5-metilcitosina por metilación de una citosina en la doble hélice del DNA. En los vertebrados, este fenómeno está restringido a determinadas citosinas (C) que forman parte de la secuencia CG.

Figura 7–80 De qué forma se pueden heredar con precisión los patrones de metilación del DNA. En los DNA de vertebrados, una gran cantidad de las bases de citosina de la secuencia CG están metiladas (véase Figura 7–79). Dada la existencia de una enzima metilante dirigida por grupos metilo (la metilasa de mantenimiento), cuando se ha establecido un determinado patrón de metilación del DNA, se hereda en el DNA descendiente, tal como se muestra.



Todavía no se conoce con detalle de qué forma la metilación del DNA ayuda a reprimir la expresión génica, pero han aparecido dos mecanismos generales. La metilación del DNA de la región promotora de un gen o de sus secuencias reguladoras puede interferir directamente con la unión de proteínas necesarias para la iniciación de la transcripción. Además, la célula tiene un repertorio de proteínas que se unen específicamente a DNA metilado (véase Figura 7-81), de forma que bloquean el acceso de otras proteínas. Un reflejo de la importancia de la metilación del DNA en humanos es la gran implicación que tienen los errores en este mecanismo en la progresión del cáncer (véase Capítulo 20).

Más adelante en este mismo capítulo volveremos a la cuestión del silenciamiento génico por metilación del DNA, cuando tratemos de la inactivación del cromosoma X y de otros ejemplos de silenciamiento génico a gran escala. Sin embargo, primero describiremos algunas de las otras formas en las que la metilación de DNA afecta a nuestros genomas.

La impronta genómica se basa en la metilación del DNA

Las células de los mamíferos son diploides, contienen un grupo de genes heredados del padre y otro grupo de genes heredados de la madre. La expresión de una minoría de genes depende de si se han heredado del padre o de la madre: mientras que la copia heredada del padre está activa, la heredada de la madre está inactiva, o a la inversa. Este fenómeno se denomina **actividad genómica heredable** o **impronta genómica** (*genomic imprinting*). El gen

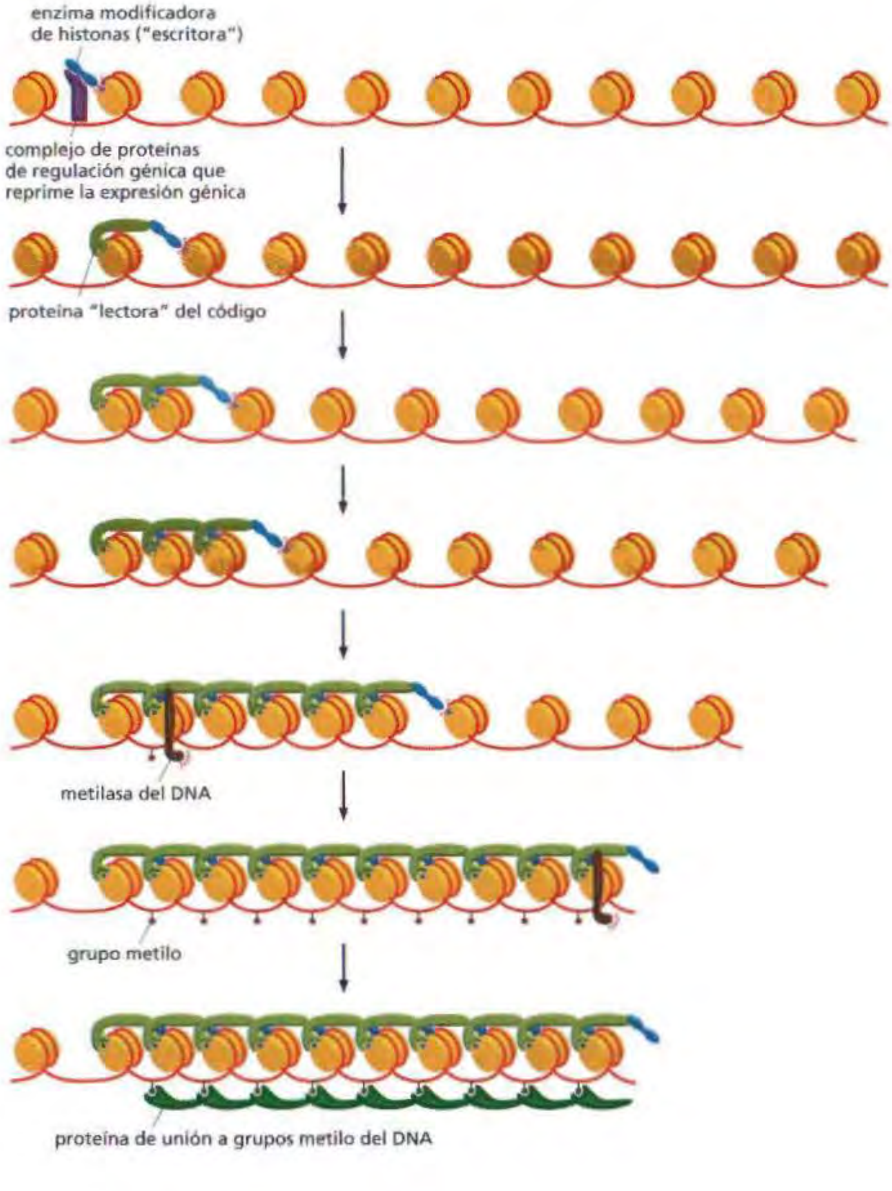


Figura 7-81 Varios mecanismos contribuyen a estabilizar la represión génica. En este ejemplo esquemático, las proteínas de lectura y escritura de las histonas, bajo la dirección de proteínas de regulación génica, estabilizan una forma represiva de la cromatina. La proteína de lectura atrae una DNA metilasa *de novo* que metila las citosinas cercanas del DNA, a las cuales, a su vez, se unen proteínas de unión a grupos metilo del DNA. Durante el proceso de replicación del DNA, algunas de las histonas modificadas (punto *azul*) serán heredadas por un cromosoma de la célula hija, otras serán heredadas por el otro cromosoma, y en cada célula hija pueden inducir la reconstrucción del mismo patrón de modificaciones de la cromatina (véase Figura 5-39). Al mismo tiempo, el mecanismo mostrado en la Figura 7-80 provocará que los dos cromosomas de la célula hija hereden el mismo patrón de metilación. Los dos mecanismos de herencia se apoyarán mutuamente, si la metilación del DNA estimula la actividad de la histona de escritura. Este esquema puede explicar la herencia de las modificaciones tanto de las histonas como del DNA en las células hijas. También puede explicar la tendencia de algunas modificaciones de la cromatina a extenderse a lo largo del cromosoma (véase Figura 4-45).

El *factor de crecimiento similar a la insulina-2* (*Igf2*: ***insulin-like growth factor-2***) es un ejemplo bien estudiado de gen sujeto a impronta. Para el crecimiento prenatal se necesita *Igf2*: los ratones que no expresan nada de *Igf2* tienen al nacer un tamaño que es la mitad que el de los ratones normales. Sin embargo, sólo se transcribe la copia del gen *Igf2* paterno y para el fenotipo sólo resulta importante esta copia del gen. En consecuencia, los ratones que presentan un gen *Igf2* mutado procedente del padre son raquíticos, mientras que los ratones con un gen *Igf2* mutado procedente de la madre son normales.

En el embrión temprano, los genes sujetos a impronta se marcan mediante metilación en función de si derivan de un cromosoma del óvulo o del espermatozoide. De esta forma, se utiliza la metilación del DNA como marca distintiva de las dos copias del gen, que de

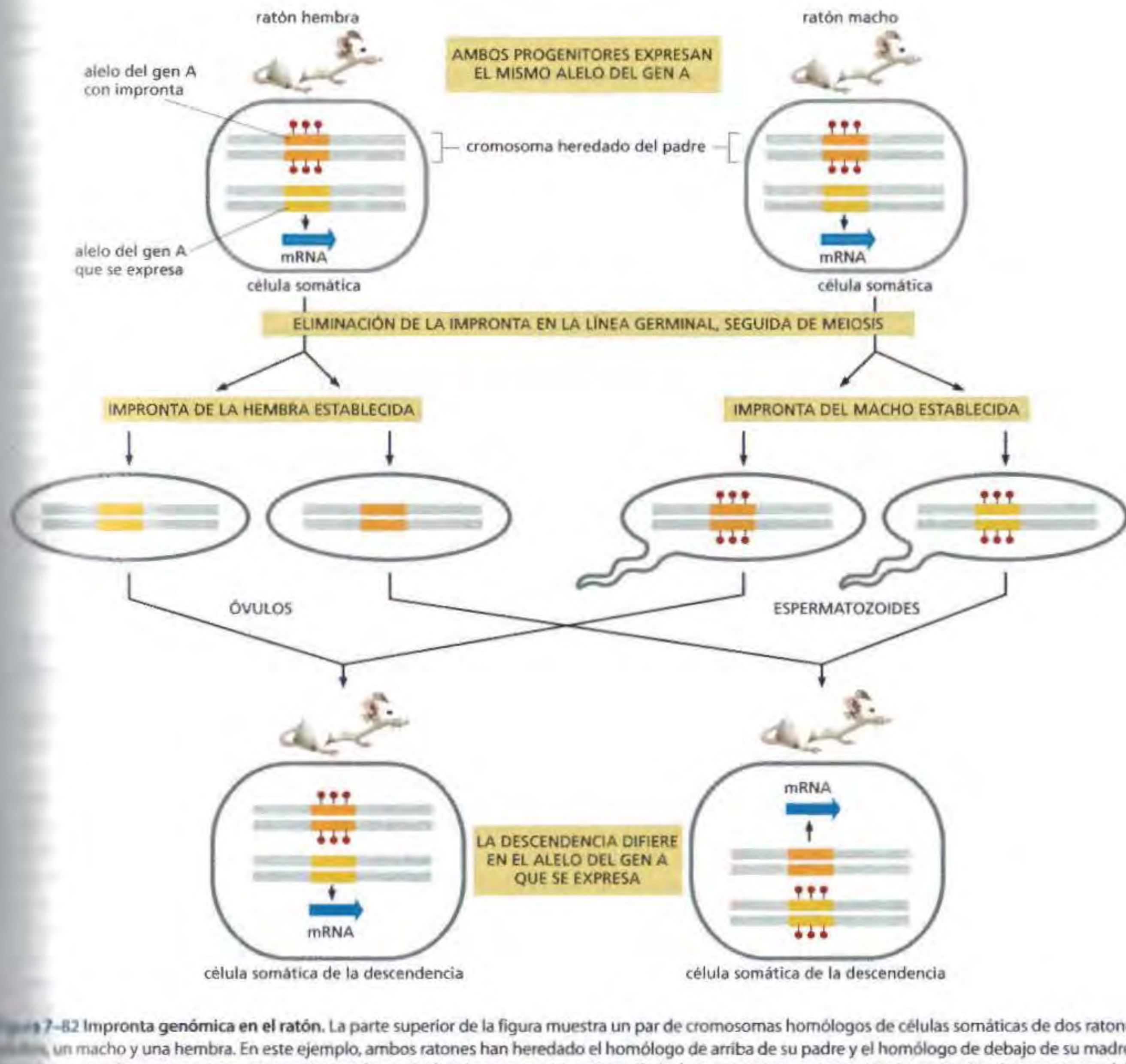


Figura 7-82 Impronta genómica en el ratón. La parte superior de la figura muestra un par de cromosomas homólogos de células somáticas de dos ratones adultos, un macho y una hembra. En este ejemplo, ambos ratones han heredado el homólogo de arriba de su padre y el homólogo de debajo de su madre; la copia paterna de un gen sujeto a impresión genómica (indicado en *naranja*) está metilado, lo que suprime su expresión. La copia de origen materno del mismo gen (*amarillo*) se expresa. El resto de la figura muestra el resultado del cruzamiento de estos dos ratones. Durante la formación de la línea germinal, pero antes de la meiosis, las improntas son eliminadas y después, mucho más tarde en el desarrollo de la línea germinal, son reestablecidas en un patrón dependiente del sexo (parte *central* de la figura). En los óvulos producidos por la madre, ningún alelo del gen A se halla metilado. En los espermatozoides de los machos, ambos alelos del gen A están metilados. En la parte *inferior* de la figura se muestran dos posibles patrones de impronta genómica heredados por los descendientes, el ratón a la *izquierda* tiene el mismo patrón de impronta que cada uno de sus padres, mientras que el ratón de la *derecha* tiene un patrón opuesto. Si los dos alelos del gen A son distintos, estos patrones diferentes de impronta pueden dar lugar a diferencias de fenotipo en los ratones de la descendencia pese a que posean las mismas secuencias de DNA en los dos alelos del gen A. La impronta genómica proporciona una importante excepción al comportamiento genético clásico. Se cree que varios cientos de genes del ratón están afectados por este fenómeno. Sin embargo, la mayoría de los genes del ratón no tiene impronta por lo que las reglas de la herencia mendeliana se pueden aplicar a la mayor parte del genoma del ratón.

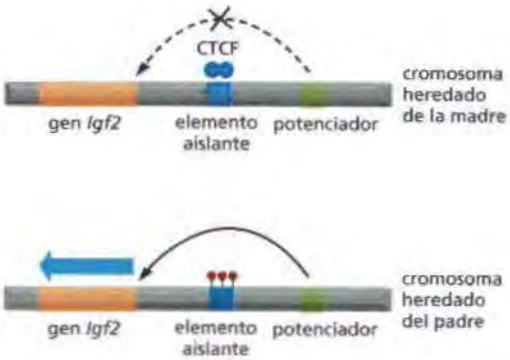


Figura 7–83 Mecanismos de marcaje en el gen *Igf2* del ratón. Una proteína denominada CTCF se une a un elemento aislante en los cromosomas heredados de la hembra (véase Figura 7–62) y bloquea la comunicación entre el potenciador (*verde*) y el gen *Igf2* (*naranja*). Así, IGF2 no se expresa a partir del cromosoma heredado de la madre. A causa de la impronta genómica, el aislante heredado del cromosoma de origen paterno está metilado; este hecho inactiva el aislante mediante el bloqueo de la unión a la proteína CTCF, lo cual activa la transcripción del gen *Igf2*. En otros ejemplos de impronta genómica, la metilación bloquea la expresión génica al interferir en la unión de proteínas que se necesitan para la transcripción de un gen.

otro modo serían idénticas (**Figura 7–82**). Debido a que los genes sometidos a impronta se hallan de alguna forma protegidos de la oleada de desmetilación que ocurre al poco tiempo de la fecundación (véase p. 467), esta impronta permite a las células somáticas "recordar" el origen paterno o materno de cada una de las dos copias del gen y regular su expresión de acuerdo con ello. En muchos casos, la impronta por metilación prácticamente silencia la expresión génica. Sin embargo, en algunos casos la impronta por metilación puede activar la expresión de un gen. En el caso de *Igf2*, por ejemplo, la metilación de un elemento aislante (véase Figura 7–62) del cromosoma de origen paterno bloquea su función, lo que permite que un activador distante active la transcripción del gen *Igf2*. En el cromosoma procedente de la madre, el aislante no se metila de forma que el gen *Igf2* no se transcribe (véase **Figura 7–83**).

No conocemos por qué se produce la impronta del genoma. En vertebrados se halla restringida a los mamíferos placentarios, y muchos de los genes objeto de impronta se hallan implicados en el desarrollo fetal. Una posibilidad es que la impronta refleje un estadio evolutivo intermedio dentro de la oposición entre machos, interesados en dar lugar a una progenie lo más amplia posible, y hembras interesadas en limitar el número de la progenie. Sea cual sea su función, la impronta del genoma constituye una evidencia clara de que pueden heredarse características del DNA que no consisten en su secuencia nucleotídica.

En los mamíferos, las islas ricas en CG se asocian con muchos genes

Debido al funcionamiento de la vía de reparación de DNA, los residuos C metilados del genoma tienden a ser eliminados durante la evolución. La desaminación accidental de una C no-metilada da lugar a U (véase Figura 5–45), base que por lo general no está presente en el DNA, por lo que es reconocida fácilmente por la enzima de reparación de DNA, la uracilo DNA glucosilasa, que la elimina y la reemplaza por una C (se describe en el Capítulo 5). Pero la desaminación accidental de una 5-metil C no puede ser reparada de este modo, porque el producto de la desaminación es una T que, por lo tanto, no se puede diferenciar de los otros residuos T no mutados del DNA. Aunque existe un sistema especial de reparación para eliminar estos nucleótidos T mutantes, muchas de las desaminaciones escapan a la detección. Así pues, los residuos C del genoma que están metilados tienden a mutar a T durante la evolución.

A lo largo de la evolución más de tres de cada cuatro CG se han perdido por este sistema, dejando a los vertebrados con una deficiencia remarcable de este dinucleótido. Las secuencias CG que todavía existen están distribuidas de una forma desigual por el genoma; en determinadas regiones, de 1000 a 2000 pares de bases de longitud, las secuencias CG están presentes a densidades de entre 10 y 20 veces la densidad media de todo el genoma; estas zonas reciben el nombre de **islas CG**. Estas islas, con algunas notables excepciones, parecen mantenerse no metiladas en todos los tipos celulares. Se ha observado que rodean los promotores de los llamados *genes constitutivos (housekeeping genes)*: genes que codifican el elevado número de proteínas que son esenciales para la viabilidad celular y que, por lo tanto, se expresan en muchas células (**Figura 7–84**).

La distribución de las islas CG (también llamadas islas CpG para diferenciar entre la secuencia de los dinucleótidos CG de los pares de bases CG) puede explicarse si se asume que la metilación CG fue adoptada en vertebrados como un mecanismo para mantener el DNA

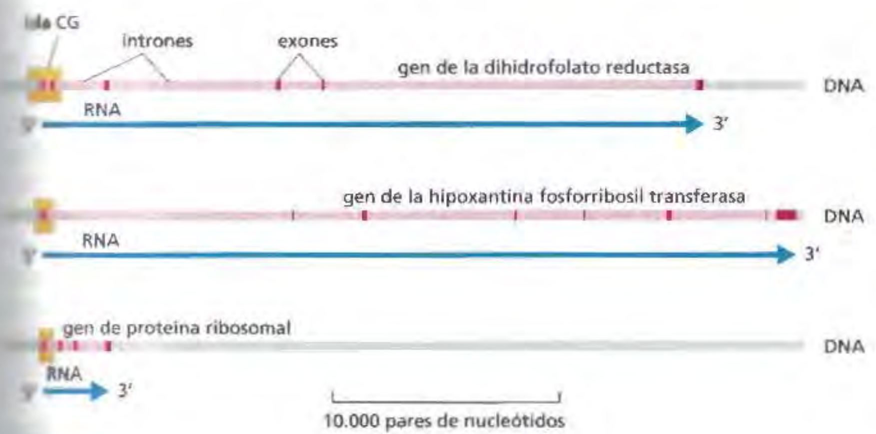


Figura 7–84 Islas CG alrededor de los promotores en tres genes constitutivos de mamíferos. Los *rectángulos amarillos* muestran la longitud de cada isla. Como ocurre con la mayoría de los genes de mamífero, los exones (*rojo oscuro*) son cortos en relación a los intrones (*rojo claro*). (Adaptado de A.P. Bird, *Trends Genet.* 3:342-347, 1987. Con la autorización de Elsevier.)

estado de transcripción inactiva (véase Figura 7–81). En los vertebrados, las mutaciones nuevas de metil-C a T pueden ser transmitidas a la siguiente generación sólo si se producen en la línea germinal, línea celular que origina los óvulos y los espermatozoides. La mayoría del DNA de las células germinales de los vertebrados se halla inactivo y está altamente metilado. Durante largos periodos de la evolución, las secuencias CG metiladas de estas regiones inactivas se han perdido debido a procesos espontáneos de desmetilación que no han sido corregidos adecuadamente. No obstante, los promotores de genes que permanecen activos en las líneas celulares germinales (incluyendo los genes de mantenimiento) se mantienen en estado desmetilado, de forma que las desaminaciones espontáneas de C pueden ser reparadas de forma adecuada. En los vertebrados actuales, estas regiones se hallan preservadas mediante islas CG (**Figura 7–85**). Además, cualquier mutación de una secuencia CG del genoma que destruya la función o la regulación de un gen en el adulto sufrirá una selección negativa; probablemente algunas islas CG son el resultado de una densidad incrementada de secuencias CG críticas para estos genes.

El genoma de mamífero contiene un número estimado de 20.000 islas CG. La mayoría de las islas marcan los extremos 5' de la unidad de transcripción y, por lo tanto, probablemente del gen. De esta forma, la presencia de islas CG da lugar a sistemas útiles para identificar genes dentro de la secuencia del DNA de los genomas de vertebrados.

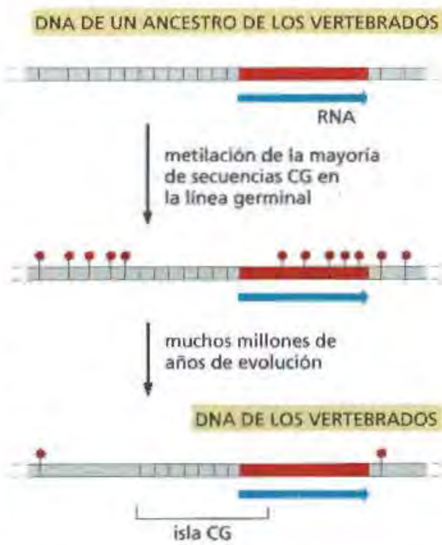


Figura 7–85 Un mecanismo que explica tanto las marcadas deficiencias de secuencia CG como su agrupación en islas CG en los genomas de los vertebrados. Las *líneas negras* marcan la localización de un dinucleótido CG en la secuencia de DNA mientras que los *"chupa-chups" rojos* indican la presencia de un grupo metilo en el dinucleótido CG. Las secuencias CG que se hallan en las secuencias reguladoras de genes que se transcriben en la línea germinal no están metiladas y, por tanto, tienden a mantenerse durante la evolución. Por su parte, las secuencias CG metiladas, tienden a eliminarse por desaminación de la 5-metil-C a T, a menos que la secuencia CG sea esencial para la supervivencia.

Los mecanismos epigenéticos aseguran que se puedan transmitir patrones estables de expresión génica a células hijas

Cuando una célula de un organismo se diferencia a un tipo celular concreto, suele mantenerse como tal célula especializada y, en caso de dividirse, las células hijas mantienen el mismo carácter especializado. Por ejemplo, las células hepáticas, las células pigmentarias y las células endoteliales (descrito en el Capítulo 23) se dividen en varias ocasiones durante la vida de un individuo, produciendo cada uno de los casos células hijas del mismo tipo exacto. Estas células diferenciadas deben recordar su patrón de expresión génica propio y transmitirlo a sus células hijas a lo largo de divisiones celulares posteriores.

Ya hemos descrito distintos mecanismos que permiten que las células hijas "recuerden" qué tipo de células han de ser. Uno de los más sencillos es el circuito de retroalimentación positiva en el que una proteína reguladora de genes activa –sea de forma directa o indirecta– la expresión de su propio gen (véase Figuras 7–68 y 7–69). Circuitos de retroalimentación positiva entrelazados proporcionan incluso más estabilidad amortiguando el circuito contra las fluctuaciones a nivel de cualquiera de las proteínas reguladoras génicas (Figura 7–75B y 7–78). También se señaló previamente que la metilación del DNA puede servir como vía de propagación de los patrones de expresión génica a los descendientes (véase la Figura 7–80).

Los circuitos de retroalimentación positiva y la metilación del DNA están presentes tanto en procariotas como en eucariotas; pero los eucariotas también presentan otro sistema de mantenimiento del estado de diferenciación a través de muchas generaciones celulares. Como explicamos en el Capítulo 4, la propia estructura de la cromatina puede ser propagada con fiabilidad de célula madre a célula hija. Existen varios mecanismos para conseguir este resultado, pero el más sencillo se basa en las modificaciones covalentes de las histonas. Como

hemos visto, estas modificaciones forman un "código de histonas", con patrones de modificación diferentes que actúan como lugares de unión a distintas proteínas de lectura. Si, a su vez, estas proteínas atraen enzimas de escritura que replican los patrones de modificación que las han atraído en primer lugar, entonces la distribución de regiones activas y silenciosas de la cromatina puede propagarse de forma fiable (véase Figura 5-39). De alguna forma, la modificación autosostenida de las histonas es una forma de circuito de retroalimentación positiva que está asociado al DNA, pero que no requiere la participación de secuencias de DNA subyacentes.

La habilidad de las células hijas para retener en la memoria los patrones de expresión génica que estaban en la célula madre es un ejemplo de **herencia epigenética**. Este término tiene significados ligeramente diferentes en las distintas ramas de la biología, pero aquí lo utilizaremos en su sentido más amplio para cubrir cualquier diferencia heredable en el fenotipo de una célula o de un organismo que no proviene de cambios en la secuencia de nucleótidos del DNA (véase Figura 4-35). Acabamos de describir tres de los mecanismos más importantes que conllevan cambios epigenéticos, pero existen más (**Figura 7-86**). Las células suelen combinar estos mecanismos asegurando que los patrones de expresión génica se mantienen y se heredan de forma precisa y fiable; en nuestro caso, a través de periodos de más de cien años.

Durante más de medio siglo, los biólogos se han preocupado del DNA como portador de la información heredable. Sin embargo, se ha hecho evidente que los cromosomas humanos también llevan una gran cantidad de información que es epigenética y que no se encuentra en la propia secuencia de DNA. La impronta genómica es un ejemplo de ello. Otro ejemplo se encuentra en el fenómeno de la *expresión monoalélica*, en la que sólo se expresa una de las dos copias de determinados genes humanos. Para muchos genes, la decisión sobre qué alelo se va a expresar y cuál se va a silenciar, es al azar, pero una vez tomada, esta decisión pasa a las células hijas. A continuación se expone un ejemplo extremo de este fenómeno en la inactivación del cromosoma X.

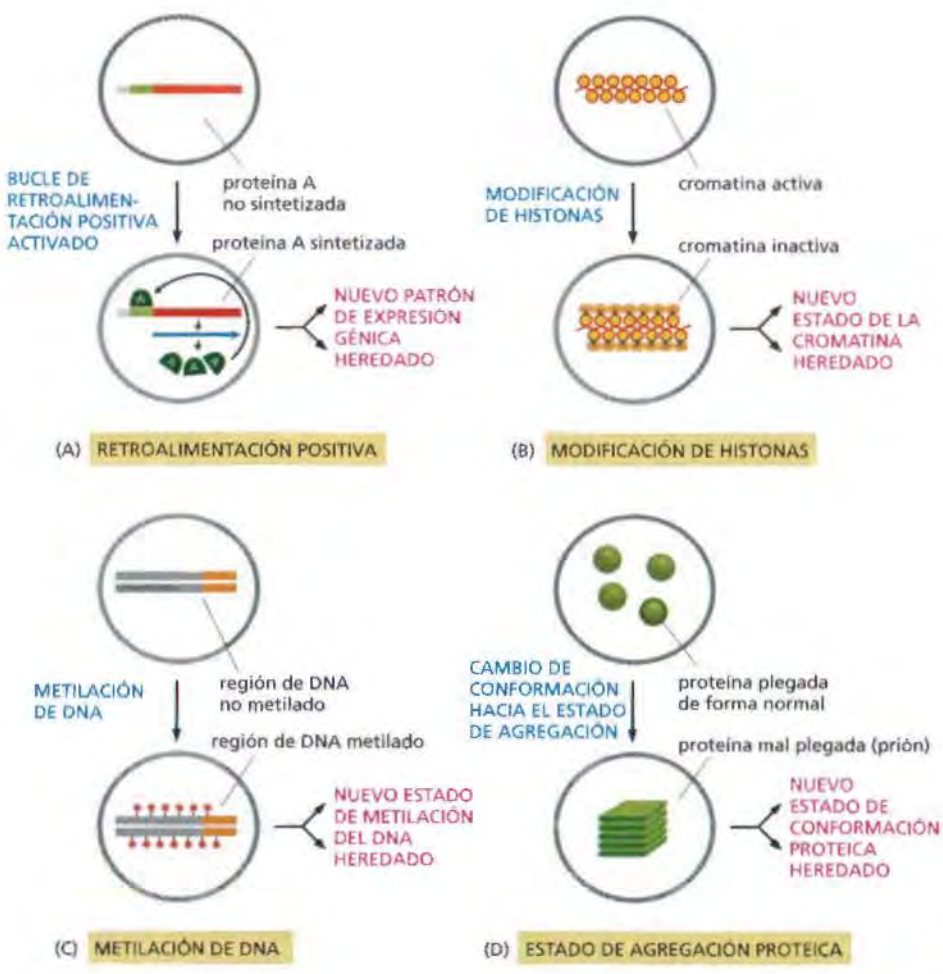


Figura 7-86 Cuatro mecanismos distintos que producen una forma epigenética de herencia en un organismo. (Para la herencia de las modificaciones de histonas, véase Figura 4-52; para la herencia de conformaciones proteicas, véase Figura 6-95.)

El efecto neto de los cambios epigenéticos al azar y los provocados por el ambiente en los humanos se puede detectar comparando gemelos idénticos: sus genomas tienen la misma secuencia de nucleótidos, pero cuando comparamos su modificación de las histonas y los patrones de metilación del DNA, se observan muchas diferencias entre ellos. Dado que estas diferencias se correlacionan de forma aproximada no sólo con la edad sino también con el tiempo que los gemelos han pasado separados uno del otro, parece que algunos de estos cambios son el resultado de factores ambientales (**Figura 7–87**). A pesar de que los estudios del *epigenoma* están todavía en sus prolegómenos, la idea de que los acontecimientos ambientales pueden quedar registrados de forma permanente en nuestras células es fascinante y presenta un reto importante que han de afrontar y resolver las siguientes generaciones de científicos.



Figura 7–87 Gemelos idénticos que han crecido separados el uno del otro. (Cortesía de Nancy L. Segal.)

Pueden heredarse grandes alteraciones cromosómicas en la estructura de la cromatina

Hemos visto que los estados de la cromatina y la metilación del DNA pueden ser heredables y que establecen y preservan patrones de expresión génica en muchas generaciones celulares. Quizás el ejemplo más destacable de este tipo de efectos se da en mamíferos, en los cuales una alteración en la estructura de la cromatina de un cromosoma completo puede modular los niveles de expresión de todos los genes de dicho cromosoma.

Machos y hembras difieren en sus *cromosomas sexuales*. Las hembras tienen dos cromosomas X mientras que los machos tienen un cromosoma Y y un cromosoma X. Por lo tanto, las células de la hembra contienen el doble de copias de los genes del cromosoma X que las de los machos. En los mamíferos, los cromosomas sexuales X e Y difieren completamente en su contenido en genes: el cromosoma X es grande y contiene más de un millar de genes mientras que el cromosoma Y es pequeño y contiene menos de 100 genes. Los mamíferos han desarrollado un mecanismo de *compensación de dosis* para equilibrar la dosis de productos génicos del cromosoma X entre machos y hembras. Las mutaciones que interfieren esta compensación son letales: una relación correcta entre los productos génicos del cromosoma X y los de los *autosomas* (cromosomas no-sexuales) son esenciales para la supervivencia.

Los mamíferos logran la compensación de dosis mediante la inactivación de la transcripción de uno de los dos cromosomas X en las células somáticas femeninas, proceso conocido como **inactivación-X**. En el desarrollo temprano del embrión femenino, cuando está formado por unos cuantos miles de células, uno de los dos cromosomas X de cada célula se condensan en un tipo de heterucromatina. El cromosoma X condensado puede observarse con facilidad en células en interfase mediante el microscopio óptico; originalmente se le denominó *corpúsculo de Barr* y está localizado cerca de la membrana nuclear (**Figura 7–88**). Como consecuencia de la inactivación-X que se produce, dentro de un mismo núcleo pueden coexistir dos cromosomas X que, a pesar de estar expuestos a la acción de las mismas proteínas de regulación génica difusibles, presenten una expresión completamente diferente.

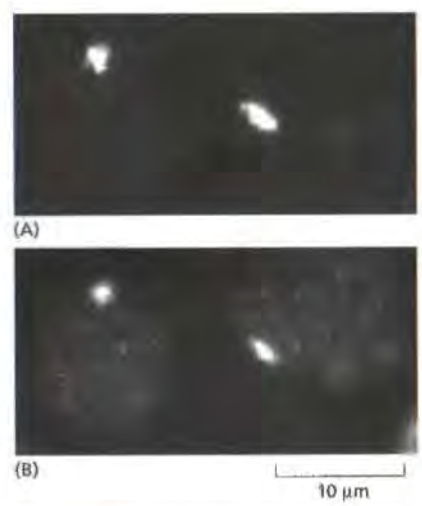


Figura 7–88 Inactivación del cromosoma X en las células femeninas. (A) Sólo el cromosoma X inactivo está cubierto con XIST RNA, visualizado mediante hibridación *in situ* sobre RNA de secuencia nucleotídica complementaria marcado con fluorescencia. El panel muestra los núcleos de dos células adyacentes. (B) La misma muestra, teñida con anticuerpos contra un componente del complejo del grupo Policomb, que cubre el cromosoma X y ayuda a silenciar la expresión de sus genes. (De B. Panning, *Methods Enzymol*. 376:419-428, 2004. Con la autorización de Academic Press.)

La elección inicial del cromosoma X que será inactivado, el heredado de la madre (X_m) o el heredado del padre (X_p), se produce al azar. Una vez inactivado X_m o X_p, se mantiene silencioso a lo largo de todas las divisiones celulares posteriores de esta célula y en toda su progenie, lo cual indica que el estado inactivo se mantiene fielmente a lo largo de muchos ciclos de replicación del DNA y de mitosis. Debido a que la inactivación-X se produce totalmente al azar y cuando ya se han formado varios miles de células en el embrión, cada hembra es un mosaico de grupos clónicos de células en los cuales se ha silenciado o bien X_m o bien X_p (**Figura 7–89**).

En el animal adulto, estos grupos clónicos se distribuyen en pequeños agrupamientos debido a que las células hermanas tienden a mantenerse adyacentes durante las etapas finales del desarrollo. Por ejemplo, la inactivación del cromosoma X causa la coloración de pelo en forma de "caparazón de tortuga" o de "calicó" rojo y negro en algunas gatas. En estos animales, un cromosoma X contiene un gen que produce pelo de color rojo y el otro cromosoma X contiene un alelo de este mismo gen que da lugar a pelo de color negro; así la inactivación-X al azar da lugar a zonas de células con dos colores distintos. A diferencia de las hembras, los gatos macho de este mismo origen genético son o bien de color rojo o bien de color negro, dependiendo de qué cromosoma X determinado heredasen de sus madres.

Pese a que la inactivación del cromosoma X se mantiene a lo largo de miles de divisiones celulares, no siempre es permanente. En concreto, se revierte durante la formación de

células germinales, de forma que todos los oocitos haploides contienen un cromosoma X activo y pueden expresar los productos génicos propios del cromosoma X.

¿Cómo se inactiva para la transcripción un cromosoma entero? La inactivación del cromosoma X se inicia en un solo lugar del centro del cromosoma X, el **centro de inactivación X (XIC;** ***X-inactivation center*****)** y a partir de él se extiende por todo el cromosoma. XIC codifica una molécula poco habitual de RNA, *XIST RNA*, que sólo se expresa a partir del cromosoma X inactivo y cuya expresión es necesaria para la inactivación X. XIST RNA no se traduce a proteína y permanece en el núcleo, donde podría recubrir todo el cromosoma X inactivo. La expansión de XIST mRNA desde XIC a lo largo de todo el cromosoma se correlaciona con la extensión del silenciamiento de los genes, indicando que XIST RNA dirige la formación y extensión de la heterocromatina. Curiosamente, alrededor de un 10% de los genes del cromosoma X escapan a este silenciamiento y permanecen todavía activos (**Figura 7–90**).

Además de contener XIST RNA, la heterocromatina del cromosoma X se caracteriza por presentar una variante específica de la histona 2A; la hipoacetilación de las histonas H3 y H4; la ubiquitinización de la histona 2A; la metilación de la histona H3 en una posición específica, y los patrones específicos de metilación del DNA (para una propuesta sobre cómo estas características pueden estar ligadas de forma causal, véase la Figura 7–81). Probablemente la combinación de todas estas modificaciones hace que la mayor parte del cromosoma X sea especialmente resistente a la transcripción. Dado que estas modificaciones son, al menos en principio, autopropagativas, resulta fácil entender por qué, una vez que se ha formado, un cromosoma X inactivo puede mantenerse estable a través de muchas divisiones celulares.

Muchos aspectos de la inactivación del cromosoma X en mamíferos todavía no han sido descubiertos. ¿Cómo se toma la decisión inicial de cuál será el cromosoma X que se inactive? ¿Qué mecanismos protegen al otro cromosoma X para que no se inactive? ¿De qué

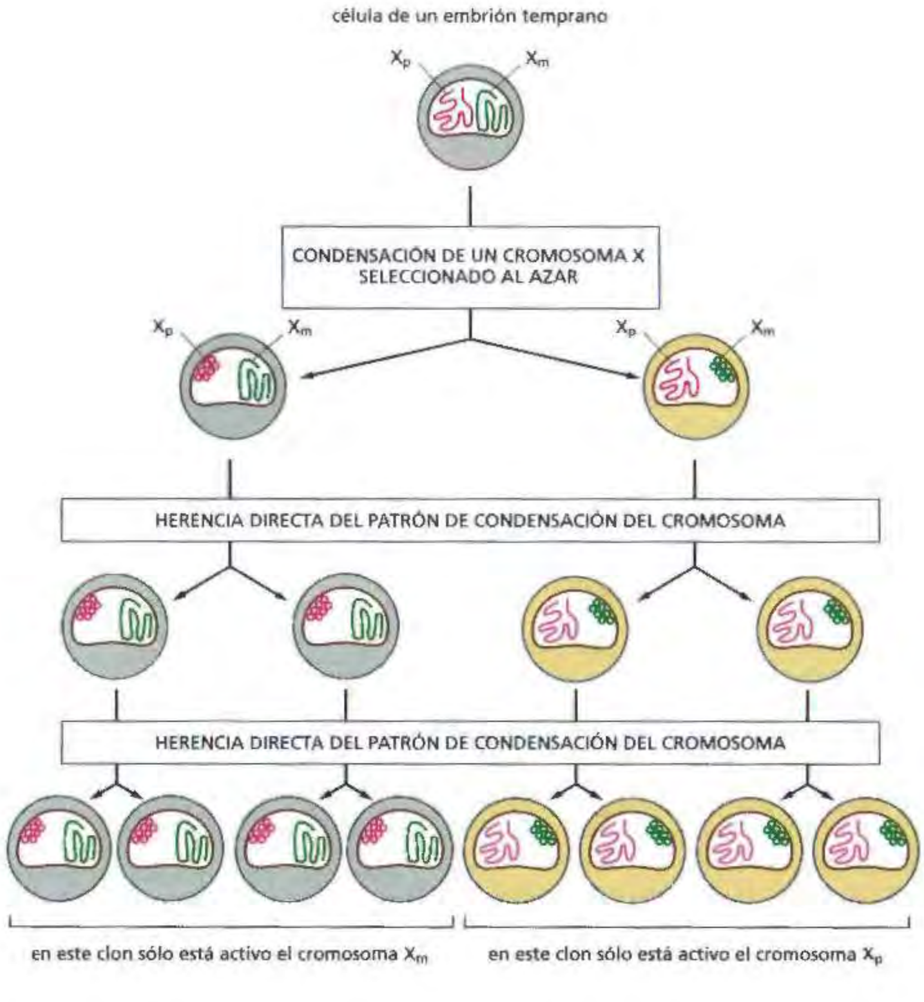


Figura 7–89 Inactivación del cromosoma X. Herencia clonal de un cromosoma X condensado e inactivo que tiene lugar en las hembras de los mamíferos.

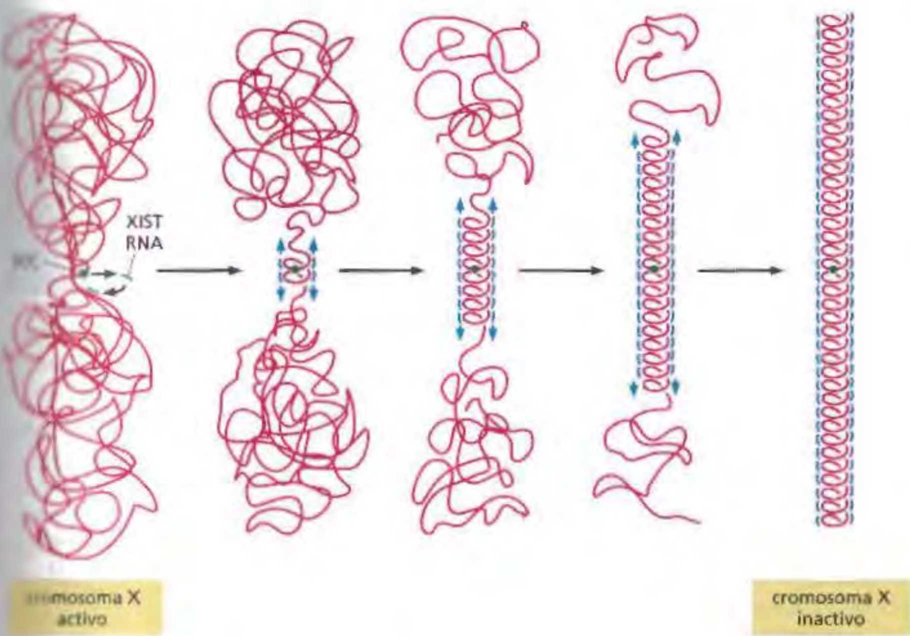


Figura 7–90 Inactivación del cromosoma X en los mamíferos. La inactivación del cromosoma X se inicia con la síntesis del XIST RNA (***X**-inactivation **s**pecific **t**ranscript*; tránscrito específico para la inactivación de X) a partir del locus XIC (***X**-**i**nactivation **c**enter;* centro de inactivación de X). La asociación del XIST RNA con uno de los cromosomas X de la hembra se correlaciona con la condensación de este cromosoma. Al inicio de la embriogénesis, tanto la asociación de XIST como la condensación del cromosoma se desplazan gradualmente a partir del locus XIC en dirección a los extremos del cromosoma. Se desconocen aún los detalles de cómo ocurre este proceso.

forma XIST RNA coordina la formación de la heterocromatina? ¿Cómo consiguen algunos genes del cromosoma X escapar a la inactivación? Estamos tan sólo en el inicio de la comprensión de este mecanismo de regulación génica que es clave para la supervivencia de nuestra propia especie.

La inactivación del cromosoma X es tan sólo uno de los sistemas mediante los que un organismo con reproducción sexual consigue la compensación de dosis. En *Drosophila*, la mayoría de los genes de un solo cromosoma X presentes en células masculinas se transcriben a un nivel aproximadamente dos veces mayor que sus equivalentes en células femeninas. Esta "regulación positiva" de la transcripción específica en los machos se origina por una alteración de la estructura de la cromatina de todo el cromosoma X de los machos. Un complejo de compensación de dosis que contiene varias enzimas y dos RNA no codificantes transcritos a partir del cromosoma X, se ensambla en centenares de posiciones a lo largo del cromosoma X y produce patrones de modificación de las histonas que probablemente regulan de forma positiva la transcripción –mediante efectos en la iniciación o la elongación– en la mayoría de genes del cromosoma X de machos.

El nematodo utiliza una tercera estrategia para la compensación de dosis. En este caso, los dos sexos son el masculino (con un cromosoma X) y el hermafrodita (con dos cromosomas X); la compensación de dosis en las células del hermafrodita se produce mediante una reducción aproximadamente a la mitad de la tasa de transcripción de cada uno de los dos cromosomas X. Este resultado se logra mediante amplios cambios estructurales en los cromosomas X de los hermafroditas (**Figura 7–91**). Un complejo de compensación de dosis, que es completamente distinto del de *Drosophila* y en cambio se parece al complejo de la *condensina* que compacta los cromosomas durante la mitosis y la meiosis (véase Figura 17–27), se ensambla a lo largo de cada cromosoma X de los hermafroditas y, mediante un mecanismo que todavía se desconoce, impone una represión global del doble sobre el nivel de expresión normal de cada gen.

Pese a que las estrategias y componentes utilizados para la compensación de dosis son distintos entre las diferentes especies de animales, como por ejemplo mamíferos, moscas o gusanos, todos los procesos y mecanismos implican alteraciones estructurales de todo el cromosoma X. Parece probable que determinadas características de la estructura cromosómica que son considerablemente generales se adaptaron de forma independiente durante la evolución para superar un problema muy específico aparecido en relación a la reproducción sexual de los animales.

El control de la expresión génica es intrínsecamente ruidoso

A lo largo de este capítulo se ha descrito la expresión génica como si fuera un proceso estrictamente determinista, de forma que conociendo las concentraciones de todas las proteínas

reguladoras relevantes y otras moléculas de control se podría predecir de forma precisa el nivel de expresión génica. En realidad, existe una gran cantidad de variabilidad aleatoria en el comportamiento de las células. Esto es así, en parte, porque existen fluctuaciones aleatorias en el ambiente que perturban las concentraciones de moléculas reguladoras dentro de la célula de una forma impredecible.

Otra causa posible, en algunos casos, podría ser el comportamiento caótico del sistema de control intracelular: análisis matemáticos muestran que sistemas de control relativamente sencillos pueden ser sumamente sensibles a los parámetros de control de forma que, por ejemplo, diferencias mínimas que se dan en las condiciones iniciales pueden llevar a un resultado radicalmente diferente e impredecible a largo plazo. Pero, además de estas causas de impredicibilidad, existe otra razón fundamental para explicar por qué el comportamiento celular es inevitablemente aleatorio en cierto grado.

Las células son sistemas químicos que consisten en un número relativamente pequeño de moléculas y las reacciones químicas a nivel de moléculas individuales se producen de una forma esencialmente aleatoria o *estocástica*. Una molécula dada tiene una determinada probabilidad por unidad de tiempo de sufrir una reacción química, pero el hecho de hacerlo en un momento dado o no hacerlo es impredecible, dependiendo de colisiones térmicas aleatorias y de reglas probabilísticas de la mecánica cuántica. Cuanto más pequeño es el número de moléculas implicadas en un proceso dentro de la célula, más se verá afectada por el azar de los eventos químicos a nivel de la molécula individual. De esta forma, existe un cierto grado de azar en cada uno de los aspectos del comportamiento celular, pero determinados procesos son propensos a ser aleatorios en grado sumo.

El control de la transcripción, en particular, depende de condiciones químicas precisas del gen. Consideremos un caso idealizado en el que un gen se transcribe entero, tiene una proteína activadora de la transcripción unida a su región reguladora y es transcripcionalmente silencioso cuando esta proteína no está unida. La reacción de asociación/disociación entre el DNA regulador y la proteína es estocástica: si el estado de unión tiene una vida media $t_{1/2}$ de una hora, el gen puede permanecer activado a veces durante 30 minutos o menos, a veces durante un par de horas o más antes de que la proteína activadora se disocie. De esta forma, la transcripción fluctuará entre un estado activo y un estado inactivo de una manera esencialmente aleatoria.

La velocidad media de fluctuación y la velocidad del tiempo medio pasado en estado activo frente al tiempo medio pasado en estado inactivo serán determinadas mediante los valores de k_{off} y k_{on} para la reacción de unión y por la concentración de proteína activadora en la célula. La cantidad de transcritos génicos acumulados en la célula fluctuará de forma paralela; si la vida media de los transcritos es larga comparada con la $t_{1/2}$, las fluctuaciones se verán suavizadas; si es corta, serán intensas.

Una forma de demostrar estas fluctuaciones aleatorias en la expresión de copias génicas individuales es mediante la manipulación genética de células en las que una de las copias de la región control de un gen se une a una secuencia que codifica una proteína marcadora de fluorescencia verde mientras que la otra copia se une de forma similar a una secuencia que codifica un marcador de fluorescencia roja. Pese a que las dos construcciones génicas se encuentran en la misma célula y experimentan el mismo ambiente, sus niveles de expresión fluctúan de forma independiente.

Como resultado de ello, en una población de células que contienen el mismo par de construcciones, algunas aparecen verdes, otras rojas y otras una mezcla de los dos colores, o sea en una variedad de tonos de amarillo (véase Figura 8–75). En un sentido más amplio, las decisiones del destino celular se toman a menudo de forma estocástica, probablemente como resultado de estas fluctuaciones aleatorias; veremos un ejemplo de ello en el Capítulo 23, donde se describe la génesis de distintos tipos de células sanguíneas blancas.

En algunos tipos celulares, y para algunos aspectos del comportamiento celular, el azar en el control de la transcripción génica, como el que acabamos de describir, parece ser la mayor fuente de variabilidad aleatoria; en otros tipos celulares, predominan otras fuentes de variación aleatoria. En los casos en los que el ruido en los sistemas de control sería perjudicial, han evolucionado mecanismos especiales de control para minimizar sus efectos; el circuito de alimentación hacia adelante del que hemos hablado previamente es un ejemplo de estos dispositivos, ya que elimina los efectos de las fluctuaciones rápidas en una señal de control. Pero en todas las células un cierto grado de azar es inevitable. Se trata de un rasgo fundamental e inherente del comportamiento celular que siempre se debe tener en cuenta en las investigaciones.

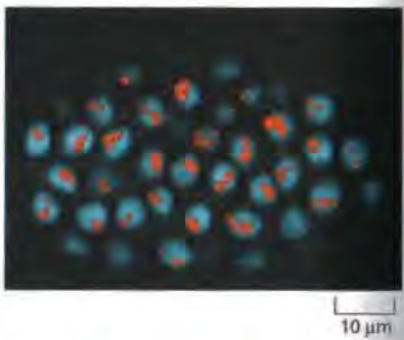


Figura 7–91 Localización de proteínas de compensación de dosis en los cromosomas X del núcleo hermafrodita (XX) de *C. elegans*. En esta imagen se pueden ver muchos núcleos de un embrión en desarrollo. El DNA total está teñido de *azul* mediante el agente intercalante del DNA denominado DAPI; la proteína Sdc2 está teñida de *rojo* utilizando anticuerpos anti-Sdc2 acoplados a una tinción fluorescente. Este experimento demuestra que la proteína Sdc2 sólo se asocia con un grupo limitado de cromosomas, identificados mediante otro experimento como los dos cromosomas X. Sdc2 se une a todo lo largo del cromosoma X y atrae al complejo de compensación de dosis. (De H.E. Dawes et al., *Science* 284:1800-1804, 1999. Con la autorización de AAAS.)

Resumen

Los tipos celulares de los animales y de las plantas se generan por mecanismos que transcriben genes diferentes a partir de diferentes células. Las células animales especializadas pueden mantener sus caracteres típicos a través de varios ciclos celulares, por lo que los mecanismos reguladores de la expresión génica han de ser estables y heredables cuando la célula se divide. Estas características ponen de manifiesto que la célula tiene memoria de la historia de su desarrollo. Las bacterias y las levaduras también tienen memoria celular y proporcionan modelos para estudiar los mecanismos de la regulación génica. Algunos de estos mecanismos pueden ser relevantes en la generación de tipos celulares de los eucariotas superiores.

Los bucles de retroalimentación directos o indirectos proporcionan el mecanismo más sencillo de memoria celular. Los circuitos de transcripción también proporcionan los medios necesarios para operaciones lógicas y medidas de tiempo. Circuitos de transcripción sencillos combinados en amplias redes reguladoras conducen hacia programas muy sofisticados de desarrollo embrionario.

En los organismos eucariotas, la transcripción de cualquier gen está controlada por proteínas reguladoras. Parece que cada tipo celular de un organismo eucariota superior contiene un conjunto de proteínas reguladoras que aseguran la expresión de los genes apropiados. Una proteína reguladora se puede expresar en diferentes circunstancias y controla genes distintos.

Las células eucariotas, al contrario que las procariotas, utilizan ciertos estados de compactación de la cromatina, heredables, como mecanismo adicional para regular la expresión génica y generar memoria celular. Un caso especialmente destacable es la inactivación de todo el cromosoma X en las hembras de mamífero. La metilación del DNA también puede silenciar genes de una forma heredable en eucariotas. Además, la metilación del DNA también se halla en la base de la impronta genómica en mamíferos, mediante la cual la expresión de un gen pasa a depender de si ha sido heredado de la madre o del padre.

CONTROLES POSTRANSCRIPCIONALES

En principio, cada uno de los pasos necesarios para el proceso de expresión génica puede ser controlado. De hecho, se pueden encontrar ejemplos de cada tipo de regulación y muchos genes están regulados por varios mecanismos. Como hemos visto, los controles de la iniciación de la transcripción génica constituyen una forma esencial de regulación de todos los genes. Sin embargo pueden actuar otros controles en la vía que va del DNA a la proteína, modulando la cantidad de producto génico que se produce y, en algunos casos, determinar la secuencia exacta de aminoácidos del producto proteico. Estos **controles postranscripcionales**, que actúan después de que la RNA polimerasa se una al promotor e inicie la transcripción, son cruciales para muchos genes.

En las siguientes secciones consideraremos las variantes de regulación postranscripcional en un orden temporal, de acuerdo con la secuencia de procesos con los que una molécula de RNA se va encontrando desde que comienza la transcripción (**Figura 7–92**).



Figura 7–92 Controles postranscripcionales de la expresión génica. La velocidad final de síntesis de una proteína puede, en principio, ser controlada por cualquiera de estos pasos. La maduración del RNA, la edición del RNA y la recodificación de la traducción (descritos en el Capítulo 6) pueden alterar también la secuencia de aminoácidos de una proteína, y posibilitar que la célula produzca más de una variante proteica a partir del mismo gen. Es probable que sólo algunos de los pasos descritos sean críticos para la regulación de cada proteína en particular.

La atenuación de la transcripción provoca la finalización prematura de algunas moléculas de RNA

Hace tiempo que se sabe que la expresión de ciertos genes de bacterias está inhibida por la finalización prematura de la transcripción, un fenómeno denominado **atenuación de la transcripción**. En algunos de estos casos, la cadena de RNA naciente adopta una estructura que provoca interacciones con la RNA polimerasa que abortan su transcripción. Cuando se requiere el producto génico, ciertas proteínas reguladoras se unen a la cadena de RNA naciente, interfieren con la atenuación y permiten así que la transcripción termine.

La atenuación de la transcripción también actúa en eucariotas. Un ejemplo bien estudiado se produce en el ciclo vital del HIV, el virus de la inmunodeficiencia humana, agente causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida o sida. Cuando se ha integrado en el genoma del huésped, el DNA vírico se transcribe mediante la RNA polimerasa II de la célula (véase Figura 5–71). No obstante, tras la síntesis de transcritos de varios cientos de nucleótidos, la polimerasa del huésped suele finalizar la transcripción, de forma que no transcribe de forma eficiente todo el genoma vírico. Cuando las condiciones de crecimiento del virus son óptimas, una proteína codificada por el virus denominada Tat evita esta finalización pre-

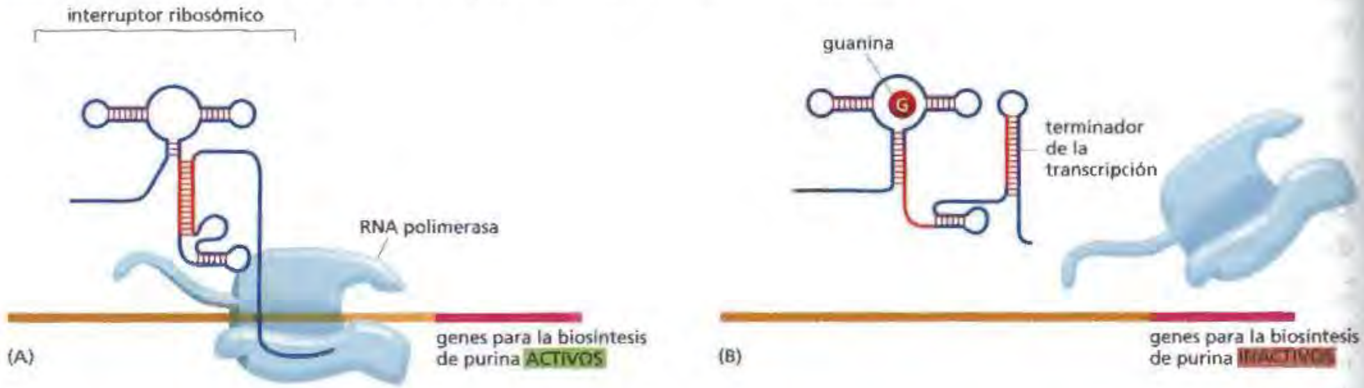
matura uniéndose a una estructura específica en lazo del RNA en proceso de síntesis que contiene una "base extrusiva". Cuando se ha unido a esa estructura específica de RNA (denominada Tar), Tat une distintas proteínas de la célula que permiten a la RNA polimerasa continuar con la transcripción. El papel normal de por lo menos varias de estas proteínas celulares es evitar la interrupción y la finalización prematura de la RNA polimerasa cuando transcribe genes celulares normales. Los genes eucariotas a menudo contienen intrones largos; para transcribir un gen de forma eficaz la RNA polimerasa II no puede permitirse detenerse en secuencias de nucleótidos que favorecen la interrupción. El HIV ha adaptado un mecanismo celular normal para hacer posible el control de la transcripción eficiente de su genoma mediante una sola proteína vírica.

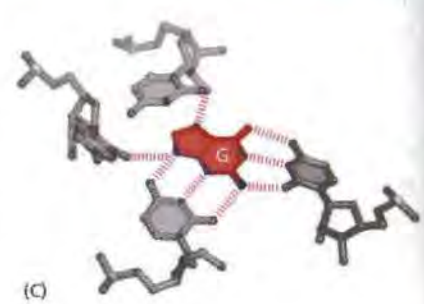
Los interruptores ribosómicos pueden representar antiguas formas de control génico

En el Capítulo 6 se planteó la idea de que, antes de que las células apareciesen en la Tierra, el RNA habría almacenado información hereditaria y también habría catalizado reacciones químicas. El descubrimiento reciente de los *interruptores ribosómicos* demuestra que el RNA también puede formar dispositivos de control que regulen la expresión génica. Los interruptores ribosómicos son secuencias cortas de RNA que cambian su conformación al unirse a moléculas pequeñas, como metabolitos. Cada interruptor ribosómico reconoce una molécula pequeña específica y el cambio conformacional resultante se utiliza para regular la expresión génica. Los interruptores ribosómicos suelen localizarse cerca del extremo 5' de los mRNA y, mientras el mRNA está siendo sintetizado, se doblan bloqueando o permitiendo el avance de la RNA polimerasa según la unión de la pequeña molécula reguladora (véase **Figura 7–93**).

Los interruptores ribosómicos son especialmente comunes en las bacterias, en las que detectan metabolitos pequeños dentro de la célula y ajustan la expresión génica en concordancia. Tal vez su característica más destacable sea la alta especificidad y la afinidad con la que cada uno de ellos reconoce únicamente la molécula pequeña adecuada; en muchos casos, el RNA lee cada una de las características químicas de la molécula pequeña (Figura 7–93C). Más aún, las afinidades de unión observadas son tan fuertes como las que se presentan típicamente entre moléculas pequeñas y proteínas.

Los interruptores ribosómicos tal vez sean los ejemplos más económicos de dispositivo de control génico, ya que evitan la necesidad de proteínas reguladoras. En el ejemplo que se muestra en la Figura 7–93, el interruptor ribosómico controla la elongación de la transcripción, pero también regulan otros pasos de la expresión génica, como veremos más adelante





(C)

Figura 7–93 Un interruptor ribosómico que responde a guanina. (A) En este ejemplo de las bacterias, el interruptor ribosómico controla la expresión de los genes biosintéticos de purina. Cuando los niveles de guanina en la célula son bajos, una RNA polimerasa de elongación transcribe los genes biosintéticos de purina y entonces se expresan las enzimas necesarias para la síntesis de guanina. (B) Cuando la guanina es abundante, se une al interruptor ribosómico provocando un cambio de conformación que fuerza a la RNA polimerasa a finalizar la transcripción (véase Figura 6–11). (C) La guanina (*rojo*) unida al interruptor ribosómico. Sólo se muestran los nucleótidos que forman el bolsillo de unión a guanina. Existen muchos otros interruptores ribosómicos, incluyendo los que reconocen a la S-adenosil metiona, la coenzima B_{12}, el flavín mononucleótido, la adenina, la lisina y la glicina. (Adaptado de M. Mandal y R.R. Breaker, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:451-63, 2004, con la autorización de Macmillan Publishers Ltd., y C.K. Vanderpool y S. Gottesman, *Mol. Microbiol.* 54:1076-1089, 2004, con la autorización de Blackwell Publishing.)

en este capítulo. Está claro que a partir de secuencias cortas de RNA se pueden fabricar dispositivos de control génico muy sofisticados.

La maduración alternativa del RNA puede producir diferentes formas de proteína a partir de un mismo gen

Tal como se ha descrito en el Capítulo 6, el proceso de maduración del RNA por corte y empalme (*splicing*) recorta los transcritos de muchos genes eucariotas y elimina las secuencias intrónicas del precursor del mRNA. Se indicó también que una célula puede madurar un RNA de diferentes formas, de modo que a partir de un mismo gen se pueden obtener polipéptidos finales diferentes –según un proceso que se denomina **maduración alternativa por corte y empalme del RNA** (véase Figura 6–27 y **Figura 7–94**). Una proporción sustancial de los genes de los animales (se estima que un 40% en moscas y un 75% en humanos) producen varias proteínas de esta manera.

Cuando existen diferentes posibilidades de maduración en varias posiciones del transcrito, a partir de un solo gen se pueden producir docenas de proteínas diferentes. En un caso extremo, a partir de un solo gen de *Drosophila* se pueden producir hasta 38.000 proteínas distintas mediante maduración alternativa (**Figura 7–95**), aunque experimentalmente por ahora sólo se han podido observar algunas de estas formas proteicas. Considerando que en el genoma de *Drosophila* se han identificado alrededor de 14.000 genes, es evidente que la complejidad de un organismo puede estar muy por encima del número de genes que presenta. Este ejemplo ilustra el riesgo de igualar el número de genes a la complejidad de un organismo. Por ejemplo, la maduración alternativa es relativamente inusual en las células de levadura pero muy común en las moscas. La levadura contiene unos 6200 genes, de los cuales sólo unos 300 son objeto de maduración por corte y empalme, y la mayoría de ellos sólo tienen un intrón. Afirmar que la mosca sólo tiene 2 o 3 veces más genes que la levadura subestima en gran medida la diferencia de complejidad entre ambos genomas.

En algunos casos, la maduración alternativa del RNA ocurre porque existe una *ambigüedad de intrón*: el mecanismo estándar del espliceosoma que elimina los intrones (descrito en el Capítulo 6) es incapaz de distinguir claramente entre dos o más apareamientos alternativos de puntos de maduración 5' y 3', de tal modo que en ocasiones diferentes se toman decisiones diferentes de forma fortuita. Cuando ocurre este fenómeno de maduración alternativa constitutiva, se producen varias versiones de proteína codificada por el gen en todas las células en las que éste se expresa.

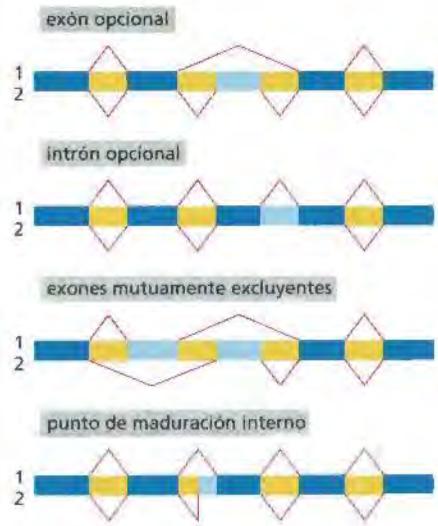


Figura 7–94 Cuatro patrones de maduración alternativa de RNA. En cada caso madura una sola de las dos formas alternativas del transcrito de RNA, produciendo dos mRNA distintos (1 y 2). Los *recuadros de color azul oscuro* indican secuencias exónicas que se presentan en ambos mRNA. Los *recuadros de color azul claro* indican secuencias exónicas que sólo se presentan en uno de los mRNA. Los recuadros están unidos por *líneas rojas* para indicar dónde se eliminan las secuencias intrónicas (*amarillas*). (Adaptado con la autorización de A. Andreadis, M.E. Gallego y B. Nadal-Ginard, *Annu. Rev. Cell Biol.* 3:207-242, 1987. Con la autorización de Annual Reviews.)

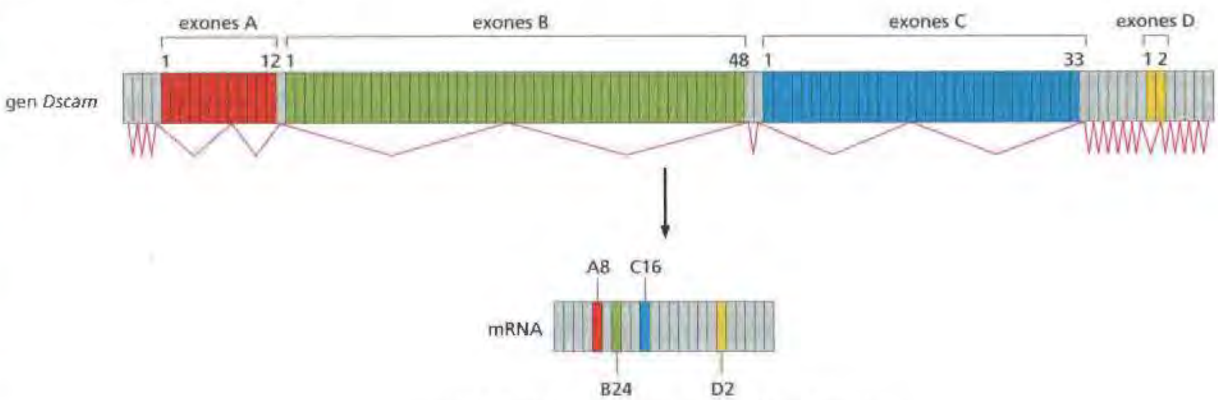


Figura 7–95 Maduración alternativa de transcritos de RNA en el gen *Dscam* de *Drosophila*. Las proteínas DSCAM son receptores guía de axones que contribuyen a dirigir el crecimiento de los conos hacia sus dianas correspondientes durante el desarrollo del sistema nervioso. El mRNA final contiene 24 exones, cuatro de los cuales, indicados como (A, B, C y D), están presentes en el gen *Dscam* como alineaciones de exones alternativos. Cada exón contiene 1 de entre 12 alternativas para el exón A (*rojo*), 1 de entre 48 alternativas para el exón B (*verde*), 1 de entre 33 alternativas para el exón C (*azul*) y 1 de entre 2 alternativas para el exón D (*amarillo*). Si se utilizan todas las combinaciones de maduración posibles, se pueden generar 38.016 proteínas distintas a partir del gen *Dscam*. Esta figura muestra únicamente uno de los muchos patrones posibles de maduración (indicado mediante la *línea roja* y el mRNA maduro de debajo). Cada variante de la proteína DSCAM se plegaría dando lugar aproximadamente a una misma estructura [una serie de dominios extracelulares del tipo de las inmunoglobulinas unidos a una región intermembrana (véase Figura 25–74)], pero la secuencia de aminoácidos variaría según el patrón de maduración. Se sospecha que esta diversidad de receptores contribuye a la formación de un circuito neuronal complejo, pero las propiedades y funciones precisas de las muchas variantes de DSCAM todavía no están bien establecidas. (Adaptado de D.L. Black, *Cell* 103: 367-370, 2000. Con la autorización de Elsevier.)

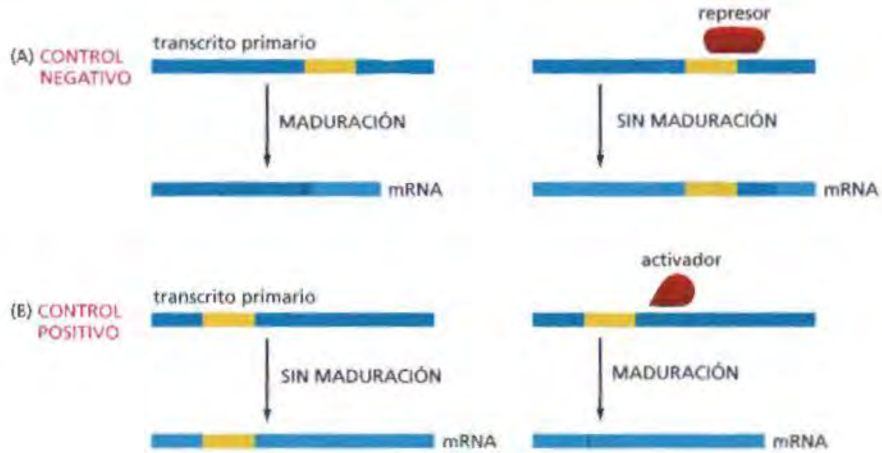


Figura 7-96 Control negativo y positivo de la maduración alternativa del RNA. (A) En el control negativo, una proteína represora se une a un transcrito de pre-mRNA y bloquea el acceso de la maquinaria de maduración a una unión de ayuste. Normalmente esto implica utilizar un sitio de ayuste críptico y producir un patrón de maduración alterado (no se muestra). (B) En el control positivo, la maquinaria de maduración es incapaz de eliminar una secuencia intrónica particular de forma eficiente sin ayuda de ninguna proteína activadora. A menudo estos activadores se denominan como *potenciadores de maduración* porque las secuencias nucleotídicas a las que se unen pueden estar localizadas a muchos pares de bases de la unión de ayuste que controlan.

Sin embargo, en muchos casos la maduración alternativa del RNA no es constitutiva sino que está regulada. En los casos más sencillos, la maduración alternativa permite pasar de sintetizar proteínas no funcionales a proteínas funcionales. Por ejemplo, la transposasa que cataliza la transposición del elemento P de *Drosophila* se produce en una forma funcional en células germinales y en una forma no funcional en células somáticas de la mosca, permitiendo al elemento P extenderse por el genoma de la mosca sin causar daños en las células somáticas (véase Figura 5-69). La diferencia en la actividad del elemento transponible viene provocada por una secuencia intrónica del RNA de la transposasa que sólo se elimina en la células germinales.

Aparte de poder dar lugar a una proteína no funcional en lugar de una proteína funcional, la regulación del procesamiento del RNA puede generar distintas versiones de una proteína en líneas celulares distintas, de acuerdo con las necesidades de la célula. Por ejemplo, en distintos tipos de células se producen formas especiales de tropomiosina (véase Figura 6-27). Mediante este mecanismo se producen muchas otras formas de proteínas específicas de tipo celular.

La maduración del RNA se puede regular tanto de forma negativa, mediante una molécula reguladora que evita que la maquinaria de maduración acceda a una secuencia de maduración determinada en el RNA, como positiva, mediante una proteína reguladora que dirige la maquinaria de maduración hacia una secuencia de procesamiento que de otra forma quedaría oculta (**Figura 7-96**).

Debido a la plasticidad del procesamiento del RNA, el bloqueo de un lugar "fuerte" de procesamiento expone a menudo un lugar "débil" y da lugar a un patrón distinto de procesamiento. De forma parecida, la activación de un lugar de procesamiento subóptimo da lugar a un procesamiento alternativo mediante la supresión de un lugar de procesamiento alternativo. Así, el procesamiento de una molécula de pre-mRNA puede contemplarse como un equilibrio delicado entre lugares de procesamiento que compiten entre sí, equilibrio que fácilmente puede ser afectado por proteínas reguladoras.

La definición de gen ha tenido que ser modificada debido al descubrimiento de la maduración alternativa del RNA

El descubrimiento de que por lo general los genes eucariotas contienen intrones y de que sus secuencias codificantes se pueden unir de varias formas, ha planteado nuevas cuestiones sobre la definición de lo que es un gen. El gen fue definido por primera vez en términos moleculares a principios de la década de 1940, a partir del trabajo sobre genética bioquímica del hongo *Neurospora*. Hasta entonces, un gen había sido definido operacionalmente como una región del genoma que se segrega durante la meiosis como una unidad individual y que da lugar a un rasgo definible en términos fenotípicos, tal como ojos rojos o blancos en *Drosophila* o semillas lisas o rugosas en los guisantes. Los trabajos en *Neurospora* mostraron que la mayoría de los genes corresponden a una región del genoma que dirige la síntesis de una sola enzima. Estos resultados permitían enunciar la hipótesis de que un gen codifica una cadena polipeptídica. La hipótesis resultó ser extremadamente provechosa para la investigación posterior; a medida que se descubrieron más detalles sobre los mecanismos de la expresión génica, durante la década de 1960, se identificó un gen como una porción de

DNA que es transcrito a RNA y que codifica una sola cadena polipeptídica (o un solo RNA estructural, como moléculas de tRNA o de rRNA). El descubrimiento de los genes partidos y los intrones, a finales de la década de 1970, se pudo acomodar sin dificultades en la definición original de gen a condición de que se considerara que una cadena polipeptídica estuviera especificada por el RNA transcrito a partir de alguna secuencia de DNA. Sin embargo, ahora está claro que muchas secuencias de DNA de las células de los eucariotas superiores pueden producir un conjunto de proteínas distintas (aunque relacionadas) mediante la maduración alternativa del RNA. Entonces, ¿cómo se tiene que definir un gen?

En los casos relativamente raros en los que una sola unidad de transcripción produce dos proteínas eucariotas muy diferentes, se considera que las dos proteínas están codificadas por genes distintos que se solapan en el cromosoma. Sin embargo, el considerar que la mayoría de las variantes proteicas producidas por maduración alternativa del RNA derivan de genes solapados parece complicar la cuestión de forma innecesaria. Una alternativa más razonable es la de modificar la definición original de gen y considerar como un gen a cualquier secuencia de DNA que es transcrita como una sola unidad y que codifica un conjunto de cadenas polipeptídicas relacionadas (isoformas proteicas). Esta definición de gen también comprende a aquellas secuencias de DNA que codifican variantes producidas por procesos postranscripcionales diferentes a la maduración alternativa de RNA, como el desplazamiento de pauta de la traducción (véase Figura 6-78), la adición regulada de poli-A y la edición del RNA (que describiremos más adelante).

La determinación del sexo en *Drosophila* depende de una serie de procesos de maduración alternativa regulada del RNA

Veamos a continuación uno de los ejemplos más claros de regulación de la maduración del RNA. En *Drosophila* la señal primaria que determina si la mosca se desarrollará como macho o como hembra es la relación entre el número de cromosomas X (X) y el número de autosomas (A). Individuos con una relación X/A de 1 (normalmente dos cromosomas X y dos series de autosomas) se desarrollan como hembras, mientras que los que presentan una relación de 0,5 (normalmente un cromosoma X y dos series de autosomas) se desarrollan como machos. Esta relación parece determinarse de algún modo durante las primeras fases del desarrollo y desde entonces es recordada por cada célula. Tres productos génicos cruciales están implicados en la transmisión de la información sobre esta relación a muchos otros genes que especificarán los rasgos propios de machos y hembras (**Figura 7–97**). En la **Figura 7–98** se indica que la determinación del sexo en *Drosophila* depende de una cascada de fenómenos de maduración regulada del RNA, que implican de un modo u otro estos tres productos génicos.

Pese a que la determinación del sexo en *Drosophila* aporta uno de los ejemplos mejor conocidos de una cascada de regulación basada en la maduración del RNA, no está claro por qué la mosca utiliza esta estrategia. Otros organismos (p. ej. los nematodos) utilizan un sistema completamente diferente para la determinación del sexo –basado en controles transcripcionales y traduccionales. Además, la vía de determinación de macho en *Drosophila* requiere que se produzcan continuamente una serie de moléculas de RNA no funcionales, lo que parece un gasto innecesario. Se especula que esta cascada de maduración del RNA, como los interruptores ribosómicos que hemos descrito, representa una antigua estrategia de control procedente de una etapa evolutiva en la que el RNA era la molécula biológica predominante, por lo que los controles de la expresión génica tenían que basarse completamente en interacciones RNA-RNA.

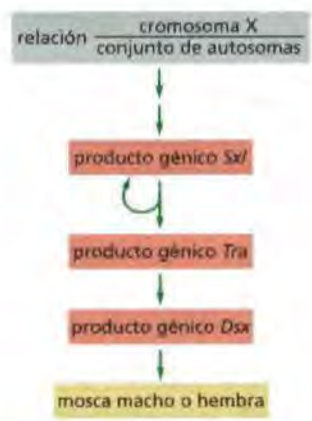


Figura 7–97 **Determinación del sexo en *Drosophila*.** Los productos génicos que se muestran actúan siguiendo una cascada secuencial que determina el sexo de una mosca, de acuerdo con la relación cromosomas X/conjunto de autosomas (X/A). Los genes se denominan *Sex-lethal (Sxl)*, *Transformer (Tra)* y *Doublesex (Dsx)* debido a los fenotipos que resultan cuando son inactivados por mutación. La función de estos productos génicos es transmitir la información acerca de la relación X/A a muchos otros genes que dan lugar a los fenotipos relacionados con el sexo. Estos otros genes actúan como dos juegos alternativos: los que especifican rasgos de hembra y los que especifican rasgos de macho (véase Figura 7–98).

Un cambio en el punto de rotura del transcrito de RNA y la adición de poli-A puede cambiar el extremo carboxilo terminal de una proteína

En el Capítulo 6 se describió que el extremo 3' de una molécula de mRNA no depende de la finalización de la síntesis de RNA por la RNA polimerasa, sino que está determinado por una reacción de rotura del RNA que está catalizada por otros factores mientras el transcrito se está alargando (véase Figura 6–37). Una célula puede controlar este lugar de corte de modo que cambie el extremo C-terminal de la proteína resultante.

Un ejemplo bien estudiado de este tipo es el que media el cambio en la síntesis de moléculas de anticuerpo secretadas unidas a la membrana, durante el desarrollo de los linfoci-

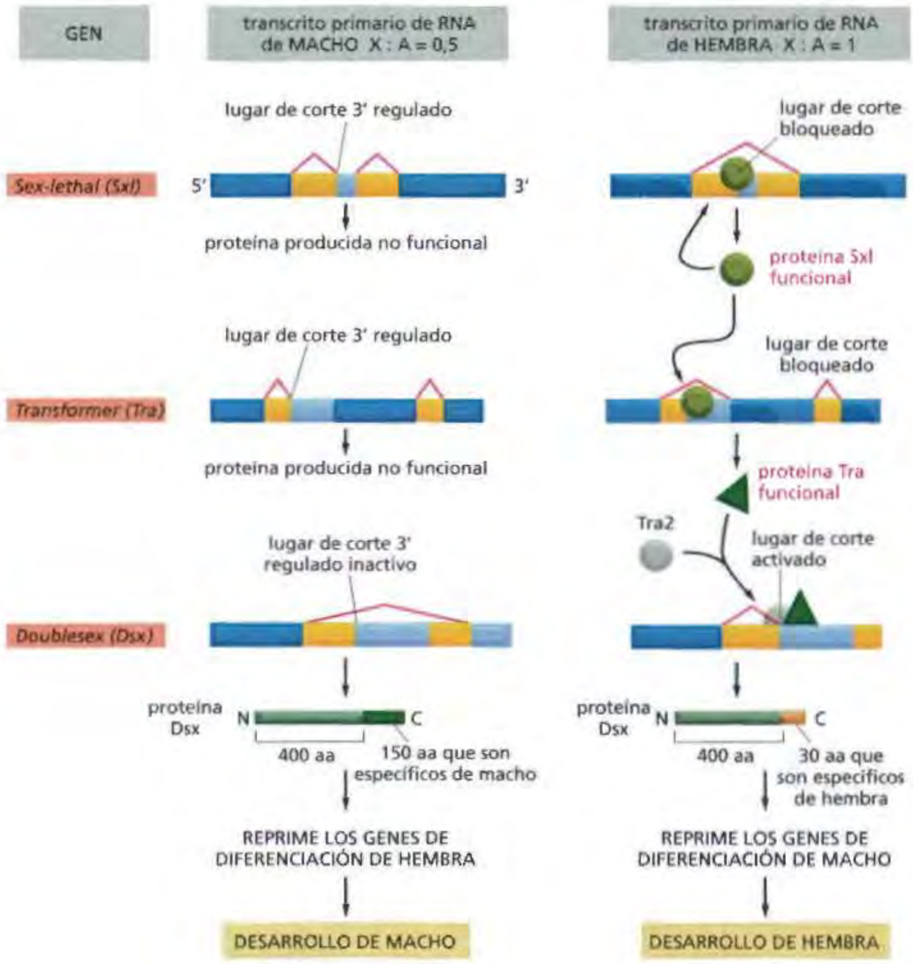


Figura 7–98 Cascada de cambios en la expresión génica que determinan el sexo de una mosca mediante maduración alternativa del RNA. Una relación entre cromosomas X y conjunto de autosomas de 0,5 produce el desarrollo de un macho. Ser macho es la vía por "defecto" en la que se transcriben los dos genes *Sxl* y *Tra*, pero sus RNA son procesados constitutivamente produciendo sólo moléculas de RNA no funcionales, y el transcrito *Dsx* madura produciendo una proteína que inactiva los genes que especifican los rasgos de hembra. Una relación X/A de 1, dispara la vía de diferenciación del embrión y activa temporalmente un promotor en el gen *Sxl* que provoca la síntesis de una clase especial de transcritos *Sxl* que son procesados de forma constitutiva dando lugar a la proteína Sxl funcional. Sxl es una proteína reguladora de la maduración, con dos lugares de acción: (1) se une a un transcrito de RNA *Sxl*, que se produce constitutivamente, y genera una maduración específica de hembra que contribuye a la producción continua de una proteína Sxl funcional, y (2) se une al RNA de *Tra* que se produce de forma intrínseca y genera una maduración alternativa del transcrito, de forma que se obtiene una proteína reguladora Tra activa. La proteína Tra actúa con la proteína constitutiva Tra2 produciendo la forma de maduración del transcrito *Dsx* específico de hembra; este transcrito codifica una forma femenina de la proteína Dsx, que inactiva específicamente los rasgos masculinos.

Los diversos componentes de esta vía se identificaron inicialmente a través del estudio de mutantes de *Drosophila* que tenían alterado su desarrollo sexual. Por ejemplo, el gen *Dsx* obtuvo su nombre (***Doublesex***, sexo doble) de la observación de que las moscas que carecen de este producto génico expresan rasgos tanto masculinos como femeninos. Obsérvese que esta vía incluye tanto control negativo como control positivo de la maduración (véase Figura 7–96). Sxl se une a una región de nucleótidos rica en pirimidinas que es parte de la secuencia consenso estándar y bloquea el acceso del factor normal de maduración U2AF (véase Figura 6–29). Tra se une a secuencias específicas de RNA de un exón y con Tra2 activa una señal de maduración usualmente subóptima mediante la unión de U2AF.

tos B (véase Figura 25-17). Muy pronto durante la vida de una célula B, el anticuerpo que produce dicha célula se ancla a la membrana plasmática y actúa como receptor del antígeno. La estimulación por el antígeno hace que estas células se multipliquen y empiecen a secretar su anticuerpo. La forma secretada del anticuerpo es idéntica a la forma unida a la membrana, excepto en su extremo C-terminal. En este extremo, la proteína tiene, en el caso de la forma unida a la membrana, una larga cadena de aminoácidos hidrofóbicos que atraviesa la bicapa lipídica de la membrana, mientras que en el caso de la forma secretada presenta una cadena mucho más corta de aminoácidos hidrofílicos. Por lo tanto, el cambio de la forma unida a la membrana a la forma secretada requiere una secuencia diferente de nucleótidos en el extremo 3' del mRNA; esta diferencia se consigue a través del cambio en la longitud del transcrito primario de RNA causado por un cambio en el lugar de corte del RNA, como se describe en la **Figura 7–99**. Este cambio se produce debido a un aumento en la concentración de una subunidad de CstF, la proteína que se une a la secuencia de corte y adición de poli-A (rica en G/U) y que favorece el corte del RNA (véase Figuras 6–37 y 6–38). El primer lugar de corte y adición de poli-A que encuentra una RNA polimerasa, que esté transcribiendo el gen del anticuerpo, es subóptimo y normalmente es ignorado en linfocitos B no estimulados, lo cual da lugar al transcrito de RNA largo. Cuando un linfocito B se activa para producir anticuerpos, incrementa su concentración de CstF; como consecuencia, el corte se produce en el lugar subóptimo y se origina el transcrito más corto. De esta forma, un cambio en la concentración de los factores generales de procesamiento del RNA puede tener un efecto drástico sobre la expresión de un gen determinado.

La edición del RNA puede cambiar el sentido del mensaje del RNA

Los mecanismos moleculares utilizados por las células han constituido una continua fuente de sorpresas. Un ejemplo de ello es el fenómeno de **edición del RNA**, que altera la secuencia nucleotídica de los transcritos de RNA después de que hayan sido sintetizados, de

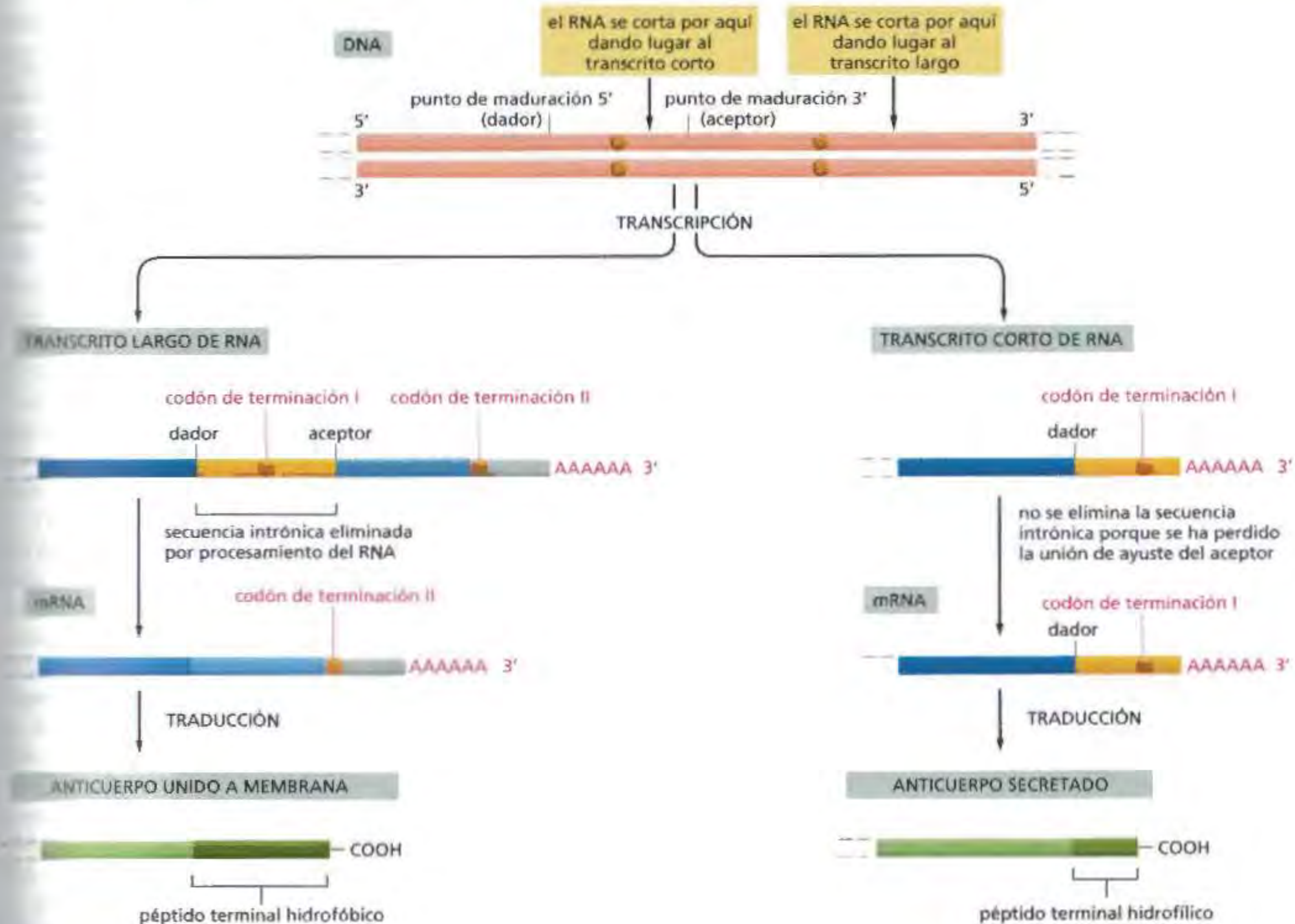


Figura 7–99 La regulación del punto de corte del RNA y la adición de poli-A determinan si una molécula de anticuerpo será secretada o permanecerá unida a la membrana. En los linfocitos B que no están estimulados (*izquierda*) se produce un largo transcrito de RNA; la secuencia intrónica que se halla cerca de su extremo 3' es eliminada por maduración del RNA dando lugar a una molécula de mRNA que codifica una molécula de anticuerpo que se unirá a la membrana. Por el contrario, después de la estimulación por el antígeno (*derecha*) el transcrito primario de RNA es cortado por delante del lugar de maduración, frente a la secuencia del último exón. Como resultado de ello, una parte de la secuencia del intrón que es eliminada del transcrito largo permanece como una secuencia codificante en el transcrito corto. Éstas son las secuencias que codifican la porción hidrofílica del extremo C-terminal de la molécula de anticuerpo secretada.

manera que cambia el mensaje que codifican. La forma más extrema de edición del RNA se descubrió en transcritos de RNA que codifican proteínas de la mitocondria de tripanosomas. En este caso, se insertan (o, menos frecuentemente, se eliminan) uno o más nucleótidos U de regiones específicas de un transcrito, alterando tanto la pauta de lectura original como la secuencia, cambiando así el significado del mensaje. En el caso de algunos genes, la edición es tan extensa que más de la mitad de la secuencia son nucleótidos U que se han insertado durante el proceso de edición. Un conjunto de pequeñas moléculas de RNA de 40 a 80 nucleótidos de longitud que se transcriben por separado contiene la información que especifica cómo se ha de editar exactamente el transcrito inicial de RNA. Los denominados *RNA guía* tienen un extremo 5' cuya secuencia es complementaria a la de un extremo de la región del transcrito que se ha de editar, seguido por una secuencia que especifica el conjunto de nucleótidos que se han de insertar en el transcrito (**Figura 7–100**). El mecanismo de edición es sorprendentemente complejo: en cada posición editada, el RNA se rompe, los nucleótidos U se añaden al extremo 3' roto y el RNA se vuelve a unir.

En mamíferos se da una edición del RNA más refinada. Se producen dos tipos principales de edición del RNA, la desaminación de la adenina que produce inosina (edición de A a I) y la desaminación de citosina que genera uracilo (edición de C a U; véase Figura 5–50). Estas modificaciones alteran las propiedades de apareamiento de las bases (I se aparea con C y U con A), de modo que pueden tener efectos marcados en el significado del RNA. Si la edición se da en la región codificante, puede cambiar la secuencia de aminoácidos de la proteína o producir una proteína truncada. La edición que se da fuera de la secuencia codificadora puede afectar al patrón de maduración del pre-mRNA, al transporte del mRNA del núcleo al citosol o a la eficiencia con la que se traduce el RNA.

El proceso de edición de A a I es especialmente común en humanos, donde se estima que afecta unos 1000 genes. Enzimas proteicas denominadas *ADAR* (***a**denosine **d**eaminases **a**cting on **R**NA*; adenosina desaminasas que actúan sobre el RNA) realizan este tipo de edición; estas enzimas reconocen la estructura de doble cadena de RNA que se forma por emparejamiento de bases entre el lugar que será editado y una secuencia complementaria

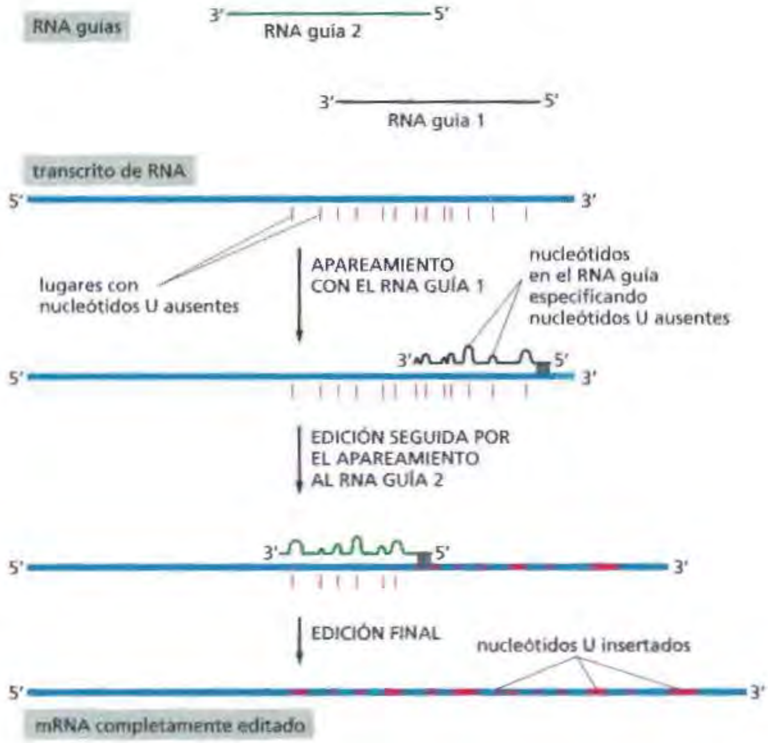


Figura 7–100 Edición del RNA en la mitocondria de los tripanosomas. Generalmente la edición se inicia cerca del extremo 3' y progresa hacia el extremo 5' del transcrito de RNA, como se muestra, debido a que la "secuencia de anclaje" en el extremo 5' de muchos RNA guía sólo puede aparearse con las secuencias editadas. Una enzima especializada denominada uridil transferasa añade los nucleótidos U.

situada en otra localización dentro de la misma molécula de RNA, por lo general en un intrón en 3' (**Figura 7–101**). Estas secuencias complementarias especifican si el mRNA debe editarse y, en ese caso, dónde debe hacerse la edición. Un ejemplo especialmente importante de edición de A a I se produce en el mRNA que codifica un canal iónico de transmisión de señal en el cerebro. Una simple edición cambia una glutamina a arginina, el aminoácido afectado se halla en la pared interna del canal y el cambio debido a la edición modifica la permeabilidad del canal para el Ca^{2+}. La importancia de esta edición se ha demostrado en el ratón mediante la eliminación del gen ADAR relacionado. El ratón mutante es propenso a manifestar crisis epilépticas y muere durante el destete o justo después. Si se muta el gen del canal iónico para que sin mediación dé lugar a la forma editada de la proteína, los ratones sin ADAR se desarrollan normalmente, lo cual indica que la edición del RNA para el canal iónico es crucial para un desarrollo normal del cerebro.

La edición de C a U, realizada por otro conjunto de enzimas, también es crucial en mamíferos. Por ejemplo, en ciertas células del intestino, el mRNA de la apolipoproteína B sufre una edición de C a U que genera un codón de terminación prematuro y, por lo tanto, produce una forma más corta de la proteína. En las células hepáticas, la enzima de edición no se expresa y se produce la apolipoproteína B entera. Las dos isoformas de la proteína tienen distintas propiedades y cada una desempeña un papel especializado en el metabolismo lipídico que es específico del órgano que la produce.

El porqué existe la edición del RNA todavía constituye un misterio. Una posibilidad es que pudo aparecer en la evolución corrigiendo "errores" del genoma. Otra posibilidad es que apareciera como un mecanismo para que la célula produjera proteínas sutilmente diferentes a partir de un mismo gen. Una tercera posibilidad es que la edición del RNA evolucionó en un principio como un mecanismo de defensa contra retrovirus y retrotransposones y que más tarde fue adaptado por la célula para cambiar el significado de determinados mRNA. De hecho, la edición del RNA todavía tiene papeles importantes en la defensa celular. Algunos retrovirus, incluyendo el HIV (véase Figura 5–71), son editados después de infectar la célula. Esta hiperedición genera muchas mutaciones perjudiciales para el genoma de RNA vírico y también provoca que los mRNA víricos queden retenidos en el núcleo, donde son degradados. Aunque algunos retrovirus modernos se protegen de este mecanismo de defensa, es probable que facilite el control de muchos virus.

Los primates tienen los niveles de edición de A a I mucho más elevados que otros mamíferos y la mayor parte de esta edición se da en moléculas de RNA que se transcriben a partir de los elementos Alu, que son muy abundantes. Se ha propuesto que la edición de A a I ha evitado, mediante la inactivación de los transcritos de RNA que necesitan para proliferar, que estos



Figura 7–101 Mecanismos de edición de A a I en los RNA de mamífero. Secuencias de RNA presentes en la propia molécula de RNA indican la posición de cada edición. Normalmente, una secuencia que complementa la posición a editar se encuentra presente en un intrón; la estructura de RNA de doble cadena resultante atrae a la enzima de edición de A a I denominada ADAR. Este tipo de edición tiene lugar en el núcleo, antes de que el pre-mRNA se procese por completo. Tanto los ratones como los humanos presentan tres enzimas ADAR: ADR1, que es necesaria en el hígado para un desarrollo correcto de los eritrocitos, ADR2, que es necesaria para el correcto desarrollo del cerebro (como se describe en el texto), y ADR3 cuya función es incierta.

elementos móviles invadan completamente el genoma (véase Figura 5–74) y haya tenido, por lo tanto, un impacto decisivo en la conformación de nuestro genoma.

El transporte de RNA desde el núcleo puede estar regulado

Se ha estimado que en mamíferos sólo abandona el núcleo celular aproximadamente una veinteava parte de la masa total del RNA fabricado. En el Capítulo 6, se describió que en mamíferos la mayoría de las moléculas de RNA sufren un extenso procesamiento y que los fragmentos de RNA "sobrantes" (intrones eliminados y secuencias de RNA 3' respecto al lugar de corte/poli-A) se degradan en el núcleo. El RNA procesado de forma incompleta y dañado se degrada también como parte del sistema de control de calidad de la producción de RNA.

Como se describe en el Capítulo 6, la exportación de moléculas de RNA desde el núcleo se retarda hasta que el procesamiento se ha completado. Sin embargo algunos mecanismos ignoran este punto de control para regular la expresión génica. Esta estrategia constituye la base de uno de los ejemplos mejor conocidos de **regulación del transporte desde el núcleo** de un mRNA, que se produce en el virus humano responsable del sida, el HIV.

Como se analizó en el Capítulo 5, cuando el HIV ha entrado en la célula dirige la formación de una copia de su genoma en forma de DNA de doble cadena, que se inserta en el genoma del huésped (véase Figura 5–71). Una vez insertado, el DNA vírico se transcribe en forma de una larga molécula de RNA gracias a la RNA polimerasa II de la célula huésped. Este transcrito se procesa mediante distintas formas de corte y empalme dando lugar a alrededor de 30 especies distintas de mRNA, las cuales a su vez son traducidas a distintas proteínas (**Figura 7–102**). Para generar la progenie del virus, los transcritos víricos –enteros, sin procesar– han de ser exportados desde el núcleo al citosol, donde serán empaquetados en las cápsides víricas y constituirán el genoma vírico (véase Figura 5–71). Estos transcritos largos, así como los mRNA del HIV que sufren procesamiento alternativo y que el virus necesita para desplazarse hacia el citoplasma para la síntesis de proteínas, todavía contienen intrones enteros. Por tanto, la actividad normal de la célula huésped de bloqueo de la exportación de los RNA no procesados representa un problema para el virus HIV.

El bloqueo se resuelve de forma ingeniosa. El virus codifica una proteína (denominada Rev) que se une a una secuencia específica de RNA (denominada elemento de respuesta a Rev; RRE: *Rev responsive element*) situada en un intrón vírico. La proteína Rev interacciona con el receptor de exportación nuclear (exportina 1), el cual dirige el desplazamiento de los RNA víricos a través de los poros nucleares hacia el citosol pese a las secuencias intrónicas. En el Capítulo 12 se describe cómo funcionan los receptores de exportación.

La regulación de la exportación desde el núcleo por parte de Rev tiene importantes consecuencias para el crecimiento y la patogénesis del HIV. Además de asegurar la exportación desde el núcleo de determinados RNA no procesados, divide la infección vírica en una fase temprana (en la que Rev se traduce a partir de RNA completamente procesado y en la que todos los RNA víricos que mantienen un intrón son retenidos en el núcleo y son degradados) y una fase tardía (en la que los RNA no procesados se exportan gracias a la acción de Rev). Esta programación en el tiempo le permite al virus replicarse dando lugar a los productos génicos en el orden en que los necesita. (**Figura 7–103**). Puede que la regulación por parte de Rev también ayude al virus HIV en la latencia, una situación en la que el genoma de HIV se ha integrado en el genoma de la célula huésped pero la producción de proteínas víricas se halla interrumpida temporalmente. Si, tras la entrada inicial en la célula huésped, las condiciones son desfavorables para la transcripción y replicación vírica, Rev se sintetiza a niveles que son demasiado bajos para hacer posible la exportación del RNA no procesado. Esta situación estabiliza el ciclo de crecimiento del virus hasta que las condiciones mejoran, los niveles de Rev aumentan y el virus entra en el ciclo de replicación.

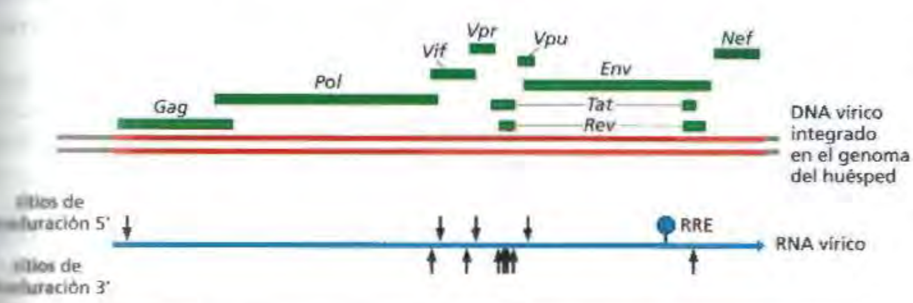


Figura 7–102 El genoma compacto del HIV, el virus humano del sida. La posición de los nueve genes del HIV se muestra en *verde*. La *línea roja doble* indica una copia de DNA del genoma vírico que se ha integrado en el DNA huésped (*gris*). Nótese que las regiones codificantes de muchos genes se superponen y que los de *Tat* y *Rev* están interrumpidos por intrones. La *línea azul* en la parte baja de la figura representa el transcrito pre-mRNA del DNA vírico y muestra las localizaciones de todos los sitios posibles de maduración (*flechas*). Existen muchas vías alternativas de maduración del transcrito vírico, por ejemplo los mRNA de *Env* retienen el intrón que ha sido eliminado en la maduración de los mRNA de *Tat* y *Rev*. El elemento de respuesta a Rev (RRE) está indicado por un *círculo azul*. Es una larga secuencia de RNA de 234 nucleótidos que se pliega formando una estructura definida; Rev reconoce un lazo particular dentro de esta gran estructura.

El gen *Gag* codifica una proteína que se corta dando lugar a varias proteínas más pequeñas que forman la cápside del virus. El gen *Pol* codifica una proteína que se corta dando lugar a la transcriptasa reversa (que transcribe el RNA a DNA) así como a la integrasa implicada en la integración del genoma vírico (en forma de DNA de doble cadena) en el genoma del huésped. Pol se produce por un desplazamiento de la pauta de lectura en la traducción que se inicia en *Gag* (véase Figura 6–78). El gen *Env* codifica proteínas de la cubierta (véase Figura 5–71). Tat, Rev, Vif, Vpr, Vpu y Nef son pequeñas proteínas con funciones variadas. Por ejemplo, Rev regula la exportación desde el núcleo (véase Figura 7–103) y Tat regula la elongación de la transcripción a lo largo del genoma vírico integrado (véase p. 478).

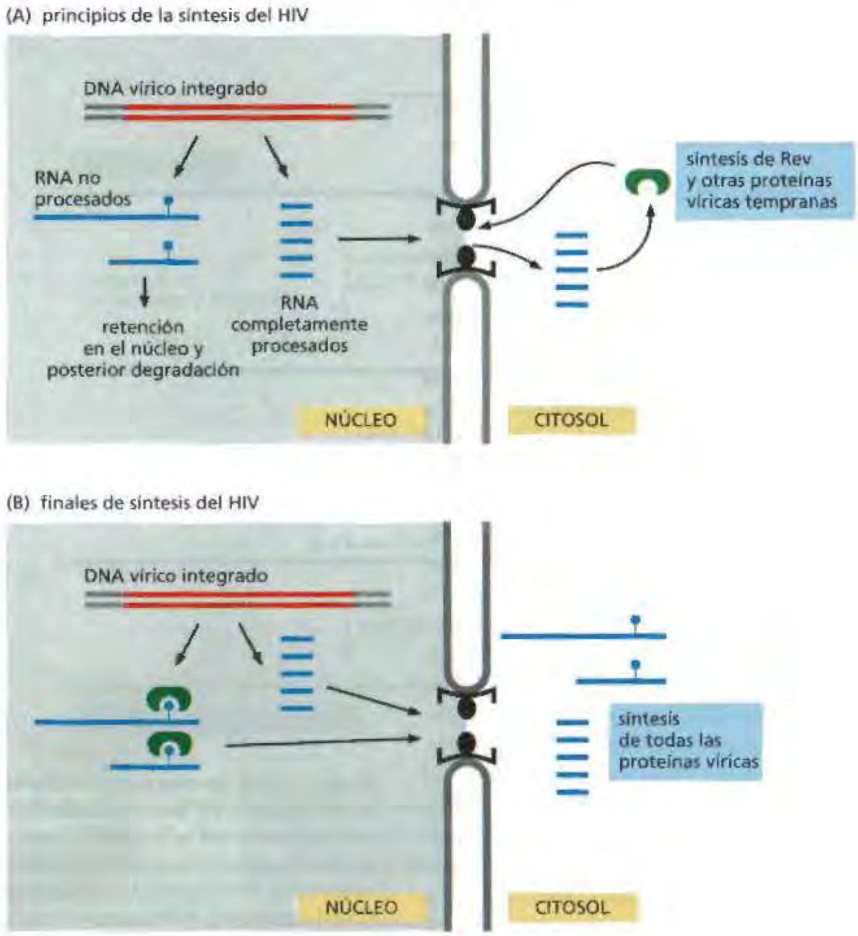


Figura 7–103 Regulación por la proteína HIV Rev de la exportación desde el núcleo. En fases tempranas de la infección por HIV (A), sólo los RNA procesados por completo (que contienen las secuencias codificantes de Rev, Tat y Nef) son exportados desde el núcleo y son traducidos. Cuando se ha acumulado bastante proteína Rev y se transporta al núcleo (B), los RNA víricos no procesados pueden ser exportados desde el núcleo. Muchos de estos RNA se traducen a proteína y transcritos de longitud completa son empaquetados formando nuevas partículas víricas.

Algunos mRNA se localizan en regiones concretas del citoplasma

Por lo general, cuando una molécula de mRNA eucariota sintetizada ha atravesado el poro nuclear y entra en el citosol, interacciona con los ribosomas y se traduce a una cadena polipeptídica (véase Figura 6–40). Cuando la primera ronda de traducción supera el test de la degradación mediada por moléculas de mRNA sin sentido (véase Figura 6–80), el mRNA suele traducirse de manera fidedigna. Si el mRNA codifica una proteína destinada a ser secretada o que se expresa en la superficie celular, una sola señal localizada en el extremo amino terminal de la proteína lo dirigirá al retículo endoplasmático (ER); algunos componentes de la maquinaria de direccionamiento celular de proteínas reconocen esta señal en cuanto emerge del ribosoma y dirigen al ER el conjunto del complejo formado por ribosoma, mRNA y proteína naciente, donde se produce la síntesis del resto de la cadena polipeptídica (como se describe en el Capítulo 12). En otros casos, los ribosomas libres del citosol sintetizan toda la proteína y son las señales de la cadena polipeptídica completa las que pueden dirigir a la proteína a su lugar de destino en la célula.

Algunos mRNA son dirigidos como tales a lugares específicos dentro de la célula antes de que se inicie su traducción eficiente; este fenómeno permite a la célula situar sus mRNA cerca del lugar donde se necesita la proteína codificada. Esta estrategia proporciona a la célula muchas ventajas. Por ejemplo, permite establecer asimetrías en el citosol de la célula, un paso clave para muchos estadios del desarrollo. Tanto la localización del mRNA como el control de la traducción, permite a la célula regular la expresión génica en distintas zonas celulares de forma independiente. Esta característica es especialmente importante en células grandes y muy polarizadas como las neuronas, en las que los conos de crecimiento deben responder a las señales sin esperar la participación del núcleo, situado muy lejos. La localización del RNA se ha observado en muchos organismos, incluyendo hongos unicelulares, plantas y animales, y es probable que sea un mecanismo para concentrar una producción elevada de proteínas.

Se han descubierto varios mecanismos distintos que permiten la localización de mRNA (**Figura 7–104**), pero todos ellos requieren señales específicas en el propio mRNA. Estas se-

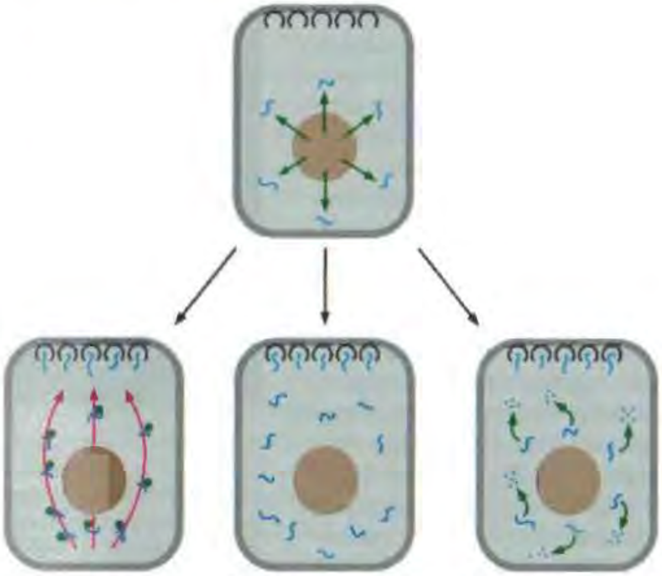


Figura 7–104 Tres mecanismos para la localización de mRNA. El mRNA que ha de ser localizado sale del núcleo a través de los poros nucleares (*arriba*). Algunos mRNA a localizar (*esquema de la izquierda*) viajan a su destino en asociación con motores del citoesqueleto. Como se describe en el Capítulo 16, estos motores utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para desplazarse en un sentido a lo largo de filamentos en el citoesqueleto (*rojo*). Cuando han llegado a su destino final, unas proteínas de anclaje (*negro*) colocan los mRNA en su posición. Otros mRNA difunden libremente por el citosol y sencillamente son atrapados y, en consecuencia, concentrados en sus lugares de localización (*diagrama central*). Algunos de estos mRNA (*diagrama de la derecha*) se degradan en el citosol a menos que se hayan unido, mediante difusión libre, a un complejo proteico que ancla el mRNA y lo protege de la degradación (*negro*). Cada uno de estos mecanismos necesita señales específicas en el mRNA, que por lo general están localizadas en el 3' UTR (véase Figura 7–105). En muchos casos de localización de mRNA, existen mecanismos adicionales que inhiben la traducción del mRNA hasta que este se halla localizado correctamente. (Adaptado de H.D. Lipshitz y C. A. Smibert, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 476-488, 2000. Con la autorización de Elsevier.)

concentran en su *región 3' no traducida* (*UTR: **untranslated region***) –una región que se extiende desde el codón de terminación que finaliza la síntesis de proteína hasta el inicio de la cola de poli-A (**Figura 7–105**). Esta localización del mRNA suele estar relacionada con los controles de traducción asegurando que el mRNA se mantiene inactivo hasta que es transportado a su lugar.

El huevo de *Drosophila* muestra un ejemplo destacado de localización del mRNA. El mRNA que codifica la proteína reguladora bicoid se localiza en el extremo anterior del huevo en desarrollo mediante su unión al citoesqueleto. Cuando la fecundación desencadena la traducción de este mRNA, genera un gradiente de proteína bicoid que tiene un papel clave en el desarrollo de la parte anterior del embrión (mostrado en la Figura 7–53 y descrito con más detalle en el Capítulo 22). Muchos mRNA de células somáticas también se localizan de forma similar. Por ejemplo, en los fibroblastos de mamífero, el mRNA que codifica la actina se localiza en el córtex celular rico en filamentos de actina mediante la señal 3' UTR.

En el Capítulo 6 se explicó que las moléculas de mRNA salen del núcleo cargando con numerosas marcas en forma de modificaciones del RNA (la caperuza 5' y la cola 3' poli-A) y de proteínas de unión (p. ej. complejos de la unión exónica) que significan el cumplimiento con éxito de los distintos pasos en el procesamiento del pre-mRNA. Tal y como describimos, podemos imaginar que el 3' UTR de un mRNA representa un "código de dirección" que dirige el mRNA a distintos lugares en la célula. A continuación veremos que los mRNA contienen información que establece su vida media en el citosol, así como la eficiencia con la que se traducirán a proteína. En sentido amplio, las regiones no traducidas de los mRNA de organismos eucariotas se parecen a las regiones de control de la transcripción en los genes: su secuencia de nucleótidos contiene información que especifica la forma en la que va a ser utilizado el mRNA, y las proteínas interpretan dicha información uniéndose a esas secuencias. Así, además de especificar la secuencia de aminoácidos de las proteínas, las moléculas de mRNA contienen una gran cantidad de información adicional de distinto tipo.

Las regiones 5' y 3' no traducidas de los mRNA controlan su traducción

Cuando se ha sintetizado un mRNA, una de las formas más usuales de regular los niveles de su producto proteico es mediante el control de la etapa que inicia la traducción. Pese a que los detalles de la traducción son distintos en eucariotas y en bacterias (como se indicó en el Capítulo 6), ambos tipos de organismos utilizan algunas estrategias de regulación que son comunes.

En el mRNA de bacterias se encuentra una secuencia de seis nucleótidos muy conservada, la *secuencia Shine-Dalgarno*, situada unos cuantos nucleótidos corriente arriba respecto al codón de inicio AUG. Esta secuencia se aparea con el RNA 16S de la subunidad

ribosómica pequeña situando correctamente el codón de iniciación AUG en el ribosoma. Debido a que esta interacción es muy importante para una buena eficiencia de iniciación, aporta a la célula bacteriana un mecanismo sencillo para regular la síntesis de proteínas mediante mecanismos de **control traduccional negativo**. Estos mecanismos, llevados a cabo por proteínas o por moléculas de RNA, suelen implicar la exposición o el bloqueo de la secuencia Shine-Dalgarno (**Figura 7–106**).

Los mRNA de eucariotas no contienen secuencias Shine-Dalgarno. En su lugar, tal como se describe en el Capítulo 6, la selección de un codón AUG como iniciación de la traducción viene determinada fundamentalmente por la proximidad al extremo caperuza 5' de la molécula de mRNA, que es el lugar por el que la subunidad ribosómica pequeña se une al mRNA e inicia la búsqueda de un codón de inicio AUG. Pese a las diferencias en el inicio de la traducción con los organismos procariotas, los organismos eucariotas utilizan estrategias similares para regular la traducción. Por ejemplo, algunos represores de la traducción se unen al extremo 5' del mRNA e inhiben el inicio de la traducción. Otros represores reconocen secuencias de nucleótidos en el 3' UTR de determinados mRNA e inhiben el inicio de la traducción interfiriendo en la comunicación entre la caperuza 5' y la cola 3' poli-A, un paso necesario para que se produzca una traducción eficaz (véase Figura 6–72). Un tipo de control de la traducción especialmente importante en eucariotas se basa en RNA pequeños (denominados *microRNA* o *miRNA*) que se unen a moléculas de mRNA y reducen la producción de proteína. Los miRNA son sintetizados y procesados de una forma especial. Volveremos a ellos más adelante en este capítulo.



Figura 7–105 Un experimento que demuestra la importancia de la 3' UTR en la localización de mRNA en regiones específicas del citoplasma. Para este experimento se prepararon dos RNA distintos marcados con fluorescencia a partir de la transcripción *in vitro* de DNA, en presencia de derivados de UTP marcados con fluorescencia. Un RNA (marcado con un fluorocromo *rojo*) contiene la región codificante de la proteína hairy de *Drosophila* e incluye la región 3' UTR adyacente (véase Figura 6–22). El otro RNA (marcado en *verde*) contiene la región codificante de hairy con la región 3' UTR suprimida. Los dos RNA fueron mezclados e inyectados en un embrión de *Drosophila* en el estadio de desarrollo en el que en un citoplasma común hay varios núcleos (véase Figura 7–53). Cuando se visualizaron los RNA fluorescentes 10 minutos después, el RNA de hairy con la secuencia completa (*rojo*) se localizó en el lado apical de los núcleos (*azul*), pero el transcrito que carecía del 3' UTR (*verde*) no presentó ninguna localización. Hairy es una de las muchas proteínas reguladoras de genes que especifican información posicional durante el desarrollo del embrión de *Drosophila* (descritas en el Capítulo 22). Se considera que la localización de su mRNA (que depende de su 3' UTR, según muestra este experimento) es esencial para el correcto desarrollo de la mosca. (Cortesía de Simon Bullock y David Ish-Horowicz.)

La fosforilación de un factor de iniciación regula globalmente la síntesis de proteínas

Las células de los organismos eucariotas reducen su velocidad de síntesis de proteínas en respuesta a una gran variedad de situaciones de estrés, que incluyen la carencia de factores de crecimiento, la infección por virus y el choque térmico. Parece que la mayor parte de esta disminución se debe a la fosforilación del factor de inicio de la traducción eIF2 por parte de proteínas quinasa específicas que responden a los cambios en las condiciones del entorno.

En el Capítulo 6 se esquematiza la función normal de eIF2. Esta proteína forma un complejo con GTP e interviene en la unión del metionil-tRNA iniciador a la subunidad ribosómica pequeña, que a su vez se unirá al extremo caperuza 5' y comenzará el barrido a lo largo del mRNA. Cuando se reconoce el codón AUG, la proteína eIF2 hidroliza a GDP el GTP unido, provocándose un cambio conformacional de ésta y liberándose de la subunidad ribosómica pequeña. Entonces se une una subunidad ribosómica grande y forma un ribosoma completo capaz de iniciar la síntesis de proteínas (véase Figura 6–71).

Debido a que eIF2 se une con fuerza a GDP, es necesaria una proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina (véase Figura 3–73), denominada eIF2B, que libere el GDP permitiendo que eIF2 se una a otra molécula de GTP y sea reutilizado (**Figura 7–107**A). La reutilización del eIF2 no es posible cuando está fosforilado –la forma fosforilada de eIF2 se une de forma especialmente fuerte a eIF2B, inactivándolo. En las células existe mucha más cantidad de eIF2 que de eIF2B: una pequeña fracción de eIF2 fosforilado puede atrapar a casi todo el eIF2B accesible. Este hecho evita la reutilización de eIF2 no fosforilado y disminuye de forma notable la velocidad de síntesis de proteínas (Figura 7–107B).

La regulación del nivel de eIF2 también es especialmente importante para las células de mamífero; el eIF2 es parte del mecanismo por el cual las células pueden ser inducidas a entrar en un estado estable no proliferativo (denominado G_0), en el que la velocidad de síntesis proteica total se reduce a alrededor de una quinta parte de la velocidad habitual en las células en proliferación (descrito en el Capítulo 17).

En organismos eucariotas, la iniciación en codones AUG situados corriente arriba respecto al punto de comienzo de la traducción puede regular el inicio de la traducción

En el Capítulo 6 constatamos que en organismos eucariotas la traducción se inicia por lo general en el primer AUG que se encuentra corriente abajo del extremo 5' del mRNA, que es el primer AUG que encuentra una subunidad pequeña del ribosoma que escanea el mRNA. No

Además, los nucleótidos que inmediatamente rodean el lugar de inicio de la traducción también influyen en la eficiencia con la que el codón AUG será reconocido durante el proceso de escaneado. Si este lugar de reconocimiento es lo bastante débil, a veces las subunidades ribosómicas buscadoras ignorarán el primer codón AUG y podrán escoger, en su lugar, el segundo codón AUG. Este fenómeno, denominado "escaneado impreciso" es una estrategia utilizada con frecuencia para producir a partir de un mismo mRNA dos o más proteínas que difieran en su extremo amino terminal. Resulta muy importante que este sistema permite a algunos genes producir la misma proteína con y sin péptido señal unido a su extremo amino, de forma que la misma proteína se puede dirigir a dos compartimientos celulares diferentes (p. ej., tanto a la mitocondria como al citosol). En algunos casos, la célula puede regular la abundancia relativa de isoformas de una proteína producidas por escaneado impreciso; por ejemplo, en una célula un aumento específico de la abundancia del factor de iniciación eIF4F favorece la utilización del AUG más cercano al extremo 5' del mRNA.

Otro tipo de control presente en los organismos eucariotas utiliza una o más pautas abiertas de lectura cortas (secuencias nucleotídicas libres de codones de terminación) que se hallan entre el extremo 5' del mRNA y el inicio del gen. Las pautas abiertas de lectura (ORF, *open reading frames*) serán tratadas más a fondo en el Capítulo 8; para el tema que nos ocupa, consideraremos que una ORF es un segmento de DNA que empieza en un codón de inicio (ATG) y acaba en un codón de terminación, sin ningún codón de terminación en medio y que, por lo tanto, en principio podría codificar un polipéptido. A menudo, las secuen-

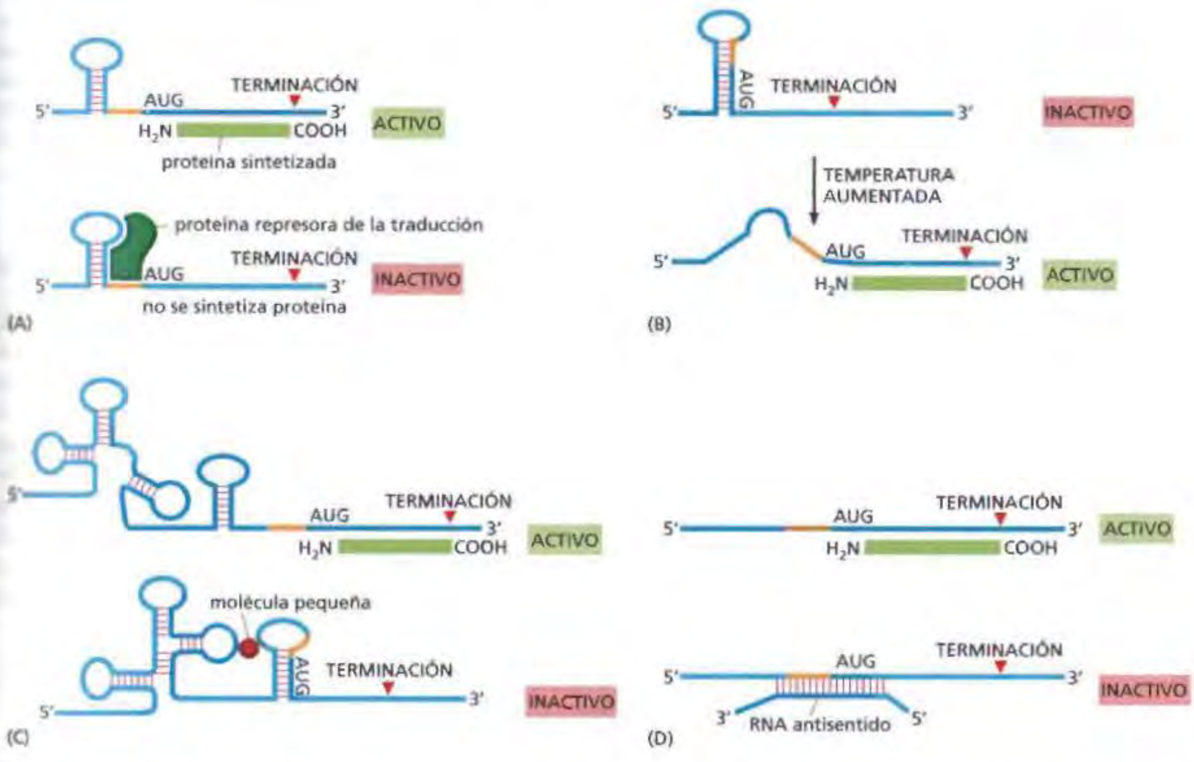


Figura 7-106 Mecanismos de control traduccional. A pesar de que estos ejemplos son en bacterias, en eucariotas actúan muchos de estos mismos principios. (A) Unas proteínas de unión al RNA específicas de secuencia reprimen la traducción de determinados mRNA bloqueando el acceso de los ribosomas a la secuencia de Shine-Dalgarno (*naranja*). Por ejemplo, algunas proteínas ribosomales reprimen la traducción de su propio RNA. Este mecanismo entra en juego sólo cuando las proteínas ribosómicas son producidas en exceso por encima del RNA ribosomal de manera que no se incorporan a los ribosomas, lo que permite a la célula mantener cantidades correctamente equilibradas de los distintos componentes que necesita para formar los ribosomas. En otros casos, la secuencia reguladora de RNA presente en el mRNA a menudo encaja con la secuencia de RNA que la proteína reconoce durante el ensamblaje ribosomal. (B) Un RNA "termosensor" permite el inicio de la transcripción eficiente sólo a temperaturas elevadas a las que la estructura de bucle en forma de peciolo se ha fundido. Un ejemplo se da en el patógeno humano *Listeria monocytogenes*, en el que la traducción de los genes de virulencia aumenta a 37 °C, la temperatura del huésped. (C) La unión de una molécula pequeña a un interruptor ribosómico provoca un reajuste estructural del RNA, secuestrando la secuencia Shine-Dalgarno (*naranja*) y bloqueando el inicio de la traducción. En muchas bacterias, la S-adenosil metionina actúa de esta forma bloqueando la producción de las enzimas que la sintetizan. (D) Un RNA "antisentido" producido en otro lugar del genoma se une con un mRNA específico y bloquea la traducción. Muchas bacterias regulan la expresión de las proteínas de almacenamiento de hierro de esta forma. Cuando el hierro disminuye, el transcrito antisentido se regula a la baja, permitiendo así una traducción eficiente de los genes que codifican las proteínas de almacenamiento. Los RNA antisentido se utilizan mucho en las células eucariotas para regular la expresión génica. El mecanismo es, en cierto modo, diferente del que se muestra aquí y será tratado en detalle más adelante en este capítulo.

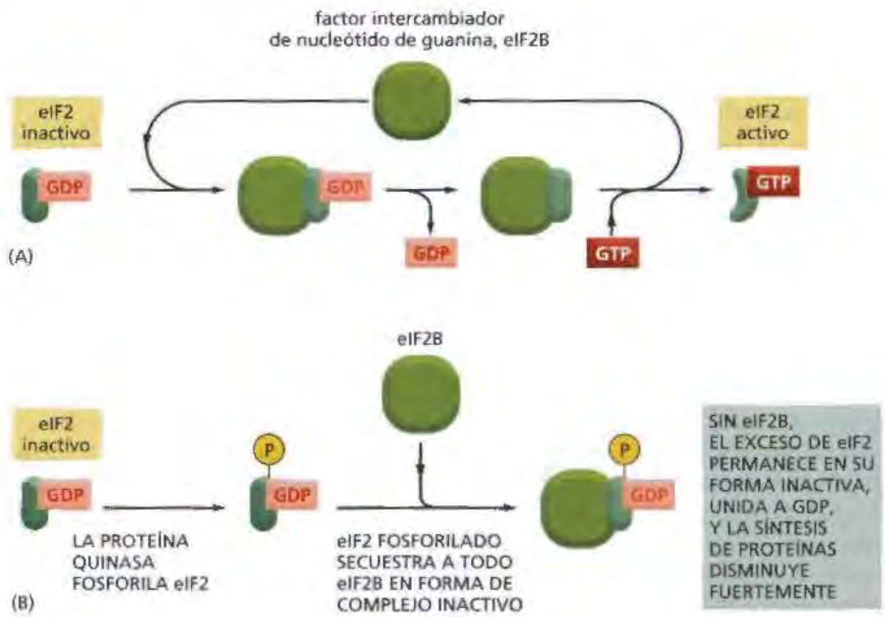


Figura 7–107 Ciclo del eIF2. (A) Reciclaje del factor eIF2 mediante un factor intercambiador de nucleótido de guanina (eIF2B). (B) La fosforilación de eIF2 controla la síntesis de proteínas al secuestrar eIF2B.

cias de aminoácidos codificadas por estas pautas abiertas de lectura situadas corriente arriba (uORF: ***upstream open reading frames***) no son importantes sino que tienen una función meramente reguladora. Una uORF presente en una molécula de mRNA suele disminuir la traducción del gen situado corriente abajo, mediante la unión del complejo ribosómico de inicio y haciendo que el ribosoma traduzca la uORF y se disocie del mRNA antes de alcanzar las secuencias codificantes de la proteína.

Cabría esperar que cuando se reduce la actividad de un factor general de traducción (como eIF2 descrito más arriba) se produjera una reducción de la traducción de todos los mRNA por igual. Sin embargo la fosforilación de eIF2 tiene efectos selectivos y se observa incluso la activación de la traducción de determinados mRNA que contienen uORF. Este mecanismo permite a las levaduras adaptarse al ayuno de ciertos nutrientes mediante la reducción de la síntesis de todas las proteínas excepto de aquellas que se necesitan para la síntesis de los nutrientes ausentes. Los detalles de este proceso se han estudiado en un mRNA de levaduras que codifica una proteína denominada Gcn4, proteína reguladora necesaria para la activación de muchos genes que codifican proteínas importantes para la síntesis de aminoácidos.

El mRNA *Gcn4* contiene cuatro uORF cortas que son las responsables de una activación específica de la traducción de *Gcn4* en respuesta a la fosforilación de eIF2 inducida por una deficiencia de aminoácidos en el medio. El mecanismo mediante el cual aumenta la traducción de *Gcn4* es complejo. De forma resumida, las subunidades ribosómicas se desplazan a lo largo del mRNA, localizan cada una de las uORF y sólo dirigen la traducción de algunas de ellas; si se traduce la última uORF, como es el caso de las células normales no deplecionadas de nutrientes, los ribosomas se disocian al final de la uORF y la traducción de *Gcn4* es ineficiente. El descenso global de la actividad de eIF-2 provocado por la escasez de nutrientes (véase Figura 7–108) hace más probable que una subunidad ribosómica pequeña que escanea, se desplace a través de la cuarta uORF antes de que esta subunidad adquiera la molécula de eIF2 (véase Figura 6–72). Esta subunidad ribosómica es libre de iniciar la traducción de las secuencias de *Gcn4* y el aumento resultante de esta proteína de regulación génica lleva a la producción de un conjunto de proteínas que incrementan la síntesis de aminoácidos en la célula.

Los sitios internos de entrada de los ribosomas generan posibilidades de control traduccional

Pese a que aproximadamente un 90% de los mRNA de los organismos eucariotas se traducen a partir del primer AUG después de la caperuza 5', como hemos visto en la sección anterior algunos AUG pueden ser ignorados durante el proceso de escaneado del mRNA. En esta sección se describe otra posibilidad distinta sobre cómo las células pueden iniciar la traducción

a partir de posiciones distantes del extremo 5' del mRNA, utilizando un tipo especializado de secuencia de RNA, denominada **sitio interno de entrada del ribosoma** (**IRES**: *internal ribosomal entry site*). Un IRES puede estar presente en muchos lugares distintos de un mRNA. En casos poco habituales, en un mismo mRNA de organismos eucariotas se pueden encontrar en tándem dos secuencias codificantes de proteína distintas; la traducción de la primera se produce a partir del mecanismo de escaneado habitual y la de la segunda a partir de un IRES. Los IRES tienen varios centenares de nucleótidos de longitud y se pliegan en estructuras específicas que unen a muchas proteínas –aunque no a todas– que se utilizan para iniciar la traducción dependiente de la caperuza 5' (**Figura 7–108**). De hecho, distintos IRES requieren distintos subgrupos de factores de inicio. Sin embargo, todos prescinden de la necesidad de la estructura de la caperuza 5' y del factor de inicio de la traducción que lo reconoce, eIF4E.

Algunos virus utilizan IRES como parte de su estrategia para obtener la traducción de sus propias moléculas de mRNA mientras bloquean la traducción normal dependiente de caperuza 5' de la célula huésped. Tras la infección, estos virus producen una proteasa (codificada por el genoma vírico) que rompe el factor de traducción eIF4G de la célula huésped, haciendo que sea incapaz de unirse a eIF4E, el complejo de unión a la caperuza. Este hecho bloquea la mayor parte de la traducción de la célula huésped y dirige la maquinaria de la traducción hacia las secuencias IRES, presentes en muchos mRNA víricos. El eIF4G truncado sigue siendo capaz de iniciar la traducción a partir de estos lugares internos y puede incluso estimular la traducción de algunos mRNA víricos que contienen IRES. También puede tener una activación selectiva de la traducción mediada por IRES en los mRNA de la célula huésped. Por ejemplo, cuando las células de mamífero entran en la vía de la muerte celular programada (tratada en el Capítulo 18), el eIF4G se rompe y se produce un descenso general de la traducción. Sin embargo, parece que algunas proteínas esenciales para el control de la muerte celular se traducen a partir de mRNA que contienen IRES y posibilita que su síntesis continúe. De esta forma, el mecanismo de los IRES permite la traducción a velocidad alta de unos mRNA elegidos, a pesar del descenso general de la capacidad global de la célula para realizar la síntesis de proteínas.

Cambios en la estabilidad del mRNA regulan la expresión génica

Los mRNA de una célula bacteriana son muy inestables: tienen una vida media de menos de 3 minutos. Las exonucleasas, que degradan en sentido 3' a 5', suelen ser las responsables de la rápida destrucción de estos mRNA. Debido a que los mRNA bacterianos se sintetizan y se degradan con rapidez, las bacterias se adaptan rápidamente a los cambios ambientales.

Por regla general, los mRNA de las células eucariotas son más estables. Algunos de ellos, como los que codifican la β-globina, tienen una vida media de más de 10 horas, pero la mayoría tienen una vida media bastante más corta, normalmente de menos de 30 minutos. Los mRNA que codifican proteínas reguladoras tales como factores de crecimiento y proteínas de regulación génica, cuyos niveles han de cambiar con rapidez en las células, tienen vidas medias especialmente cortas.

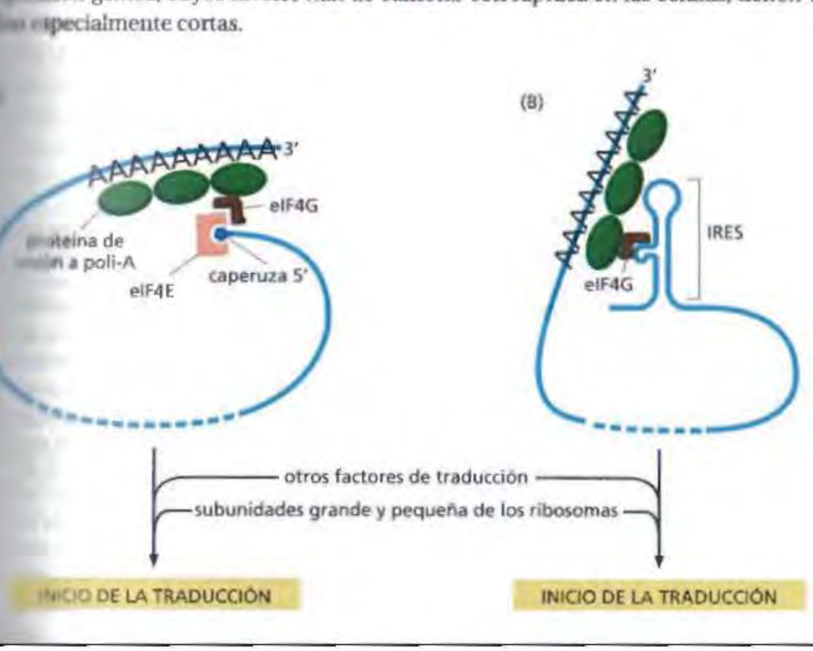


Figura 7–108 Dos mecanismos de inicio de la traducción. (A) El mecanismo normal dependiente de la caperuza requiere un conjunto de factores de inicio cuyo ensamblaje en el mRNA se estimula por la presencia de la caperuza en 5' y la cola de poli-A (véase también Figura 6–72). (B) El mecanismo dependiente de IRES, que se observa sobre todo en virus, sólo requiere un subconjunto de los factores usuales de inicio, los cuales se ensamblan directamente sobre el IRES plegado. (Adaptado de A. Sachs, *Cell* 101: 243-245, 2000. Con la autorización de Elsevier.)

En las células eucariotas existen dos mecanismos generales de destrucción de mRNA. Los dos comienzan con el acortamiento gradual de la cola de poli-A mediante una exonucleasa, un proceso que empieza en cuanto el mRNA llega al citoplasma. En un sentido amplio este acortamiento de la cola de poli-A actúa como un temporizador que inicia la cuenta atrás de la vida media de cada mRNA. Cuando la cola de poli-A queda reducida a una longitud crítica (alrededor de unos 25 nucleótidos en los humanos), las dos vías divergen. En una de ellas, la caperuza 5' es eliminada (un proceso que en inglés se denomina *decapping*) y el mRNA "expuesto" es rápidamente degradado desde su extremo 5'. En la otra, el mRNA sigue siendo degradado por el extremo 3', desde la cola de poli-A hasta las secuencias codificantes (**Figura 7–109**). La mayoría de los mRNA eucariotas son degradados mediante ambos mecanismos.

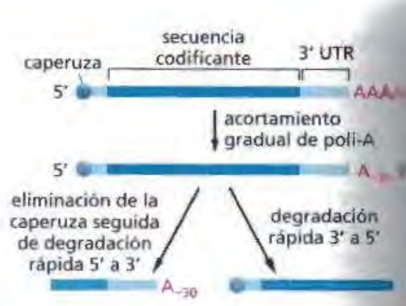


Figura 7–109 Dos mecanismos de degradación de mRNA en eucariotas. Un umbral crítico de longitud de la cola de poli-A induce la degradación en sentido 3' a 5', que tal vez se desencadene debido a la pérdida de proteínas de unión a poli-A (véase Figura 6–40). Como se muestra en la Figura 7–110, la desadenilasa se asocia tanto con la cola de poli-A en 3' como con la caperuza en 5'; esta posición puede señalar la eliminación de la caperuza después del acortamiento de poli-A. Pese a que aquí se ha mostrado la degradación en sentido 5' a 3' y en sentido 3' a 5' en moléculas de mRNA diferentes, estos dos procesos pueden darse a la vez en una misma molécula. (Adaptado de C.A. Beelman y R. Parker, *Cell* 81: 179-181, 1995. Con la autorización de Elsevier.)

Casi todos los mRNA están sujetos a estos dos tipos de deterioro. Las secuencias específicas de cada mRNA determinan la velocidad de cada paso y, por lo tanto, cuánto tiempo va a persistir el mRNA en la célula y va a poder producir proteína. Las secuencias 3' UTR son especialmente importantes en el control de la vida media de los mRNA y a menudo contienen sitios de unión para proteínas específicas que incrementan o reducen la velocidad del acortamiento de la cola de poli-A, la eliminación de la caperuza o la degradación de 3' a 5'. La vida media de un mRNA también se ve afectada por la eficiencia de su traducción. El acortamiento de las colas y la eliminación de la caperuza compiten directamente con la maquinaria que traduce el mRNA; en consecuencia, cualquier factor que afecte a la eficiencia de la traducción de un mRNA tenderá a tener un efecto opuesto sobre su degradación (**Figura 7–110**).

Pese a que el acortamiento de la cola de poli-A controla la vida media de la mayoría de mRNA eucariotas, algunos pueden ser degradados mediante mecanismos que ignoran este paso. En estos casos, unas nucleasas específicas cortan el mRNA por zonas internas quitando la caperuza de manera eficiente en un extremo y eliminando la cola de poli-A por el otro, de forma que las dos mitades se degradan rápidamente. Los mRNA que se destruyen de esta forma tienen secuencias de nucleótidos específicas, a menudo en los 3' UTR, que actúan como señales de reconocimiento para las endonucleasas. Esta estrategia simplifica la regulación precisa de la estabilidad de estos mRNA mediante el bloqueo del sitio de la endonucleasa en respuesta a señales extracelulares. Así, por ejemplo, la adición de iones hierro a las células reduce la estabilidad del mRNA que codifica la proteína receptora que se une a la proteína de unión al hierro, la transferrina, con lo que se reduce la producción del receptor. Este efecto está mediado por la proteína de unión al RNA sensible al hierro denominada aconitasa (la cual también controla la traducción del mRNA de la ferritina). La aconitasa se une al 3' UTR del mRNA del receptor de transferrina y provoca un incremento en la producción de receptor al impedir la degradación del mRNA por endonucleasas. Cuando se añade hierro, la aconitasa es liberada del mRNA, expone el sitio de corte y reduce la estabilidad del mRNA (**Figura 7–111**).

La adición citoplasmática de poli-A puede regular la traducción

La poliadenilación inicial de una molécula de RNA (descrita en el Capítulo 6) tiene lugar en el núcleo, aparentemente de forma automática para casi todos los precursores de mRNA de los organismos eucariotas. Como acabamos de describir, las colas de poli-A de la mayoría

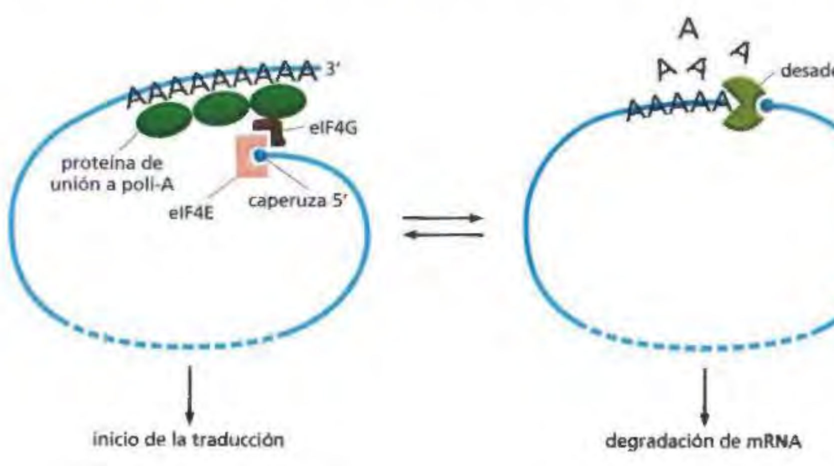


Figura 7–110 Competencia entre traducción de mRNA y degradación de mRNA. Tanto para el inicio de la traducción como para la degradación de una molécula de mRNA dependiente de desadenilación se utilizan las dos mismas características del mRNA, la caperuza 5' y la cola de poli-A en 3' (véase Figura 7–109). La desadenilasa que acorta la cola de poli-A en sentido 3' a 5' se asocia a la caperuza 5'. Como se describe en el Capítulo 6 (véase Figura 6–72), la maquinaria de inicio de la traducción se asocia también con la caperuza 5' y con la cola de poli-A (Adaptado de M. Gao et al., *Mol. Cell* 5:479-488, 2000. Con la autorización de Elsevier.)

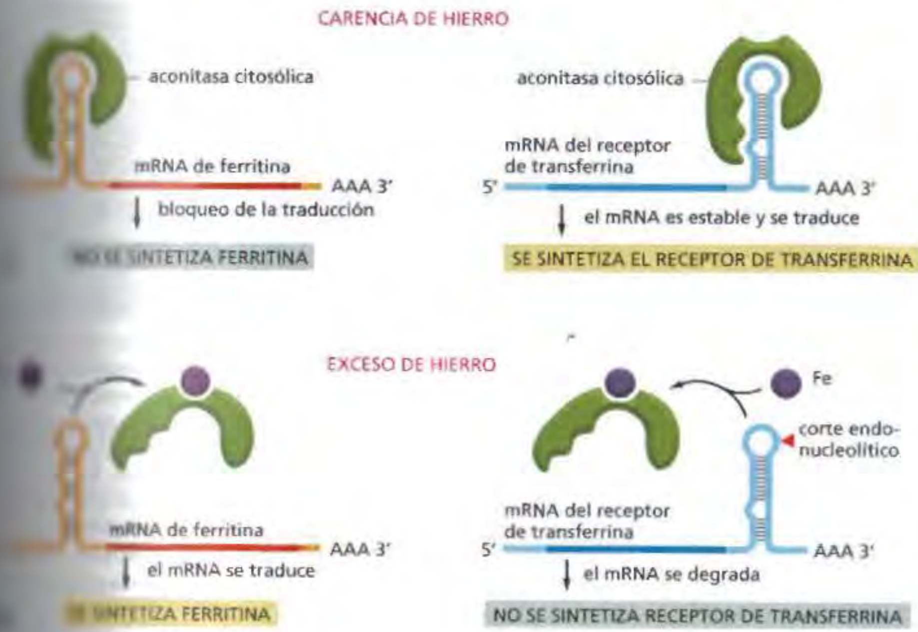


Figura 7–111 Dos controles de tipo postraduccional mediados por hierro. (A) Durante un periodo de carencia de hierro, la unión de aconitasa al 5' UTR del mRNA de la ferritina bloquea el inicio de la traducción; su unión al 3' UTR del mRNA del receptor de transferrina bloquea un sitio de corte para la endonucleasa, estabilizando así el mRNA. (B) En respuesta a un incremento en la concentración citosólica de hierro, las células aumentan su síntesis de ferritina uniendo el hierro extra y reducen la síntesis de receptores de transferrina disminuyendo la importación de hierro. Ambas respuestas están mediadas por la misma proteína reguladora de respuesta al hierro, la aconitasa, que reconoce rasgos comunes en las estructuras en tallo y bucle de los mRNA que codifican la ferritina y el receptor de transferrina. Cuando la aconitasa une hierro, se disocia del mRNA. A pesar de que el receptor de transferrina y la ferritina están regulados por la misma proteína sensible al hierro, los mecanismos de regulación son diferentes por lo que sus niveles responden de forma opuesta a las concentraciones de hierro. (Adaptado de M.W. Hentze et al., *Science* 238: 1570-1573, 1987; J.L. Casey et al., *Science*, 240: 924-928, 1988. Con la autorización de AAAS.)

…mRNA se acortan paulatinamente en el citosol y a continuación los RNA se degradan. …, en algunos casos, en el citosol se produce un alargamiento de la colas de … determinados mRNA; este mecanismo constituye una forma adicional de control … ción.

… y los huevos en maduración constituyen un ejemplo al respecto. Parece que … células gigantes muchas de las vías de degradación de mRNA están inactivas, de for… células pueden fabricar grandes cantidades de mRNA en preparación para la fe… Muchos de los mRNA se almacenan en el citoplasma con colas poli-A de sólo … 30 residuos A en sus extremos 3', y en esta forma no se traducen. En ciertos mo… de la maduración del oocito y justo después de la fecundación, cuando la célula ne… proteínas codificadas por estos mensajeros, una polimerasa poli-A citosólica añade … extremo 3' de determinados mRNA, lo que estimula notablemente su traducción.

…tos pequeños de RNA no codificante regulan …genes de animales y plantas

… anterior hemos descrito el dogma fundamental según el cual la circulación de … genética va desde el DNA a través del RNA hasta la proteína (Figura 6–2). Pe… moléculas de RNA llevan a cabo importantes tareas en la célula que no se reducen a … portadores intermediarios de la información genética. Una serie de destacables …tos recientes han revelado que los RNA no codificantes son mucho más co… de lo que se había imaginado y que, aunque no se esperaba, participan de forma ha… la regulación de la expresión génica.

… de RNA no codificante corto denominado **microRNA** (miRNA) es de especial … en animales y plantas. Los humanos, por ejemplo, expresan más de 400 tipos … de miRNA y parece que éstos regulan al menos un tercio de todos los genes hu… codificantes de proteínas. Una vez generados, los miRNA se aparean con mRNA … y regulan su estabilidad y su traducción. La RNA polimerasa II sintetiza los pre… de miRNA, a los que se añade la caperuza y la cola de poli-A. Luego los miRNA su… tipo especial de procesamiento después del cual el miRNA se ensambla con un … de proteínas formando un *complejo silenciador mediado por RNA* o *RISC* (***RNA-in… silencing complex***). Una vez formado, el RISC va a la búsqueda de sus mRNA diana … secuencias nucleotídicas complementarias (**Figura 7–112**). La proteína Argonau… componente del RISC, facilita en gran medida esta búsqueda, ya que muestra la región … de forma que quede en la posición óptima para aparearse con las bases de otra … de RNA (**Figura 7–113**). En animales, el apareamiento suele ser de 7 pares nucleo… general se lleva a cabo en el 3' UTR del mRNA diana.

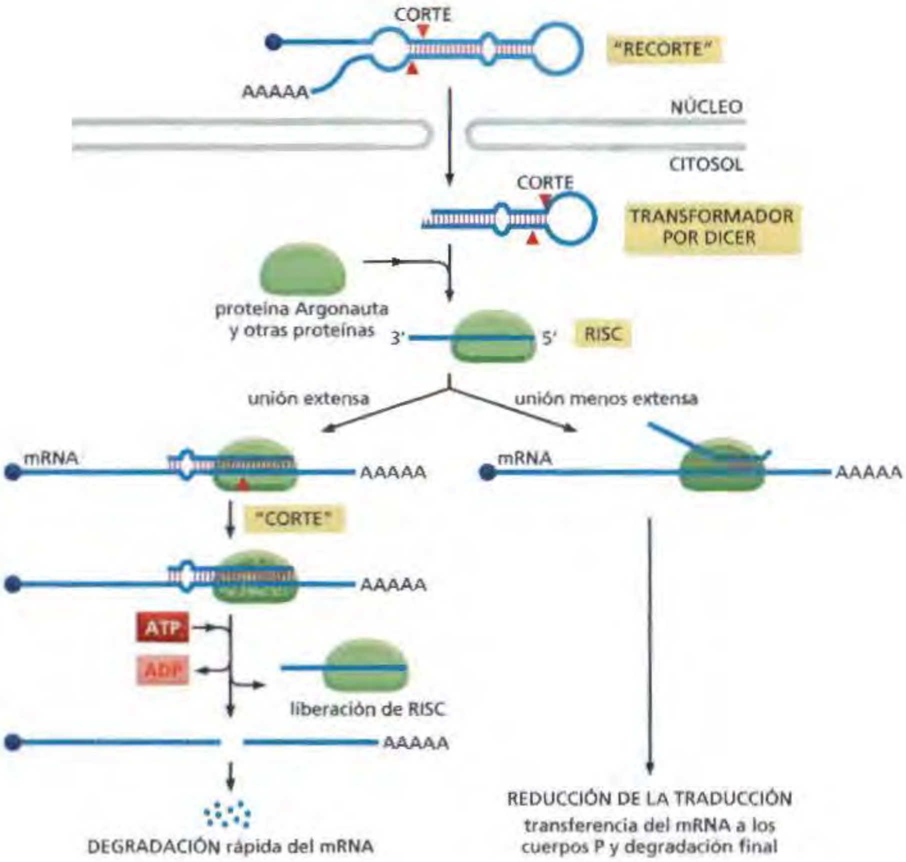


Figura 7–112 Procesamiento de miRNA y mecanismo de acción. El miRNA precu[...] forma una estructura de doble cadena mediante la complementariedad de secuencias entre dos zonas de su molécu[...] Esta estructura se recorta cuando todavía está en el núcleo y luego se exporta al c[...] donde la enzima Dicer la vuelve a cortar formando el verdadero miRNA. La prote[...] Argonauta, junto con otros componentes [...] RISC, se asocia inicialmente con las dos cadenas del miRNA y corta y descarta una [...] ellas. La otra cadena guía al RISC hacia m[...] determinados mediante el apareamiento [...] bases. Si la unión RNA:RNA es extensa, tal como suele ser en plantas, la proteína Argonauta corta el mRNA diana y provoca [...] rápida degradación. En animales, la unión miRNA-mRNA no suele extenderse más allá de una región "nuclear" de 7 nucleótidos cerca del extremo 5' del miRNA. Este apareamiento de bases menos extenso conduce a la inhibición de la traducción, la desestabilización del mRNA y la tranfere[...] del mRNA a los cuerpos P, donde finalme[...] es degradado.

La unión del mRNA al miRNA puede producir diferentes efectos. Si el apareamiento de bases es extenso, la proteína Argonauta cortará el mRNA, eliminando de forma efectiva su cola de poli-A y exponiéndolo a exonucleasas (véase Figura 7–109). Después del corte del mRNA, el RISC (con su miRNA asociado) es liberado y puede ir en busca de otras moléculas de mRNA. De esta forma, un solo miRNA puede actuar de forma catalizadora y destruir muchos mRNA complementarios. Se puede imaginar a los miRNA como secuencias guía que atraen nucleasas destructivas para que contacten con mRNA específicos.

Si el apareamiento de bases entre el miRNA y el mRNA es menos extenso, la proteína Argonauta no corta el RNA sino que reprime la traducción del mRNA y el mRNA se estabiliza. Este efecto se asocia con el acortamiento de la cola de poli-A y el desplazamiento del mRNA hacia estructuras del citosol denominadas *cuerpos de procesamiento* (*cuerpos P*). En este caso, los mRNA se separan de los ribosomas y finalmente se les elimina la caperuza y son degradados. Los cuerpos P son estructuras dinámicas formadas por grandes ensamblajes de mRNA y de enzimas que degradan RNA, y parece que son los sitios de la célula donde se da la destrucción final de la mayoría de los mRNA, incluso de los no controlados por miRNA (**Figura 7–114**).

Varias características convierten a los miRNA en reguladores especialmente útiles para la expresión génica. En primer lugar, un solo miRNA puede regular un conjunto completo de diferentes mRNA si los mRNA contienen en sus UTR una secuencia común a todos ellos. Esta situación es común en los humanos, en los que los miRNA controlan cientos de mRNA diferentes. En segundo lugar, la regulación de los miRNA puede ser combinatoria. Cuando el apareamiento de bases entre un miRNA y un mRNA no consigue activar el corte, la unión adicional de otro miRNA al mismo mRNA produce una reducción mayor de su traducción. Como hemos descrito previamente en este capítulo para el caso de las proteínas de regulación génica, el control combinatorio aumenta en gran medida las posibilidades de que dispone la célula, conectando la expresión génica a diferentes reguladores y no a uno sólo. En tercer lugar, un miRNA ocupa un espacio relativamente pequeño en el genoma en comparación con una proteína. De hecho, su tamaño pequeño es una de las razones por las que los miRNA no han sido descubiertos hasta hace poco tiempo. A pesar de que sólo empezamos a comprender el impacto real que tienen los miRNA, está claro que representan una parte muy importante del equipo de que dispone la célula para regular la expresión de sus genes.



Figura 7–113 Estructura de la proteína Argonauta unida a un apareamiento perfecto entre miRNA y mRNA. (Adapta[...] de N.H. Tolia y L. Joshua-Tor, *Nat. Chem. [...]* 3:36-43, 2007. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

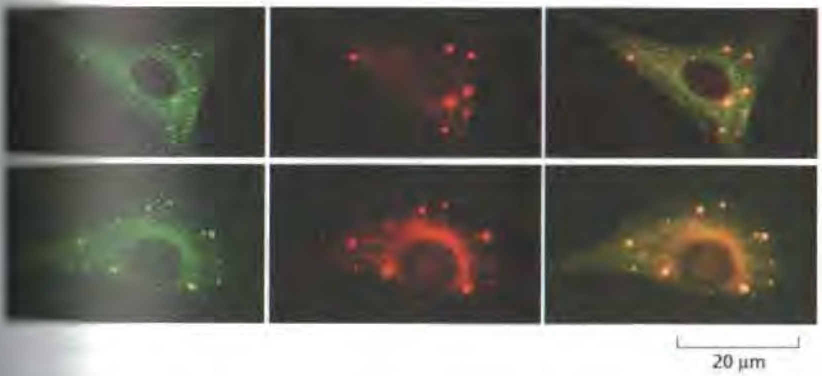


Figura 7–114 Visualización de cuerpos P. Se tiñeron células humanas con anticuerpos contra un componente de la enzima que degrada la caperuza del mRNA, Dcp1a (*paneles de la izquierda*), y contra la proteína Argonauta (*paneles del centro*). La imagen combinada (*paneles de la derecha*) muestra que estas dos proteínas colocalizan en loci del citoplasma denominados cuerpos P (Adaptado de J. Liu et al., *Nat. Cell Biol.* 7:643-644, 2005. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

El RNA de interferencia es un mecanismo de defensa de la célula

Muchas de las proteínas que participan en los mecanismos de regulación de miRNA descritos también presentan una segunda función como mecanismo de defensa: organizan la degradación de moléculas de RNA foráneas, específicamente las de cadena doble. Este mecanismo, que recibe el nombre de **RNA de interferencia (RNAi)**, se encuentra en una gran variedad de organismos incluyendo hongos unicelulares, plantas y gusanos –lo cual sugiere que es antiguo desde un punto de vista evolutivo. Muchos elementos transponibles y virus producen en sus ciclos vitales RNA de doble cadena, al menos de forma transitoria, y el RNAi contribuye a mantener bajo control este tipo de invasores potencialmente peligrosos. Como veremos, el RNAi también proporciona a los científicos una potente técnica experimental para inactivar la expresión de determinados genes.

La presencia de RNA de doble cadena en la célula activa al RNAi atrayendo a un complejo proteico que contiene *Dicer*, la misma nucleasa que procesa los miRNA (véase Figura 7-113). Este complejo proteico corta el RNA de doble cadena en fragmentos pequeños (unos 23 pares de nucleótidos) denominados **RNA de interferencia pequeños (siRNA:** ***small interfering RNA***). Estos siRNA de doble cadena se unen a la proteína Argonauta y a otros componentes del RISC, como vimos para los miRNA, y la proteína Argonauta corta una de las cadenas del RNA de doble cadena, que se desecha. La molécula de siRNA de cadena sencilla resultante dirige el RISC de nuevo hacia moléculas de RNA complementarias producidas por el virus o por el elemento transponible; debido a que el ajuste es exacto, la proteína Argonauta corta estas moléculas, lo que las lleva a una destrucción rápida (**Figura 7–115**).

Cada vez que el RISC corta una nueva molécula de RNA, se libera; así, como se indicó para el caso de los miRNA, una sola molécula de RNA puede actuar de forma catalítica destruyendo muchos RNA complementarios. Algunos organismos utilizan un mecanismo adicional que amplifica aún más la respuesta de RNAi. En estos organismos, las RNA polimerasas dependientes de RNA transforman los productos del procesamiento mediado por RISC en más RNA de doble cadena. Esta amplificación asegura que, una vez iniciada, el RNA de interferencia puede proseguir incluso cuando todo el RNA de doble cadena inicial se haya degradado o diluido. Este proceso le permite por ejemplo a la progenie celular seguir manteniendo la actividad del RNA de interferencia que se originó en células paternas.

En algunos organismos, la actividad del RNA de interferencia puede extenderse de célula a célula mediante la transferencia de fragmentos de RNA. Esto es especialmente importante en plantas, cuyas células están conectadas mediante finos canales de conexión, como se describe en el Capítulo 19), ya que permite a toda la planta hacerse resistente a un virus de RNA a pesar de que sólo hayan sido infectadas algunas de sus células. En un sentido amplio, la respuesta del RNAi recuerda a ciertos aspectos de los sistemas inmunitarios de los animales; en ambos casos, un organismo invasor obtiene una respuesta a su medida y –a través de la amplificación de las moléculas "atacantes"– el huésped queda protegido sistemáticamente.

El RNA de interferencia dirige la formación de heterocromatina

La acción del RNA de interferencia que acabamos de describir no tiene por qué acabar con la destrucción de las moléculas de RNA diana. En algunos casos, la maquinaria del RNA de interferencia puede inactivar de forma selectiva la síntesis de los RNA diana. Para que se dé este mecanismo excepcional, los siRNA cortos producidos por la proteína Dicer se ensam-

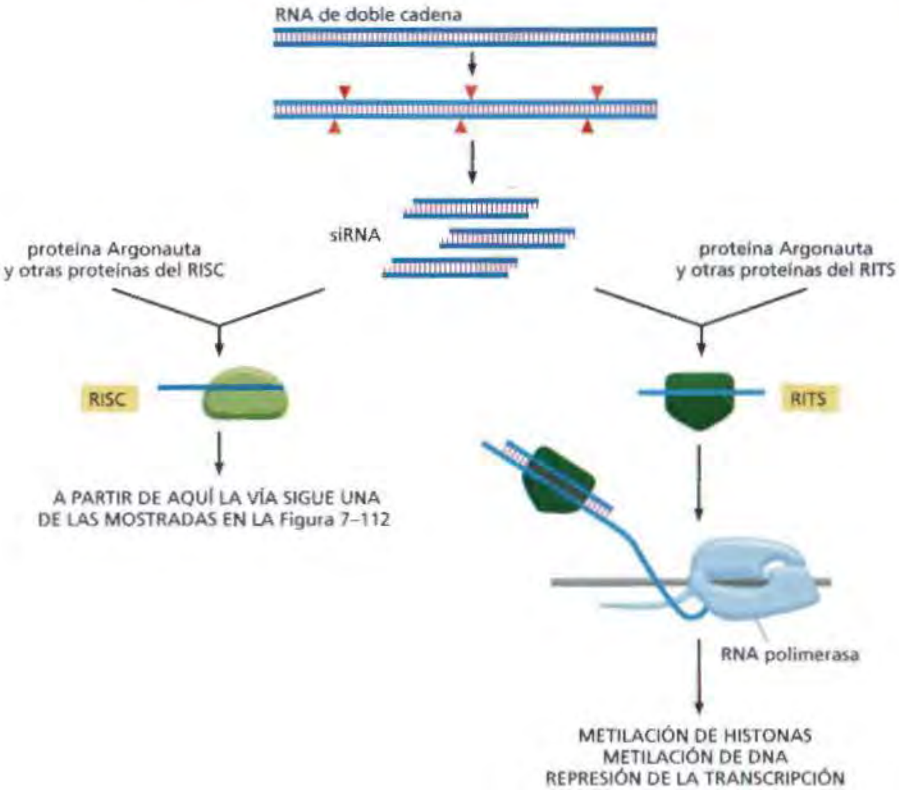


Figura 7–115 Formación de heterocromatina mediante siRNA. En muchos organismos, el RNA de doble cadena puede desencadenar tanto la destrucción de mRNA complementario (*izquierda*) como el silenciamiento transcripcional (*derecha*). El cambio en la estructura de la cromatina inducido por el complejo de unión RITS (***RNA-induced** transcriptional silencing*) se parece al de la Figura 7–81.

blan con un grupo de proteínas (que incluye la proteína Argonauta) formando el complejo RITS (***RNA-induced** transcriptional silencing*). Utilizando siRNA de cadena sencilla como secuencia guía, este complejo se une a transcritos de RNA complementario a medida que aparecen a través de la RNA polimerasa II que transcribe (véase Figura 7–115). Situado así en el genoma, el complejo RITS atrae proteínas que modifican covalentemente las histonas cercanas para por último dirigir la formación y expansión de la heterocromatina que impide otras iniciaciones de la transcripción. En algunos casos, el complejo RITS también induce la metilación del DNA, que, como se ha descrito, puede reprimir aún más la expresión génica. Debido a que la heterocromatina y la metilación del DNA se autopropagan, una señal del RNA de interferencia inicial puede continuar silenciando la expresión génica mucho después de que todas las moléculas de siRNA hayan desaparecido.

La formación de heterocromatina mediada por RNAi es un mecanismo de defensa celular importante que limita la acumulación de elementos transponibles en el genoma manteniéndolos en una forma transcripcionalmente silenciosa. Sin embargo, este mismo mecanismo también se utiliza en muchos procesos normales de la célula. Por ejemplo, en muchos organismos la maquinaria del RNA de interferencia mantiene formada la heterocromatina alrededor de los centrómeros. Las secuencias de DNA centromérico se transcriben en los dos sentidos, produciendo transcritos de RNA complementarios que se unen formando RNA de doble cadena. Este RNA de doble cadena dispara la vía del RNA de interferencia y estimula la formación de heterocromatina en los centrómeros. Esta heterocromatina, a su vez, es necesaria para que los centrómeros separen los cromosomas de forma precisa durante la mitosis (véase Figura 4–50).

El RNA de interferencia es una herramienta experimental potente

A pesar de que probablemente el RNA de interferencia apareció como un mecanismo de defensa, en la actualidad se encuentra integrado a la perfección en muchas funciones de la biología normal de la célula, desde el control de la expresión génica hasta la estructura de los cromosomas. Además, los científicos lo han convertido en una herramienta experimental muy potente que permite inactivar casi cualquier gen produciendo una respuesta de RNAi sobre él. Esta técnica, desarrollada en células en cultivo y a veces en animales y plantas enteros, ha revolucionado los estudios genéticos en biología celular y molecular. Trataremos esta cuestión más en detalle en el siguiente capítulo (véase pp. 571-572). El RNAi tiene un

...ucial en el tratamiento de enfermedades humanas. Debido a que muchas alte... humanas son resultado de la expresión errónea de los genes, la posibilidad de de... estos genes de forma experimental introduciendo moléculas de siRNA complemen... ofrece una gran esperanza médica. Cabe destacar que el mecanismo del RNA de ...encia se ha descubierto recientemente y que todavía son sorprendentes los detalles ...ánica y su gran cantidad de repercusiones biológicas.

...umen

...los pasos de la ruta que va desde el RNA hasta la proteína están regulados por las células ...lar la expresión génica. La mayoría de los genes están regulados a varios niveles, ade... controlados en el estadio de iniciación de la transcripción. Los mecanismos de regula... (1) la atenuación del transcrito por su prematura finalización, (2) la selección ...del punto de maduración, (3) el control de la formación del extremo 3' por rotura y adi... A, (4) la edición del RNA, (5) el control del transporte desde el núcleo al citosol, (6) la lo... de mRNA en lugares particulares de la célula, (7) el control de la iniciación de la ... y (8) la degradación regulada del mRNA. La mayoría de estos procesos de control requie... ...cimiento de secuencias específicas o de estructuras que sean reguladas en la molécula de ... que pueden llevar a cabo tanto proteínas reguladoras como moléculas reguladoras ... forma de control postranscripcional especialmente habitual es la interferencia de RNA, ... determinadas moléculas de RNA se emparejan, formando pares de bases, con moléculas de ... RNA de interferencia pueden hacer que los mRNA sean destruidos o reprimidos de forma ... También pueden provocar que determinados genes se empaqueten en forma de hetero...

PROBLEMAS

...afirmaciones son ciertas? Explican por qué sí o por qué no

... En términos de función bioquímica, el motivo hélice-bu... está más relacionado con el motivo cremallera de leu... el motivo hélice-giro-hélice.

... Los reordenamientos genéticos reversibles son una vía ... regulación de la expresión génica en las células de pro... y de mamíferos.

... Parece que las islas CG aparecieron durante la evolución ... estaban asociadas a porciones del genoma que se mante... y, por lo tanto, no metiladas, en la línea germinal.

... los siguientes problemas

... En la **Figura P7–1** se muestra una pequeña parte de una ... en dos dimensiones de proteínas del cerebro huma... proteínas se separaron según su tamaño en una dimen... según su carga eléctrica (punto isoeléctrico) en la otra. En ...lizaciones no todos los puntos de proteínas son pro... distintos genes; algunos representan formas modifica... proteína que migra a diferentes posiciones. Elegir un ... conjuntos de puntos que podrían representar proteínas ... diferencian en el número de fosfatos que contienen. Expli... motivos de la selección.

... El análisis mediante microchips de DNA de los patrones ... abundancia de mRNA en distintos tipos celulares humanos ... que el nivel de expresión de casi todos los genes activos ... Los patrones de abundancia de mRNA son tan ca... del tipo celular que se utilizan para determinar el te... origen de células cancerosas, incluso aunque las células ... haber hecho metástasis en otras zonas del cuerpo. Por ... sin embargo, las células cancerosas son distintas de sus células precursoras no cancerosas. En ese caso, ¿cómo se pueden utilizar los patrones de expresión de mRNA para determinar el tejido de origen del cáncer humano?

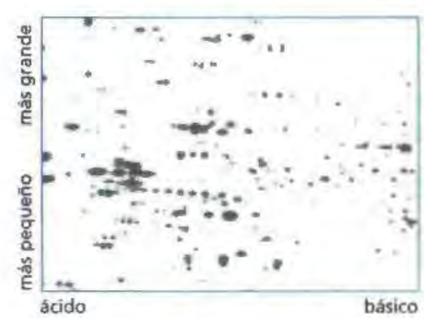


Figura P7–1 Separación en dos dimensiones de proteínas del cerebro humano (Problema 7–4). Las proteínas se visualizaron utilizando electroforesis en gel de dos dimensiones. Sólo se muestra una parte pequeña del espectro proteico. (Cortesía de Tim Myers y Leigh Anderson, Large Scale Biology Corporation.)

7–6 El núcleo de una célula eucariota es mucho más grande que una bacteria y contiene mucho más DNA. Por consiguiente, una proteína de unión a DNA en una célula eucariota tiene que ser capaz de seleccionar su sitio específico de unión entre muchas más secuencias no relacionadas que una proteína de unión a DNA en una bacteria. ¿Supone esto algún tipo especial de problemas para la regulación génica en eucariotas?

Considerar la siguiente situación. Asumamos que tanto el núcleo eucariota como la célula bacteriana tienen una sola copia de un mismo sitio de unión a DNA y que el volumen del núcleo es 500 veces mayor que la bacteria y que tiene 500 veces más DNA. Si la concentración de la proteína reguladora que se une al sitio fuera la misma en el núcleo y en la bacteria, ¿encontraría la proteína

reguladora su sitio de unión con la misma facilidad en el núcleo eucariota que en la bacteria? Explicar la respuesta.

7–7 Las proteínas de unión al DNA a menudo encuentran sus sitios específicos mucho más rápidamente de lo que se esperaría por simple difusión tridimensional. Por ejemplo, el represor Lac se asocia con el operador *Lac* –su sitio de unión al DNA– más de 100 veces más rápido de lo que se esperaría de este modelo. Es obvio que el represor tiene que encontrar al operador mediante mecanismos que reducen la tridimensionalidad o el volumen de la búsqueda para acelerar el encuentro de la diana.

Se han utilizado varias técnicas para investigar este fenómeno. Una de las más elegantes utilizó moléculas de RNA polimerasa altamente fluorescentes que podían seguirse de forma individual. Una selección de moléculas de DNA se alinearon en paralelo y se fijaron a un portaobjetos. Entonces se permitió que moléculas de RNA polimerasa fluorescentes pasaran a través de ellas en un ángulo oblicuo (**Figura P7–2**A). Los rastros de las moléculas de RNA polimerasa mostraron que cerca de la mitad habían fluido en el mismo sentido mientras que la otra mitad se habían desviado del grueso del flujo de una forma característica (Figura P7–2B). Cuando las moléculas de RNA polimerasa se incubaron primero con fragmentos cortos que contenían un promotor potente, todos los rastros siguieron el eje de flujo.

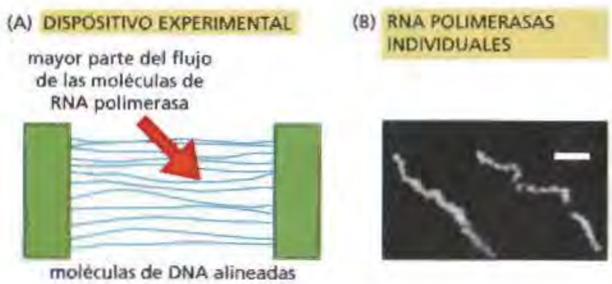


Figura P7–2 Interacciones de moléculas de RNA polimerasa individuales con DNA (Problema 7–7). (A) Dispositivo experimental. Las moléculas de DNA están alineadas y fijadas a un portaobjetos y se permite que a través de ellas pasen moléculas de RNA polimerasa altamente fluorescentes. (B) Rastros de dos moléculas de RNA polimerasa individuales. La de la izquierda ha viajado con la mayor parte del flujo y la de la derecha se ha desviado. La escala es de 10 μm. (B, reimpreso de H. Kabata et al., *Science* 262:1561-1563, 1993. Con permiso de AAAS.)

A. Explicar por qué algunas moléculas de RNA polimerasa se desviaban del grueso del flujo, como muestra la Figura P7–2B. ¿Por qué la incubación con fragmentos cortos de DNA que contenían un promotor potente eliminó los restos que se desviaban del grueso del flujo?

B. ¿Sugieren estos resultados una explicación a la cuestión de cómo las moléculas de unión a sitios específicos del DNA consiguen encontrar sus sitios más rápidamente de lo que se esper... por difusión?

C. A partir de la explicación, ¿es previsible que una molécula de unión a sitios específicos del DNA encuentre más rápidamente su sitio diana en una población de moléculas de DNA cortas o en una población de moléculas de DNA largas? Asumir que la concentración de sitios diana es la misma y que existe un sitio diana para cada molécula de DNA.

7–8 La mayoría de las personas que son ciegas tienen ritmos circadianos que funcionan de manera independiente; es decir, sus ritmos no están sincronizados con indicaciones del tiempo ambiental y oscilan en un ciclo de unas 24,5 horas. ¿Por qué los relojes circadianos de los invidentes no están sincronizados con el mismo reloj de 24 horas de la mayoría de la población? Imaginar qué síntomas se podrían asociar a un reloj circadiano que funciona de manera independiente. ¿Los invidentes tendrán problemas para dormir?

7–9 En la sangre de los humanos se encuentran dos formas muy cercanas de la apolipoproteína B (ApoB) como constituyentes de las lipoproteínas plasmáticas. La ApoB48 (masa molecular de 48 kilodalton) se sintetiza en el intestino y es un componente clave de los quilomicrones, las grandes partículas lipoproteicas responsables del transporte de los triglicéridos de la dieta hacia el tejido adiposo para su almacenamiento. La ApoB100 (masa molecular de 100 kilodalton) se sintetiza en el hígado y forma parte de las partículas lipoproteicas de muy baja densidad, mucho más pequeñas que los quilomicrones que participan en la distribución de triglicéridos entre los tejidos que tienen necesidades energéticas. Un conjunto clásico de estudios definió la sorprendente relación que existe entre estas dos proteínas.

Secuencias de copias de cDNA obtenidas mediante la clonación de los mismos mRNA de estos dos tejidos revelaron una sola diferencia: los cDNA de las células intestinales tienen una T, como parte de un codón de terminación, en un punto en el que los cDNA de las células hepáticas tienen una C, como parte de un codón de glutamina (**Figura P7–3**). Para comprobar las diferencias en los mRNA y buscar las diferencias correspondientes en el genoma, se aislaron RNA y DNA de células intestinales y hepáticas y luego se amplificaron por PCR, utilizando nucleótidos que flanqueaban la región de interés. Los segmentos de DNA amplificado de las cuatro muestras se analizaron estudiando la presencia de T o C mediante la hibridación de oligonucleótidos que contenían la secuencia de cDNA del hígado (oligo-Q) o la secuencia del cDNA del intestino (oligo-STOP). Los resultados se muestran en la **Tabla P7–1**.

¿Las dos formas de ApoB se producen por control transcripcional a partir de dos genes diferentes, por un control de procesamiento de transcritos de RNA a partir de un solo gen o por corte diferencial del producto proteico a partir de un solo gen? Razonar la respuesta.

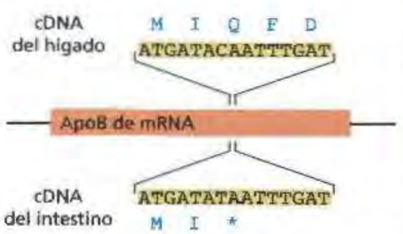


Figura P7–3 Localización de las diferencias de secuencia en los clones de cDNA del RNA de la ApoB aislado del hígado y del intestino (Problema 7–9). Las secuencias de aminoácidos codificadas se muestran alineadas con las secuencias de cDNA.

Tabla P7–1 Hibridación de oligonucleótidos específicos para amplificar segmentos de RNA y de DNA del hígado y del intestino (Problema 7–9).

	RNA		DNA	
	HÍGADO	INTESTINO	HÍGADO	INTESTINO
Oligo-Q	+	–	+	+
Oligo-STOP	–	+	–	–

La hibridación se indica con un +; la ausencia de hibridación se indica con un –.

[illegible]BLIOGRAFÍA

[illegible]

[illegible] (2002) Genomes 2, 2.ª ed. New York: Wiley-Liss.
[illegible] (2004) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 69.
[illegible] Hood L, Goldberg ML et al (2006) Genetics: from Genes to [illegible], 3.ª ed. Boston: McGraw Hill.
[illegible] Berk A, Kaiser CL et al (2007) Molecular Cell Biology, 6.ª ed. New York: [illegible]eman.
[illegible] SL & Yamamoto KR (eds) (1993) Transcriptional Regulation. Cold [illegible] Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
[illegible] of Transcription (1998) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63.
[illegible] M & Gann A (2002) Genes and Signals. Cold Spring Harbor [illegible]y Press, Cold Spring Harbor.
[illegible] RNAs (2006) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71.
[illegible] Baker TA, Bell SP et al (2003) Molecular Biology of the Gene, 5.ª ed. [illegible] Park, CA: Benjamin Cummings.

[illegible]ucción al control génico

[illegible] KH, McWhir J, Ritchie WA & Wilmut I (1996) Sheep cloned by nuclear [illegible] from a cultured cell line. *Nature* 380:64–66.
[illegible] EH (2006) The Regulatory Genome: Gene Regulatory Networks in [illegible]ment and Evolution. Burlington, MA: Elsevier.
[illegible] (1992) The generation of diversity and pattern in animal [illegible]ment. *Cell* 68:185–199.
[illegible] & Tjian R (2003) Transcription regulation and animal diversity. *Nature* [illegible]–151.
[illegible] Scherf U, Eisen MB et al (2000) Systematic variation in gene [illegible]on patterns in human cancer cell lines. *Nature Genet* 24:227–235.

[illegible] estructurales de unión a DNA en las proteínas [illegible]lación génica

[illegible] Affolter M & Burglin T (1994) Homeodomain proteins. *Annu Rev* [illegible] 63:487–526.
[illegible] CT, Gordon DB, Lee TI et al (2004) Transcriptional regulatory code of [illegible] genome. *Nature* 431:99–104.
[illegible] NM, Austin SE, Berman HM, et al (2000) An overview of the [illegible] of protein–DNA complexes. *Gen Biol* 1:reviews 001.1–001.37.
[illegible] (1991) Molecular zippers in gene regulation. *Sci Am* 264:54–64.
[illegible] & Sauer RT (1992) Transcription factors: structural families and [illegible] of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* 61:1053–1095.
[illegible] & Klug A (1993) Zinc fingers. *Sci Am* 268:56–65.
[illegible] Rosenberg JM & Rich A (1976) Sequence-specific recognition of [illegible] helical nucleic acids by proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:804–808.

[illegible] funcionan los interruptores genéticos

[illegible] & Hörz W (2002) ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev* [illegible] 71:247–273.
[illegible] (1987) The operon: an historical account. In *Escherichia coli* and [illegible] *typhimurium*: Cellular and Molecular Biology (Neidhart FC, [illegible] JL, Low KB et al eds), vol 2, pp 1439–1443. Washington, DC: ASM [illegible]
[illegible] & Felsenfeld G (2006) Insulators: exploiting transcriptional and [illegible] mechanisms. *Nature Rev Genet* 7:703–713.
[illegible] & Müller-Hill B (1967) The lac operator is DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* [illegible]
[illegible] (2005) Eukaryotic transcription activation: right on target. *Mol Cell* [illegible]–402.
[illegible] & Monod J (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of [illegible] *J Mol Biol* 3:318–356.
[illegible] L, Swigon D, Murakami KS et al (2004) Catabolite activator protein: [illegible] binding and transcription activation. *Curr Opin Struct Biol* 14:10–20.
[illegible] & Grunstein M (2006) Genome-wide patterns of histone [illegible]ions in yeast. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:657–666.
[illegible] Fan HY & Kingston RE (2002) Cooperation between complexes [illegible] regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108:475–487.

Oehler S, Eismann ER, Krämer H et al (1990) The three operators of the lac operon cooperate in repression. *EMBO J* 9:973–979.
Ptashne M (2004) A Genetic Switch: Phage and Lambda Revisited, 3.ª ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Ptashne M (1967) Specific binding of the lambda phage repressor to lambda DNA. *Nature* 214:232–234.
St Johnston D & Nusslein-Volhard C (1992) The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 68:201–219.
Strahl BD & Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403:41–45.

Mecanismos genéticos moleculares que originan tipos celulares especializados

Alon, U (2006) An Introduction to Systems Biology: Design Principles of Biological Circuits (Chapman & Hall/Crc Mathematical and Computational Biology Series) TF Chapman.
Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ et al (2005) Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nature Rev Genet* 6:544–556.
Bernstein BE, Meissner A & Lander ES (2007) The mammalian epigenome. *Cell* 128:669–681.
Herskowitz I (1989) A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast. *Nature* 342:749–757.
Klose RJ & Bird AP (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31:89–97.
Meyer BJ (2000) Sex in the worm: counting and compensating X-chromosome dose. *Trends Genet* 16:247–253.
Surani MA (2001) Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* 414:122–128.
Tapscott SJ (2005) The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription. *Development* 132:2685–2695.

Controles postranscripcionales

Bass BL (2002) RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. *Annu Rev Biochem* 71:817–846.
Blencowe BJ (2006) Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* 126:37–47.
Brennecke J, Stark A, Russell RB et al (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biology* 3.
Fire A, Xu S, Montgomery MK et al (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806–811.
Frankel AD & Young JAT (1998) HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 67:1–25.
Gottesman S (2004) The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms. *Annu Rev Microbiol* 58:303–328.
Mello CC & Conte D (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431:338–342.
Parker R & Sheth U (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 25:635–646.
Stuart KD, Schnaufer A, Ernst NL et al (2005) Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem Sci* 30:97–105.
Tolia NH & Joshua-Tor L (2007) Slicer and the argonautes. *Nature Chem Biol* 3:36–43.
Tomari Y & Zamore PD (2005) Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 19:517–529.
Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ et al (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* 20:515–524.
Verdel A & Moazed D (2005) RNAi-directed assembly of heterochromatin in fission yeast. *FEBS Letters* 579:5872–5878.
Wilhelm JE & Smibert, CA (2005) Mechanisms of translational regulation in *Drosophila*. *Biol Cell* 97:235–252.
Winkler WC & Breaker RR (2005) Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annu Rev Microbiol* 59:487–517.

III MÉTODOS

Parte III
Capítulos

8 Manipulación de proteínas, DNA y RNA

9 Observar las células



Manipulación de proteínas, DNA y RNA

8

En este capítulo

AISLAMIENTO Y CRECIMIENTO DE CÉLULAS EN CULTIVO 501

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS 510

ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS 517

ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DEL DNA 532

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y LA FUNCIÓN DE LOS GENES 553

En muchas ocasiones, el progreso de la ciencia viene guiado por los avances en la tecnología. La biología celular, por ejemplo, inició una nueva era cuando los ópticos aprendieron a pulir pequeñas lentes con suficiente calidad como para observar las células y sus estructuras. Las innovaciones en la confección de las lentes, más que ningún avance conceptual o filosófico, permitieron a Hooke y van Leeuwenhoek descubrir un mundo desconocido de células donde minúsculas criaturas caían y giraban en una pequeña gota de agua (**Figura 8–1**).

El siglo XXI promete ser un periodo particularmente emocionante para la biología. Los nuevos métodos de análisis de proteínas, de DNA y de RNA están avivando una explosión de información, ya que permiten a los científicos estudiar las células y sus macromoléculas de formas antes inimaginables. En la actualidad, disponemos de las secuencias de miles de millones de nucleótidos, que proporcionan los mapas moleculares completos de centenares de organismos, desde microbios hasta gusanos, moscas, perros, chimpancés y humanos. Contamos también con técnicas nuevas y potentes que facilitan el desciframiento de esta información, y permiten no sólo compilar enormes catálogos detallados de genes y proteínas, sino también empezar a desentrañar cómo colaboran estos componentes formando células y organismos funcionales. La meta es nada menos que comprender por completo lo que sucede en la célula en respuesta a su entorno y a su interacción con las células vecinas. Queremos saber qué genes se activan, qué mRNA transcrito se encuentra presente y qué proteínas son activas –dónde están situadas, con qué otras proteínas y otras moléculas se asocian y a qué rutas pertenecen. Asimismo queremos entender cómo la célula gestiona con este asombroso número de variables y cómo decide, al realizar sus diversas tareas biológicas, entre un número casi ilimitado de posibilidades. Disponer de semejante información permitirá empezar a construir un marco para delinear y, ocasionalmente, predecir, cómo trabajan los genes y las proteínas en su asentamiento de las bases de la vida.

En este capítulo repasaremos algunos de los métodos más importantes utilizados para estudiar los componentes moleculares de las células, centrándonos particularmente en las proteínas, el DNA y el RNA. También se considerará cómo se pueden separar los diferentes tipos celulares de los tejidos y conseguir que crezcan fuera del cuerpo, y cómo se pueden romper las células para aislar en forma pura sus orgánulos y macromoléculas constituyentes. Presentaremos la última tecnología utilizada para el análisis de la estructura proteica, su función y sus interacciones, y revisaremos los avances en la tecnología del DNA recombinante, que sigue revolucionando la comprensión de la funcionalidad celular.

Las técnicas y métodos descritos han hecho posible los descubrimientos que se presentan a lo largo de todo este libro y son utilizados a diario por decenas de miles de científicos y científicas.

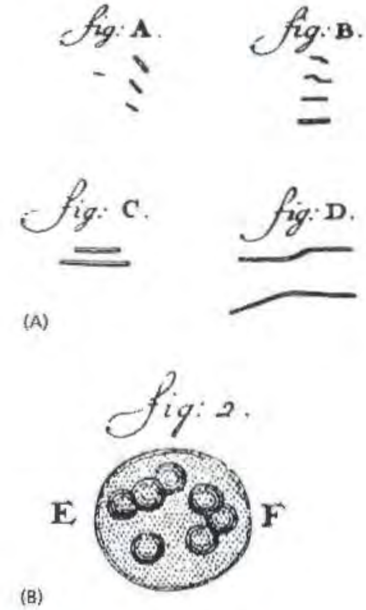


Figura 8–1 Vida microscópica. Muestra de los "*animálculos*" vistos por Leeuwenhoek a través de su microscopio simple (lupa). (A) Bacterias observadas en el material que extrajo de entre sus dientes. Las de la figura B, las describió como "primero nadando hacia adelante y luego hacia atrás" (1692). (B) El alga verde eucariota *Volvox* (1700). (Cortesía de John Innes Foundation.)

AISLAMIENTO Y CRECIMIENTO DE CÉLULAS EN CULTIVO

Aunque los orgánulos y las moléculas de mayor tamaño de una célula pueden ser observados con el microscopio, la comprensión del funcionamiento de estos componentes requiere un análisis bioquímico detallado. La mayoría de los procedimientos bioquímicos parten de una gran cantidad de células que se rompen para acceder a sus componentes. Si la muestra es un trozo de tejido, compuesto de diferentes tipos celulares, se obtendrá una mezcla heterogénea de poblaciones celulares. Con el objetivo de obtener la mayor información posible sobre las diferentes células de un tejido, se han desarrollado estrategias de disgregación de

las células de los tejidos y de separación de los diferentes tipos celulares. Estas técnicas permiten obtener poblaciones celulares relativamente homogéneas, que pueden ser analizadas de forma directa o después de incrementar en gran medida su número tras permitirlas proliferar en cultivo.

Las células pueden ser aisladas a partir de tejidos intactos

Los tejidos son la mejor fuente de material, ya que representan a las células que podemos encontrar en el cuerpo. El primer paso del aislamiento de células individuales consiste en romper la matriz extracelular y las uniones intercelulares que mantienen unidas las células entre sí. Con este propósito, normalmente, se trata una muestra de tejido con enzimas proteolíticas (como la tripsina y la colagenasa) para digerir las proteínas de la matriz extracelular, y con agentes, como el ácido etilén-diamín tetraacético o EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*), que capturan el Ca^{2+} del que depende la adhesión célula-célula. Entonces, los tejidos pueden ser disociados en células individuales mediante agitación suave.

En algunas preparaciones bioquímicas, la proteína de interés se puede obtener en cantidad suficiente sin tener que separar el tejido o el órgano en sus diferentes tipos celulares. Algunos ejemplos son la preparación de histonas a partir de timo de ternera, la actina de músculo de conejo o la tubulina de cerebro de vaca. En otros casos, la obtención de una proteína concreta requiere el enriquecimiento en un tipo celular específico. Para separar los diferentes tipos celulares a partir de una suspensión celular mixta, se utilizan diversos métodos. Una de las técnicas más comunes de separación celular se basa en el marcaje específico de las células con anticuerpos acoplados a un colorante fluorescente. El anticuerpo escogido se une específicamente a la superficie de un único tipo celular. Las células marcadas pueden ser separadas de las no marcadas mediante un *clasificador celular activado por fluorescencia*. En este aparato destacable, las células pasan en "fila india" a través de un haz láser determinándose la fluorescencia de cada célula. Una boquilla vibratoria forma diminutas gotitas, la mayoría de las cuales contienen una célula o no contienen ninguna. En el momento de formarse, las gotitas que contienen una sola célula reciben automáticamente una carga eléctrica positiva o negativa, dependiendo de si la célula es fluorescente o no lo es; a continuación, son desviadas por un potente campo eléctrico hacia un contenedor apropiado. Los grupos de células que se forman ocasionalmente son detectados por su mayor dispersión de luz y no reciben carga, de forma que caen en un contenedor residual. Estas máquinas pueden seleccionar 1 célula entre 1000 y clasificar varios miles células por segundo (**Figura 8–2**).

Las células de interés también pueden obtenerse mediante su disección a partir de cortes finos de tejido preparados para microscopía (véase Capítulo 9). En un protocolo estándar, el corte de tejido se recubre con una delgada capa de plástico y la región que contiene las células de interés se irradia con un haz de láser infrarrojo. Este pulso de luz láser funde un pequeño círculo sobre la película de plástico, bajo el que están unidas las células. Entonces estas células pueden separarse para su análisis posterior. Esta técnica, llamada *microdisección por captura láser*, puede utilizarse para separar y analizar células de diferentes áreas de un tumor, permitiendo así comparar sus propiedades o su composición molecular con las de células normales adyacentes. Una técnica relacionada con la anterior utiliza un haz láser para recortar directamente un grupo de células y catapultarlas a un contenedor apropiado para su análisis posterior (**Figura 8–3**).

Una población uniforme de células obtenida por cualquier método de separación puede utilizarse directamente para análisis bioquímicos. Después de romper las células mediante un procedimiento mecánico, detergente o cualquier otro método, se pueden aislar tanto el citoplasma como los diversos orgánulos y purificar las moléculas de interés.

Las células pueden hacerse crecer en una placa de cultivo

Aunque las moléculas pueden ser purificadas a partir de tejidos, a menudo esta no es la fuente de material más recomendada, ya que requiere, por ejemplo, la recogida de muestras orgánicas en los mataderos. El problema no es sólo cuestión de comodidad. Normalmente las reses utilizadas como fuente de órganos no colaboran con la manipulación genética. Por otra parte, cuando se intenta purificar moléculas determinadas, la complejidad de los tejidos y órganos intactos es una desventaja inherente al material. El cultivo celular aporta una pobla-

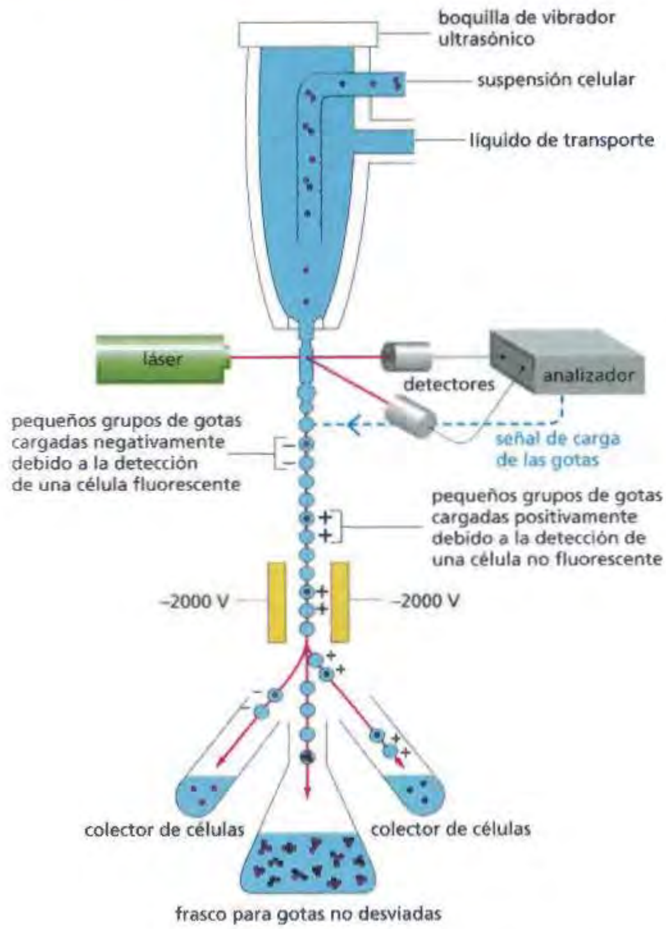


Figura 8–2 Clasificador de células activado por fluorescencia. En primer lugar se determina la fluorescencia de las células que pasan a través de un rayo láser. Las gotitas que contienen una sola célula reciben una carga negativa o positiva, según la célula sea fluorescente o no. Posteriormente las gotitas son desviadas en función de su carga, mediante un campo eléctrico, hacia los tubos de recogida. Nótese que la concentración celular debe ajustarse de modo que la mayoría de las gotitas no contengan ninguna célula y, por tanto, fluyan al contenedor residual junto con aquellas que contengan más de una célula.

...homogénea de células de las cuales se puede extraer material de forma más convenien-te para trabajar en el laboratorio. La mayoría de tipos celulares, tanto vegetales como anima-les sobreviven, se multiplican e incluso, en condiciones adecuadas, expresan propiedades diferenciales en una placa de cultivo. Las células pueden visualizarse al microscopio o anali-zarse bioquímicamente y se pueden estudiar de forma sistemática los efectos de la adición o eliminación de determinadas moléculas tales como hormonas o factores de crecimiento. Además, en cultivos mixtos pueden estudiarse las interacciones entre un tipo celular y otro.

A menudo se dice que los experimentos con células cultivadas han sido realizados *in vitro* (literalmente "en vidrio"); por el contrario de los experimentos realizados en organis-mos intactos se dice que han sido realizados *in vivo* (literalmente "en el organismo vivo"). Es-tos dos términos pueden resultar confusos porque a menudo se utilizan en un sentido diferente por los bioquímicos, para los que *in vitro* se refiere a las reacciones bioquímicas que se producen fuera de la célula mientras que *in vivo* se refiere a cualquier reacción que se produce dentro de una célula viva, aunque esté creciendo en cultivo.

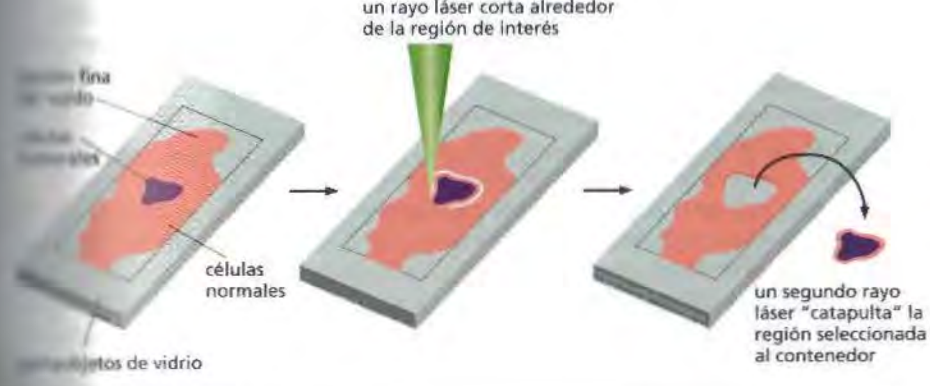


Figura 8–3 Técnicas de microdisección para seleccionar células de cortes histológicos. Este método utiliza un rayo láser para escindir una región de interés y hacerla saltar a un contenedor; el método permite incluso el aislamiento de una sola célula a partir de una muestra de tejido.

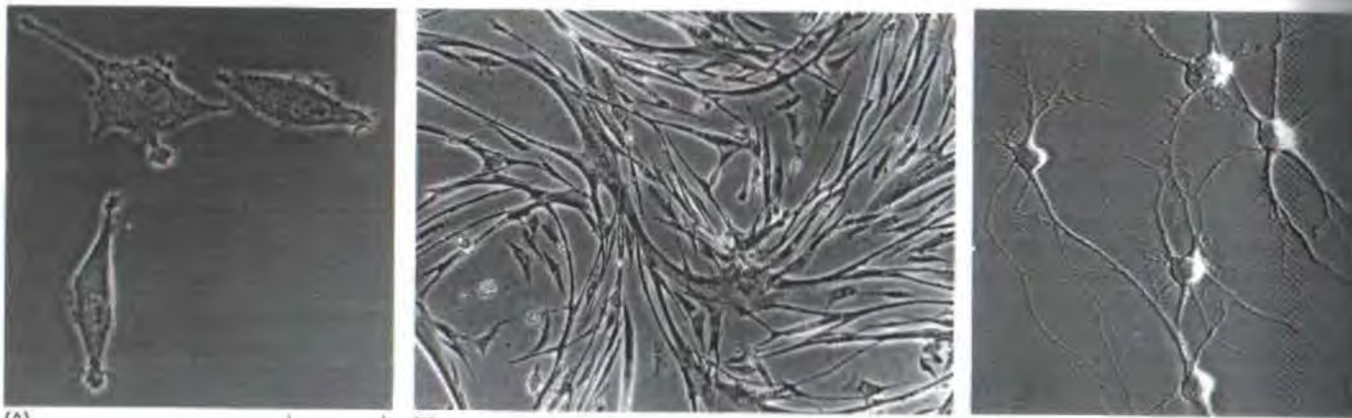




Figura 8–4 Micrografía de contraste de fase de células en cultivo. (A) Fibroblastos de ratón en cultivo. (B) Mioblastos de pollo en cultivo que se fusionan y forman fibras musculares plurinucleadas. (C) Células nerviosas purificadas del ganglio retiniano de la rata. (D) Células de tabaco en cultivo líquido. (A, cortesía de Daniel Zicha; B, cortesía de Rosalind Zalin; C, de A. Meyer-Franke et al., *Neuron* 15:805-819, 1995. Con la autorización de Elsevier; D, cortesía de Gethin Roberts.)

El cultivo de tejidos empezó en 1907 con un experimento destinado a finalizar una controversia de la neurobiología. La hipótesis que se discutía era conocida bajo el nombre de "teoría neuronal", la cual afirmaba que cada fibra nerviosa es una prolongación de una sola célula nerviosa y no el producto de la fusión de varias células. Para dilucidar esta polémica se colocaron pequeños fragmentos de médula espinal en plasma coagulado dentro de una cámara húmeda y caliente y se observaron al microscopio a intervalos regulares de tiempo. Al cabo de un día aproximadamente se pudo observar cómo las distintas células nerviosas emitían prolongaciones largas y finas (axones) hacia el plasma coagulado. De esta manera quedó demostrada la teoría neuronal y se establecieron las bases de la revolución del cultivo celular.

Estos experimentos iniciales implicaban el cultivo de pequeños fragmentos de tejido denominados explantes. En la actualidad, los cultivos se preparan habitualmente a partir de suspensiones de células obtenidas por disociación de tejidos, tal como se ha descrito. A diferencia de las bacterias, la mayor parte de las células de los tejidos no están adaptadas para crecer suspendidas en fluidos, de forma que necesitan una superficie sólida sobre la que poder crecer y dividirse. Actualmente este soporte lo constituye una superficie de plástico de una placa de cultivo. Sin embargo, los distintos tipos celulares tienen requerimientos diferentes, de forma que algunos de ellos no crecen o no se diferencian, a menos que la placa de cultivo esté recubierta con materiales que faciliten la adhesión celular, tales como la polilisina o componentes de matriz extracelular.

Los cultivos preparados directamente a partir de los tejidos de un organismo, con o sin fraccionamiento previo, reciben el nombre de *cultivos primarios*. En la mayoría de los casos, las células de los cultivos primarios pueden recuperarse de la placa de cultivo y recultivarse repetidamente utilizándose para formar un gran número de cultivos secundarios (*pases*). De esta forma las células pueden ser subcultivadas de forma repetida durante semanas o meses. A menudo estas células muestran propiedades diferenciadas típicas que hacen referencia a sus orígenes (**Figura 8–4**): los fibroblastos continúan segregando colágeno; las células derivadas del músculo esquelético embrionario se fusionan formando fibras musculares gigantes que se contraen espontáneamente en la placa de cultivo; las células nerviosas emiten axones excitables por vía eléctrica y que establecen sinapsis con otras células nerviosas; las células epiteliales forman extensas láminas con las propiedades de un epitelio intacto. Puesto que estas propiedades se mantienen en los cultivos, resultan accesibles al estudio a través de sistemas y técnicas que no se pueden aplicar en los tejidos intactos.

Los cultivos celulares no sólo se limitan a células animales. Cuando se cultiva un trozo de tejido vegetal en un medio estéril, suplementado con nutrientes y reguladores de crecimiento apropiados, muchas células proliferan de forma indefinida de manera desorganizada y producen una masa de células indiferenciadas denominada *callo*. Si los nutrientes y los reguladores de crecimiento son manipulados cuidadosamente, a partir del callo se pueden inducir los meristemos de la raíz y de los brotes. Al final, en muchas especies se logra la regeneración de una nueva planta. De forma similar a los cultivos de células animales, los cultivos de callo se pueden disociar en células aisladas que se dividen y crecen en cultivos en suspensión (véase Figura 8–4D).

Las líneas celulares eucariotas son una fuente muy utilizada para la obtención de células homogéneas

Los cultivos celulares obtenidos a partir de tejidos disgregados tienden a sufrir un problema: al final las células mueren. La mayoría de las células de los vertebrados dejan de dividirse en cultivo tras un número finito de divisiones celulares, proceso conocido como *senescencia celular replicativa* (véase Capítulo 17). Por ejemplo, los fibroblastos humanos en cultivo dejan de dividirse tras 25-40 divisiones. En estas células, la capacidad de proliferación limitada está asociada al acortamiento progresivo y a la pérdida de protección de los telómeros de la célula, que son las estructuras de DNA y proteína situadas en los extremos de los cromosomas (véase Capítulo 5). Las células somáticas del cuerpo humano tienen desactivada la producción de la *telomerasa*, una enzima responsable del mantenimiento de los telómeros, por lo que en cada división sufren un acortamiento de los telómeros. Sin embargo, los fibroblastos humanos a menudo pueden proliferar indefinidamente en cultivo si se les aporta el gen que codifica la subunidad catalítica de la telomerasa; entonces pueden propagarse como una línea celular "inmortalizada".

No siempre es posible obtener líneas de células humanas inmortalizadas del modo anterior. Aunque los telómeros permanezcan intactos, las células pueden dejar de dividirse tras un número limitado de divisiones. Este fenómeno es debido a que las condiciones del cultivo fisiológicamente activan *mecanismos de control* del ciclo celular (descritos en el Capítulo 17) que conducen a una parada del ciclo celular o "choque en cultivo". Para inmortalizar estas células es necesario hacer algo más que introducir la telomerasa: debemos inactivar los mecanismos de control introduciendo determinados oncogenes promotores de cáncer que derivan de virus tumorales (tratado en el Capítulo 20). A diferencia de las células humanas, la mayoría de las células de los roedores no desactivan la telomerasa, por lo que sus telómeros no se acortan en cada ciclo de división celular. Por lo tanto, algunas de esas líneas pueden dividirse indefinidamente en cultivo evitando así el "choque en cultivo". Además, cuando las células de roedores crecen en cultivo suelen sufrir cambios genéticos que inactivan los mecanismos de control, produciéndose así líneas celulares inmortalizadas de forma espontánea.

A menudo se pueden preparar de forma más fácil líneas celulares humanas a partir de células cancerosas, pero estos cultivos difieren en varios aspectos de las preparadas a partir de células normales y se les denomina *líneas celulares transformadas*. De esta manera las líneas de células cancerosas pueden crecer sin adherirse a ninguna superficie y proliferan en una placa de cultivo hasta una densidad mucho mayor a la de las células normales. Experimentalmente se pueden inducir propiedades similares a éstas en células normales, mediante la transformación con un virus inductor de tumores o con una sustancia química. A menudo, las líneas celulares transformadas resultantes son capaces de provocar tumores si se inyectan a un animal (aunque esta propiedad la presenta una pequeña proporción de la población, denominada células madre cancerosas –descrita en el Capítulo 20).

Las líneas celulares, tanto transformadas como no transformadas, resultan muy útiles para la investigación celular puesto que suponen una fuente de grandes cantidades de células de un tipo uniforme; además, presentan la ventaja de poder ser guardadas en nitrógeno líquido a –196 °C durante un periodo indefinido de tiempo, manteniendo la viabilidad después de descongeladas. Sin embargo, es importante tener presente que las células de ambos tipos de líneas celulares casi siempre difieren notablemente de las células normales de las que derivan.

En la **Tabla 8–1** se enumeran algunas de las líneas celulares utilizadas con más frecuencia. Cada línea celular presenta diferentes ventajas. Por ejemplo, las líneas celulares epiteliales PtK, derivadas de la rata canguro, permanecen planas durante la mitosis (a diferencia de la mayoría de células, que se redondean) y permiten la observación del aparato mitótico en acción.

Las células madre embrionarias podrían revolucionar la medicina

Desde un punto de vista médico, es prometedor el desarrollo de cultivos a partir de líneas de células madre embrionarias humanas (ES: *human embryonic stem cell lines*). Estas sorprendentes células, obtenidas de la masa interior del embrión en fases tempranas, pueden proliferar indefinidamente en cultivo a la vez que mantienen una ilimitada capacidad de diferenciación. Las células cultivadas en placas, cuando se someten a unas condiciones de fases tempranas del desarrollo embrionario, pueden diferenciarse a cualquier tipo celular

Tabla 8–1 Algunas líneas celulares utilizadas habitualmente

LÍNEA CELULAR*	TIPO CELULAR Y ORIGEN
3T3	fibroblasto (ratón)
BHK21	fibroblasto (hámster sirio)
MDCK	célula epitelial (perro)
HeLa	célula epitelial (humana)
PtK1	célula epitelial (rata canguro)
L6	mioblasto (rata)
PC12	célula cromafínica (rata)
SP2	célula plasmática (ratón)
COS	riñón (mono)
293	riñón (humano); transformada con adenovirus
CHO	ovario (hámster chino)
DT40	célula de linfoma para recombinación dirigida eficiente (pollo)
R1	células madre embrionarias (ratón)
E14.1	células madre embrionarias (ratón)
H1, H9	células madre embrionarias (humana)
S2	células semejantes a macrófagos (*Drosophila*)
BY2	células meristemáticas indiferenciadas (tabaco)

* Muchas de estas líneas celulares derivan de tumores. Todas ellas son capaces de multiplicarse indefinidamente en cultivo y expresan por lo menos algunas de las propiedades diferenciales de su origen celular.

del cuerpo, incluyendo las células germinales (**Figura 8–5**). Sus descendientes en el embrión son capaces de integrarse a la perfección en cualquier sitio que ocupen, adoptando el carácter y el comportamiento de las células normales que residan en ese lugar.

Las células ES, derivadas de embriones humanos en fases tempranas del desarrollo, presentan propiedades similares a las de origen murino. Estas células suponen una fuente inagotable de material que puede ser usado para reemplazar y reparar tejido humano maduro. Los experimentos en ratón sugieren que, en un futuro, será posible el uso de células ES para producir células especializadas en terapias destinadas a reemplazar las fibras de la musculatura esquelética que han degenerado en pacientes de distrofia muscular, las células nerviosas que mueren en enfermos de Parkinson, las células secretoras de insulina que se han destruido en los diabéticos de tipo 1 y las células cardíacas muertas tras un ataque de co-

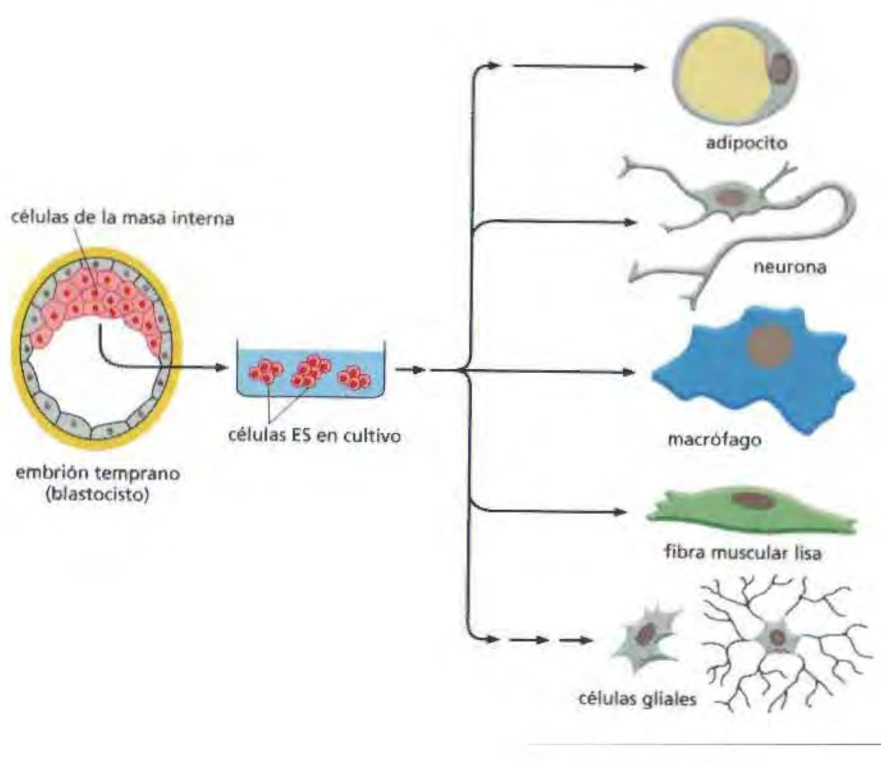


Figura 8–5 Células madre embrionarias (ES) derivadas de un embrión. Estas células en cultivo pueden dar lugar a todos los tipos celulares del cuerpo. Las células ES son extraídas de la masa interna celular de un embrión temprano y se pueden mantener indefinidamente en cultivo como células madre (se explica en el Capítulo 23). Si estas células son introducidas de nuevo en un embrión, se pueden integrar perfectamente y diferenciarse según el entorno en el que se encuentren. Las células también se pueden mantener como una línea celular inmortal en cultivo y suplementarlas con hormonas o factores de crecimiento para inducir su diferenciación en tipos celulares determinados. (Basado en E. Fuchs y J.A. Segré, *Cell* 100:143-155, 2000. Con la autorización de Elsevier.)

sueño. Tal vez, algún día se puedan hacer crecer órganos enteros a partir de células ES mediante una recuperación del crecimiento embrionario. Sin embargo, se tiene que evitar el trasplante directo de células ES en individuos adultos, ya que pueden producir los tumores denominados teratomas.

Existe otro gran problema asociado a la utilización de células ES para la reparación de tejidos. Las células trasplantadas podrían diferir genéticamente de las células del individuo receptor. En este caso, el sistema inmunitario del paciente receptor rechazará y destruirá las células del donante. Este problema se evita si las células utilizadas para la reparación son obtenidas del propio cuerpo del paciente receptor. Tal como se menciona en el Capítulo 23, numerosos tejidos adultos contienen células madre dedicadas a la producción continua de uno o varios tipos celulares especializados. Un objetivo importante en la investigación con células madre es la manipulación del comportamiento de las células madre adultas para su uso en la reparación tisular.

Sin embargo, la tecnología de las células ES también ofrece la posibilidad de afrontar el problema del rechazo inmunológico mediante la estrategia denominada "clonación terapéutica" como explicaremos a continuación.

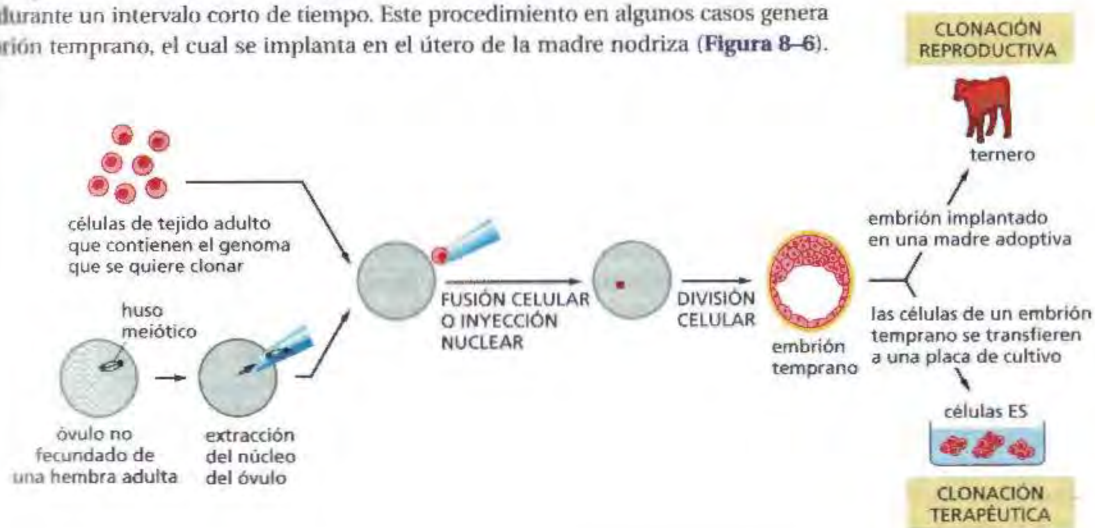
El trasplante del núcleo de células somáticas puede ser un mecanismo para generar células madre personalizadas

El término "clonación" se ha utilizado de manera muy confusa ya que aglutina la descripción de varios procedimientos distintos. Es importante entender los diferentes significados, especialmente en el contexto del debate público sobre la ética y la investigación con células madre.

Como definen los biólogos, un *clon* es simplemente un grupo de individuos que son genéticamente idénticos ya que descienden de un ancestro común. El tipo más simple de clonación es la clonación celular. Esto es, el aislamiento de una única célula madre epidérmica de la piel dejándola crecer y dividirse en cultivo para obtener un gran clon de células epidérmicas idénticas, que pueden ser utilizadas para ayudar a reconstruir la piel desnuda de un paciente quemado. Esta clase de clonación no es más que una extensión, por medios artificiales, de los procesos de proliferación y reparación celular que ocurren normalmente en el cuerpo humano.

La clonación de animales pluricelulares enteros, denominada *clonación reproductiva*, es una empresa muy diferente. Implica un planteamiento mucho más radical que el curso habitual de la naturaleza. Normalmente, cada animal tiene una madre y un padre y no es genéticamente idéntico a ninguno de ellos. La necesidad de los dos progenitores y la unión sexual no son necesarias en la clonación reproductiva. Este complicado fenómeno se ha conseguido en algunas especies de mamíferos, tales como los corderos y otros animales domésticos, mediante el *trasplante de núcleo de células somáticas*. El procedimiento comienza con un óvulo no fecundado. El núcleo de esta célula haploide se succiona y es reemplazado por un núcleo diploide de una célula somática. La célula donante diploide proviene por lo general de un tejido de un individuo adulto. La célula híbrida, formada por un núcleo donante diploide introducido en el citoplasma de un óvulo receptor, se desarrolla en un cultivo durante un intervalo corto de tiempo. Este procedimiento en algunos casos genera un embrión temprano, el cual se implanta en el útero de la madre nodriza (**Figura 8–6**).

Figura 8–6 Clonación reproductiva y terapéutica. Las células de un tejido adulto se utilizan para la clonación reproductiva o para generar células ES personalizadas (también denominada clonación terapéutica).



Con suerte, se desarrolla un embrión normal y, por último, un nuevo animal. Un individuo producido por clonación reproductiva de esta manera, debería ser genéticamente idéntico al individuo adulto que donó la célula diploide (exceptuando una pequeña cantidad de material genético mitocondrial que es inherente al propio citoplasma del óvulo).

La clonación terapéutica, que es muy diferente de la clonación reproductiva, emplea la técnica del trasplante del núcleo de células somáticas para producir células ES personalizadas (véase Figura 8–6). En este caso, el embrión temprano generado por trasplante nuclear, que está formado por unas 200 células, no se transfiere al útero de una madre nodriza. Por el contrario, este embrión es utilizado como fuente de células ES, que son diferenciadas en cultivo, con el interés de generar distintos tipos celulares que podrían ser utilizados para la reparación de tejidos. Las células originadas por este procedimiento son casi idénticas genéticamente al donante del núcleo original, por lo que pueden ser trasplantadas de nuevo al donante sin la preocupación de un rechazo inmunológico.

La transferencia nuclear de células somáticas tiene potencialmente beneficios adicionales para el estudio de las enfermedades humanas hereditarias. Las células ES que han recibido un núcleo somático de un individuo con una enfermedad hereditaria, pueden ser utilizadas directamente para estudiar el mecanismo por el cual se desarrolla la enfermedad. Esto se puede realizar mientras las células ES son inducidas a diferenciarse en diversos tipos celulares. Células ES específicas para una enfermedad, y su progenie diferenciada, pueden ser utilizadas para el estudio de la progresión de estas enfermedades y el desarrollo de nuevos fármacos para su tratamiento. Estas estrategias están aún en fases muy tempranas, e incluso en algunos países ciertos aspectos de esta tecnología están fuera de la ley. Está aún por determinar si las células ES humanas se pueden producir por transferencia nuclear y si podrán satisfacer las grandes esperanzas que los científicos han puesto en ellas.

Las líneas celulares de hibridomas son fábricas que producen anticuerpos monoclonales

Como se ha señalado, los anticuerpos son unas herramientas muy útiles en biología celular. Su gran especificidad permite una visualización precisa de proteínas específicas entre las varias miles que produce cada célula. Los anticuerpos se producen habitualmente mediante la inoculación de la proteína de interés en animales y a continuación se purifican los anticuerpos específicos contra la proteína a partir del suero del animal. Sin embargo, a partir de un único animal inoculado sólo se pueden obtener cantidades limitadas de anticuerpos; estos anticuerpos producidos serán de naturaleza heterogénea, ya que reconocerán un repertorio de zonas antigénicas de una misma macromolécula, la cual puede diferir entre distintos animales. Sin embargo, los anticuerpos específicos para un determinado antígeno suelen ser una pequeña parte del total de anticuerpos encontrados en el suero. Una tecnología alternativa, que permite la producción infinita de anticuerpos idénticos y que incrementa su especificidad, y la metodología basada en el uso de anticuerpos, es la producción de anticuerpos monoclonales en líneas celulares de hibridomas.

En 1975, el desarrollo de este tipo de tecnología revolucionó la producción de anticuerpos como herramientas en biología celular así como para el diagnóstico y el tratamiento de ciertas enfermedades como la artritis reumatoide y el cáncer. El procedimiento requiere el uso de la tecnología de células híbridas (**Figura 8–7**) y se basa en propagar un clon de células a partir de un solo linfocito B secretor de anticuerpos, con lo que se pueden obtener grandes cantidades de una preparación homogénea de anticuerpos. Sin embargo, el problema es que los linfocitos B tienen una vida limitada en cultivo. Para solucionar esta limitación, se fusionan linfocitos B individuales productores de anticuerpos, procedentes de un ratón o de una rata inmunizada, con células derivadas de una línea celular transformada de linfocitos B. Esto puede generar híbridos que presentan tanto la capacidad de producir un determinado anticuerpo como la capacidad de multiplicarse indefinidamente en cultivo. Estos **hibridomas** se propagan como clones individuales, cada uno de los cuales constituye una fuente permanente y estable de un **anticuerpo monoclonal** (**Figura 8–8**). Cada tipo de anticuerpo monoclonal reconocerá un solo tipo de lugar antigénico, como un grupo concreto de cinco o seis cadenas laterales de aminoácidos de la superficie de una proteína. La especificidad uniforme de estos anticuerpos monoclonales determina que sean una herramienta mucho más útil que los antisueros convencionales en la mayoría de los casos.

Una gran ventaja de la técnica de hibridomas consiste en que los anticuerpos monoclonales pueden hacerse contra moléculas que sólo constituyen una pequeña parte de una

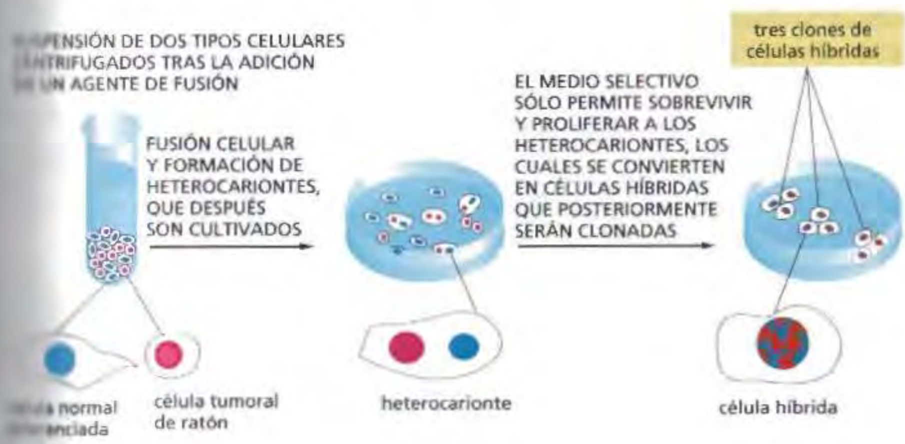


Figura 8–7 Producción de células híbridas. Es posible fusionar dos células para formar un *heterocarionte*: una célula combinada con dos núcleos diferentes. Normalmente, una suspensión de células se trata con ciertos virus inactivados o con polietilenglicol, ambos alteran la membrana plasmática de las células de manera que se induce la fusión celular. Finalmente un heterocarionte entra en mitosis y produce una célula híbrida en la que las dos envueltas nucleares se han disgregado, permitiendo que todos los cromosomas se concentren en un solo núcleo. Estas células híbridas generan líneas celulares híbridas inmortales. Si una de las células precursoras procede de una línea celular tumoral, la célula híbrida se llama hibridoma.

…la compleja. En un antisuero ordinario contra esa mezcla, la proporción de moléculas …ticuerpo que reconocen los componentes minoritarios sería demasiado pequeña para …til. Pero si los linfocitos B que producen los diferentes componentes de este antisuero se …rman en hibridomas, será posible seleccionar clones de hibridoma individuales para …ionar el que produce el anticuerpo monoclonal del tipo deseado y propagar indefini…nte el hibridoma seleccionado para producir el anticuerpo requerido en cantidades ili…das. En principio, pues, se puede obtener un anticuerpo monoclonal contra cualquier …ína de una muestra biológica.

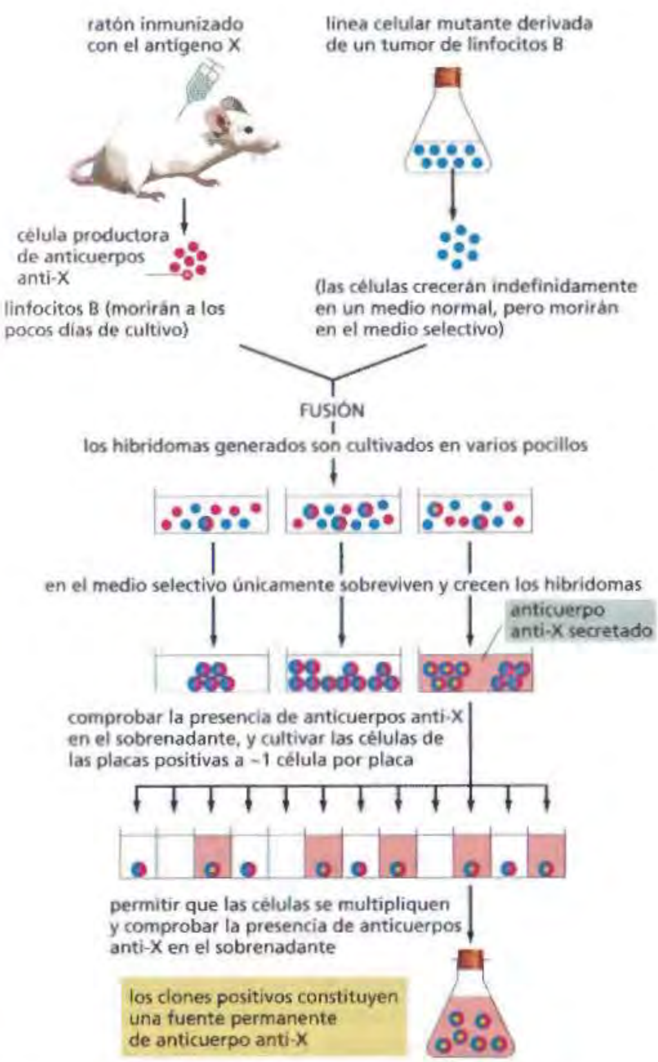


Figura 8–8 Preparación de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales contra un antígeno determinado. En esta figura, designaremos al antígeno de interés como "antígeno X". El medio de crecimiento selectivo utilizado contiene un inhibidor (la aminopterina) que bloquea las rutas normales de biosíntesis a través de las que se sintetizan los nucleótidos. Por consiguiente, las células tienen que utilizar una ruta alternativa para sintetizar sus ácidos nucleicos. La línea celular mutante derivada del tumor de células B es deficiente para esta vía, pero no así las células normales obtenidas del ratón inmunizado. Puesto que ninguno de los dos tipos celulares utilizados para la fusión inicial puede vivir y proliferar separado del otro, tan sólo sobreviven los hibridomas.

Una vez obtenido el anticuerpo, puede utilizarse para localizar una proteína en células y tejidos, para seguir sus desplazamientos y para purificar esa proteína para el estudio de su estructura y función.

Resumen

Los tejidos se pueden disociar en sus componentes celulares, a partir de los cuales pueden purificarse diferentes tipos celulares que se utilizan para análisis bioquímico o para establecer cultivos celulares. Muchos tipos de células animales y vegetales sobreviven y proliferan en una placa de cultivo si se les suministra el medio de cultivo adecuado conteniendo nutrientes y componentes moleculares apropiados. Aunque la mayoría de las células animales mueren después de un número finito de divisiones, en los cultivos surgen espontáneamente células variantes inmortales, o son generadas mediante manipulación genética, que pueden ser mantenidas de forma indefinida como líneas celulares. Las células madre embrionarias pueden proliferar indefinidamente en una placa de cultivo manteniendo las propiedades de diferenciación en los distintos tipos celulares del cuerpo. Este hecho les confiere grandes expectativas médicas. Los hibridomas se emplean a menudo para producir cantidades ilimitadas de anticuerpos monoclonales uniformes que se utilizan para detectar y purificar proteínas celulares, así como para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades.

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

El reto de aislar un único tipo de proteína, de entre los miles de ellos que están presentes en una célula, es formidable pero es necesario afrontarlo si se quiere estudiar la función de esta proteína *in vitro*. Como veremos más adelante en este capítulo, la *tecnología del DNA recombinante* simplifica enormemente el trabajo, consiguiendo que las células produzcan gran cantidad de una proteína determinada, convirtiendo así su purificación en una tarea más sencilla. Aunque la fuente de la proteína sea tanto una célula manipulada como un tejido natural, el procedimiento empieza por lo general con un subfraccionamiento celular para reducir la complejidad del material, seguido de diferentes pasos que incrementan la especificidad.

Las células pueden separarse en sus distintos componentes

Para purificar una proteína primero debe ser extraída del interior celular. Las células pueden disgregarse de varias maneras: pueden someterse a choque osmótico o a vibraciones ultrasónicas, hacerse pasar a través de un pequeño orificio o molerse. Estos procedimientos rompen muchas de las membranas de la célula (incluidas la membrana plasmática y la del retículo endoplasmático) en diversos fragmentos que se unen de inmediato y forman pequeñas vesículas cerradas. Sin embargo, si estos procedimientos de disgregación se aplican con cuidado, dejan fundamentalmente intactos diversos orgánulos como el núcleo, las mitocondrias, el complejo de Golgi, los lisosomas y los peroxisomas. Así, la suspensión de células queda reducida a una espesa sopa (denominada *homogenado* o *extracto*) que contiene una gran diversidad de partículas unidas a membrana, cada una de un tamaño, una carga y una densidad característica. Si se ha escogido bien el medio de homogeneización (mediante el sistema de ensayo y error para cada orgánulo), los diferentes compartimientos –incluyendo las vesículas derivadas del retículo endoplasmático, llamadas microsomas– conservan la mayor parte de sus propiedades bioquímicas originales.

A continuación, es necesario separar los diferentes componentes de este homogenado. Este proceso sólo es posible gracias al desarrollo comercial, a principios de la década de 1940, de un instrumento conocido con el nombre de *ultracentrifugadora preparativa*, en el que los preparados de células rotas se exponen a altas velocidades de giro (**Figura 8–9**). Este tratamiento separa los componentes celulares en función de su tamaño y de su densidad: en general, las unidades mayores experimentan mayores fuerzas centrífugas y se desplazan por el tubo con más rapidez. A una velocidad de centrifugación relativamente reducida sedimentan los componentes de tamaño mayor, como los núcleos y las células enteras, formando un precipitado en el fondo del tubo de la centrifugadora; a una velocidad algo superior se deposita un precipitado de mitocondrias, y a velocidades aún más altas y con periodos de centrifugación más prolongados, se pueden recoger primero las pequeñas vesículas cerradas y luego los ribosomas (**Figura 8–10**). Todas estas fracciones son impuras, pero se pueden

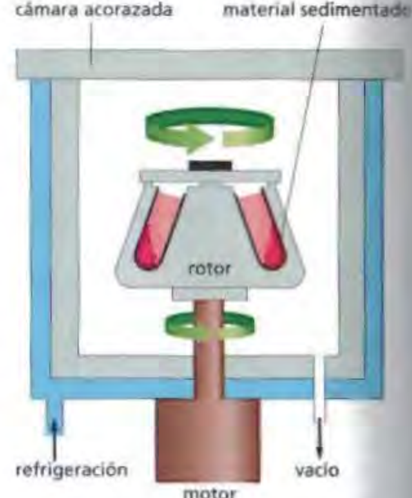


Figura 8–9 La ultracentrifugadora preparativa. La muestra se coloca en unos tubos que quedan insertados en un anillo de orificios cilíndricos de un *rotor* metálico. La rápida rotación del rotor genera unas fuerzas centrífugas enormes que provocan la sedimentación de las partículas de la muestra. El vacío disminuye el rozamiento, lo que evita el calentamiento del rotor, y el sistema de refrigeración puede mantener la muestra a 4 °C.



Figura 8–10 Fraccionamiento celular por centrifugación. Centrifugaciones repetidas a velocidades progresivamente mayores permiten fraccionar los extractos celulares en sus componentes. En general, cuanto menor sea el tamaño del componente subcelular mayor será la fuerza centrífuga necesaria para sedimentarlo. Los valores normales de las diversas etapas de centrifugación mostradas en la figura son las siguientes:

velocidad baja: 1000 veces la fuerza de la gravedad durante 10 minutos
velocidad media: 20.000 veces la fuerza de la gravedad durante 20 minutos
velocidad alta: 80.000 veces la fuerza de la gravedad durante 1 hora
velocidad muy alta: 150.000 veces la fuerza de la gravedad durante 3 horas

eliminar muchos de sus contaminantes resuspendiendo de nuevo los precipitados y repitiendo varias veces el procedimiento de centrifugación.

El método de centrifugación constituye el primer paso de la mayoría de fraccionamientos, pero sólo separa los componentes que son muy diferentes de tamaño. Se puede obtener un mayor grado de separación depositando el homogenado, en forma de banda estrecha, en la parte superior de una solución salina diluida con la que se llena el tubo de centrifugadora. Cuando se centrifuga, los diversos componentes de la mezcla se desplazan a través de la solución salina como series de bandas distintas, cada una a diferente velocidad, en un proceso denominado *sedimentación por velocidad* (**Figura 8–11**A). Para que el proceso sea efectivo, se debe impedir que las bandas se mezclen por convección, cosa que sucede habitualmente cuando una solución densa (p. ej., conteniendo orgánulos) se halla en la parte superior de otra de menor densidad (la solución salina). Esto se consigue rellenando el tubo de centrifugadora con un gradiente de sacarosa preparado con un aparato especial de mezclado. El gradiente de densidad resultante, con la zona más densa en el fondo del tubo, consigue que cada una de las regiones de la solución salina sea más densa que la solución superior, evitando así el mezclado por convección que distorsionaría la separación.

Cuando el homogenado sedimenta a través de estos gradientes de densidad, se separan los diferentes componentes celulares en distintas bandas que se pueden recoger de forma individual. La velocidad a la que sedimenta cada componente depende fundamentalmente de su tamaño y de su forma; se expresa como coeficiente de sedimentación o valor S. Las ultracentrifugadoras actuales pueden alcanzar velocidades superiores a 80.000 rpm y producir fuerzas de más de 500.000 veces la de la gravedad. A estas enormes fuerzas se pueden separar en función de su tamaño incluso macromoléculas tan pequeñas como las moléculas de tRNA y las enzimas sencillas.

La ultracentrifugadora se utiliza también para separar los componentes celulares en función de su densidad de flotación, con independencia de su tamaño y forma. En este caso, generalmente la muestra se sedimenta a través de un gradiente amplio que contiene una concentración muy elevada de sacarosa o de cloruro de cesio. Cada componente celular empieza a descender por el gradiente como en la Figura 8–11A, hasta que llega a una zona en la que la densidad de la solución es igual a su propia densidad. En este lugar del tubo, el componente flota y ya no puede desplazarse más. Por consiguiente, en el tubo de la centrifugadora se forman series de bandas distintas, siendo las bandas que contienen los componentes de mayor densidad de flotación las que se hallan más cerca del fondo del tubo de la centrifugadora (Figura 8–11B). El método, denominado *sedimentación de equilibrio*, es suficientemente sensible para separar macromoléculas que han incorporado isótopos pesados, como el ^{13}C o el ^{15}N, de las mismas macromoléculas no marcadas que contienen los isótopos habituales, más ligeros (^{12}C o ^{14}N). De hecho, el método del cloruro de cesio fue desarrollado en 1957 para separar el DNA marcado del no marcado producido después de la exposición de una población de bacterias en crecimiento a precursores de nucleótidos con ^{15}N; este experimento clásico proporcionó la prueba directa de la replicación semiconservativa del DNA (véase Figura 5–5).

Los extractos celulares proporcionan sistemas útiles para el estudio de las funciones celulares

El estudio de los orgánulos y de otros componentes subcelulares de gran tamaño obtenidos por ultracentrifugación ha constituido un avance muy importante en la determinación de las funciones de los diferentes componentes de la célula. Así, por ejemplo, diferentes experimentos con mitocondrias y cloroplastos purificados por centrifugación demostraron la fun-

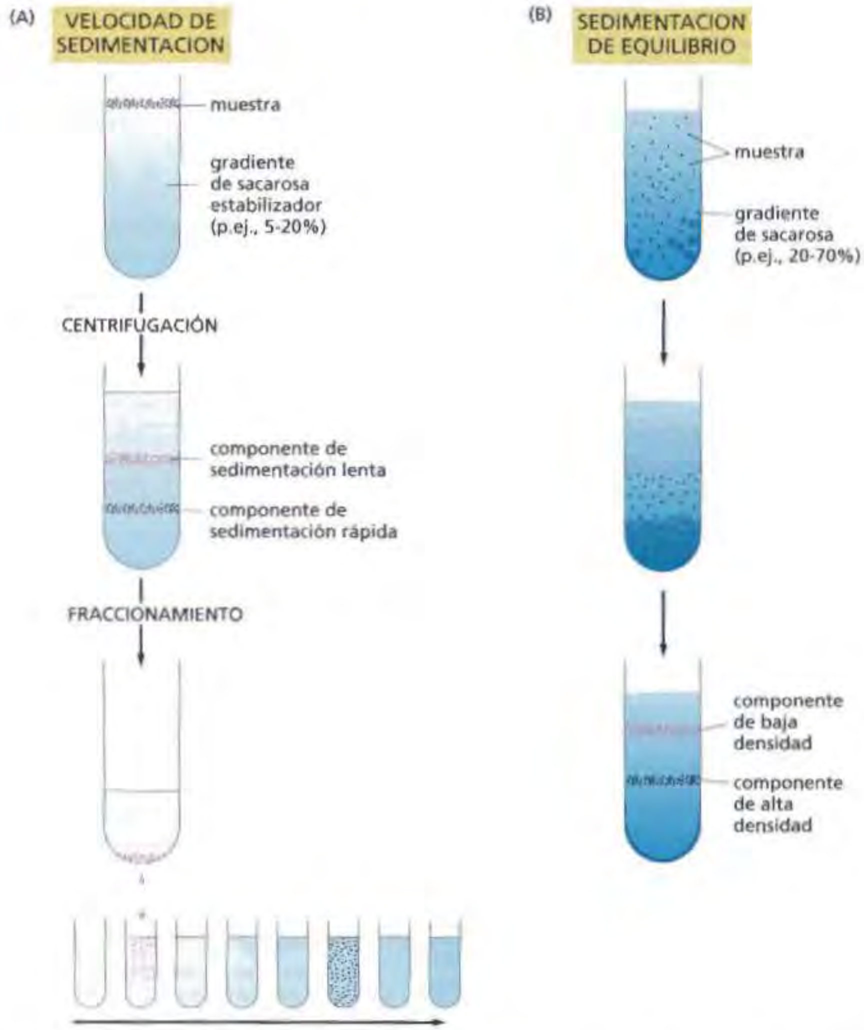


Figura 8-11 Comparación entre los métodos de sedimentación por velocidad y equilibrio. (A) En la sedimentación por velocidad, la muestra se coloca sobre una solución diluida de sacarosa y los componentes subcelulares sedimentan a diferentes velocidades de acuerdo con su forma y tamaño. Para estabilizar las bandas que sedimentan y evitar que se mezclen por fenómenos de convección originados por pequeñas diferencias de temperatura o de concentración de los solutos, el tubo contiene un gradiente continuo de sacarosa de concentración creciente hacia el fondo del tubo (normalmente desde 5% a 20% de sacarosa). Tras la centrifugación, los diferentes componentes se recogen por separado; la forma más sencilla de hacerlo consiste en perforar el tubo de la centrifugadora y recoger gota a gota el contenido, tal como ilustra la figura. (B) En la sedimentación de equilibrio, los componentes subcelulares también se centrifugan en un gradiente; en el interior del líquido, los componentes de la muestra se desplazan arriba y abajo del tubo hasta alcanzar la zona en la que la densidad de la solución es igual a su propia densidad. Aunque aquí se presenta un gradiente de sacarosa, en la separación de proteínas y de ácidos nucleicos normalmente se utilizan gradientes de densidad preparados con cloruro de cesio. Las bandas finales, en el equilibrio, se pueden recoger como en (A).

ción central de estos orgánulos en la conversión de energía a formas utilizables por la célula. Análogamente, se han separado las vesículas formadas a partir de fragmentos del retículo endoplasmático liso y del retículo endoplasmático rugoso (microsomas) y se han analizado como modelos funcionales de estos mismos compartimientos en las células intactas.

Igualmente, extractos celulares altamente concentrados, sobre todo de oocitos de *Xenopus laevis* (sapo de uñas africano) han desempeñado un papel crítico en el estudio de procesos tan complejos y altamente organizados como es el ciclo de división celular, la separación de cromosomas en el huso mitótico y los procesos de transporte vesicular involucrados en los desplazamientos de las proteínas desde el retículo endoplasmático, a través del complejo de Golgi, hasta la membrana plasmática.

Los homogenados celulares también proporcionan, en principio, el material de partida para una separación completa de los componentes macromoleculares de una célula. A continuación estudiaremos cómo se consigue esta separación, centrándonos en las proteínas.

Las proteínas pueden separarse mediante cromatografía

Las proteínas se fraccionan mediante **cromatografía en columna**, técnica en la que se hace pasar una mezcla de proteínas en solución a través de una columna que contiene una matriz sólida porosa. Las diferentes proteínas de la mezcla se retrasan más o menos a causa de su interacción con la matriz de la columna y se recogen por separado a medida que fluyen por el extremo inferior de la columna (**Figura 8-12**). En función del tipo de matriz que se utilice, las proteínas se pueden separar en función de su carga (*cromatografía de intercambio iónico*), de su hidrofobicidad (*cromatografía hidrofóbica*), de su tamaño (*cromatografía de filtración*) o de su capacidad para unirse a determinados grupos químicos (*cromatografía de afinidad*).

Actualmente se comercializan un gran número de tipos diferentes de matriz para cromatografía (**Figura 8–13**). Las columnas de intercambio iónico están llenas de pequeñas bolitas o partículas que contienen cargas positivas o negativas, de modo que las proteínas se separan en función de la disposición de cargas de su superficie. Las columnas hidrofóbicas están llenas de unas partículas con cadenas laterales hidrofóbicas que sobresalen de ellas, de modo que las proteínas que tengan regiones hidrofóbicas al descubierto quedan retardadas en su tránsito por la columna. Las columnas de filtración en gel, que separan proteínas en función de su tamaño, contienen diminutas partículas porosas: a medida que van descendiendo por la columna, las moléculas suficientemente pequeñas para penetrar en los poros se retrasan en el interior de las partículas, mientras que las moléculas más grandes permanecen en la solución fluyendo entre una partícula y otra y, por lo tanto, eluyen con más rapidez a través de la columna y salen primero. Además de permitir la separación de las moléculas, la cromatografía de filtración en gel constituye un buen sistema para determinar el tamaño de las moléculas.

La resolución de las columnas convencionales de cromatografía está limitada por la falta de homogeneidad de las matrices (como la celulosa), la cual genera un flujo desigual de los solventes a través de la columna. Se han desarrollado nuevas resinas cromatográficas (la mayoría basadas en compuestos de sílice) en forma de diminutas esferas (de 3 a 10 µm de diámetro) que pueden ser empaquetadas mediante un aparato especial formando un lecho uniforme en la columna. Con estas columnas de **cromatografía líquida de alta resolución** (**HPLC**: ***high performance liquid chromatography***) se alcanza un alto grado de separación. En la HPLC, los solutos se equilibran rápidamente con el interior de las diminutas esferas, de forma que solutos con diferentes afinidades por la matriz son separados entre sí de forma muy eficiente, siempre a rápida velocidad de flujo. Por consiguiente, el HPLC se ha convertido en el método de elección para muchas separaciones de proteínas y de pequeñas moléculas.

La cromatografía de afinidad aprovecha lugares de unión específicos de las proteínas

Si se parte de una mezcla compleja de proteínas, estos tipos de columnas de cromatografía no dan lugar a fracciones muy puras: un único paso a través de la columna suele incrementar la proporción de una determinada proteína en la mezcla no más de veinte veces. Puesto

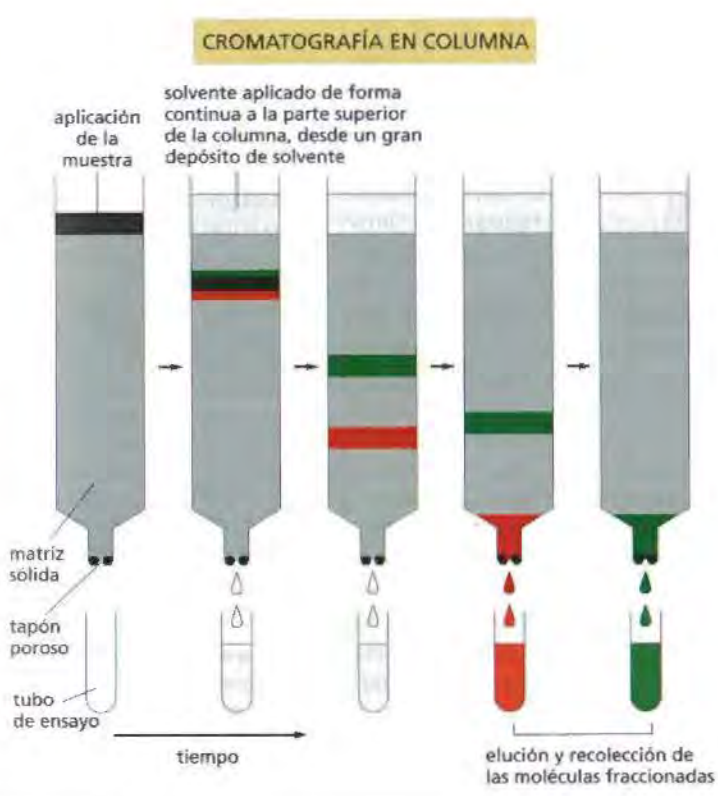


Figura 8–12 Separación de moléculas mediante cromatografía en columna. La muestra, que es una mezcla de diferentes moléculas, se coloca en la parte superior de una columna cilíndrica de vidrio o de plástico que contiene una matriz sólida permeable, por ejemplo de celulosa. A continuación se pasa lentamente una gran cantidad de solvente a través de la columna, recogiéndolo en diferentes tubos a medida que sale por la parte inferior de la columna. Puesto que los diversos componentes de la muestra se desplazan a distintas velocidades a través de la columna, al final del proceso quedan fraccionados en tubos distintos.

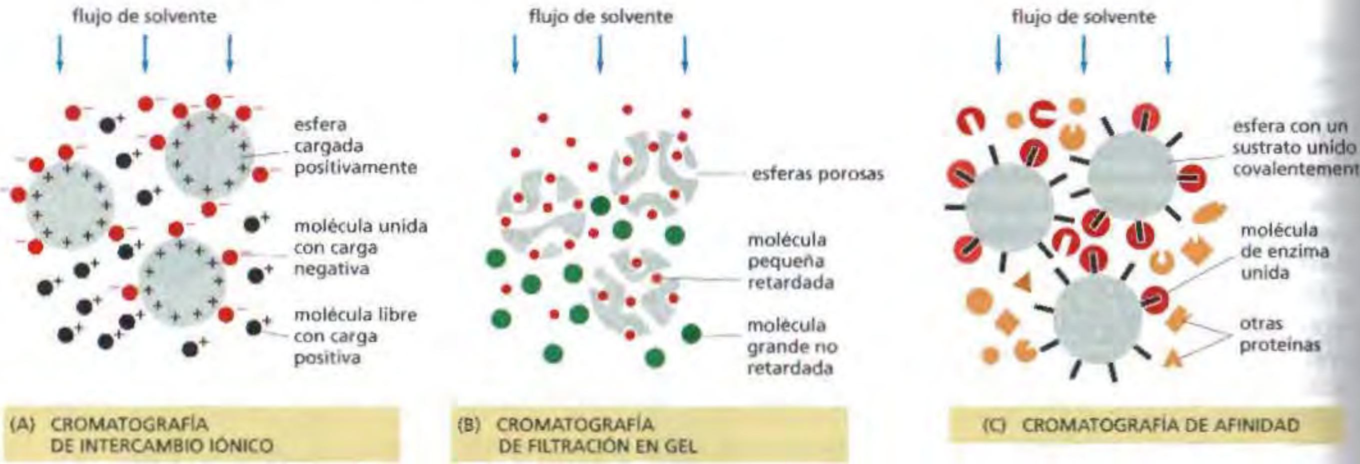


Figura 8–13 Tres tipos de matriz utilizadas en cromatografía. (A) En la cromatografía de intercambio iónico, la matriz insoluble tiene cargas iónicas que retrasan las moléculas de carga opuesta. Las matrices utilizadas habitualmente para separar proteínas son la dietilaminoetilcelulosa (DEAE-celulosa), de carga positiva, y la carboximetilcelulosa (CM-celulosa) y la fosfocelulosa, de carga negativa. Con frecuencia se utilizan también matrices análogas basadas en la agarosa o en otros polímeros. La fuerza de unión entre las moléculas disueltas y la matriz de intercambio iónico depende de la fuerza iónica y del pH de la solución eluyente que atraviesa la columna; estos parámetros pueden variarse de una manera sistemática (como en la Figura 8-14) para conseguir una separación más efectiva. (B) En la cromatografía de filtración en gel, la matriz es inerte pero porosa. Las moléculas suficientemente pequeñas para penetrar en el interior de la matriz se retrasan y viajan con más lentitud a través de la columna que las moléculas grandes que no pueden penetrar. En el mercado existen bolitas de polisacáridos con puentes cruzados (dextrano, agarosa o acrilamida) en una amplia gama de tamaños de poro, adecuados para el fraccionamiento de moléculas de diversos pesos moleculares, desde menos de 500 hasta más de 5×10^6 dalton. (C) La cromatografía de afinidad utiliza una matriz insoluble que está unida covalentemente a un ligando específico, como por ejemplo una molécula de anticuerpo o un sustrato enzimático, que se unirá a una proteína determinada de la muestra. Las moléculas de enzima que se han unido a sustratos inmovilizados en columnas de este tipo se pueden eluir con una solución concentrada del sustrato en forma libre, mientras que moléculas que se han unido a anticuerpos inmovilizados pueden eluirse disociando el complejo antígeno-anticuerpo con soluciones concentradas de sales o con soluciones de pH alto o bajo. Con un solo paso a través de estas columnas, a menudo se consiguen elevados grados de purificación.

que la mayoría de las proteínas representan individualmente menos del 1/1.000 de la proteína celular total, es necesario utilizar varios tipos de columnas consecutivamente para conseguir un grado de pureza suficiente (**Figura 8–14**). Un procedimiento más eficiente, conocido como **cromatografía de afinidad**, aprovecha las interacciones de unión, importantes desde el punto de vista biológico, que se producen en la superficie de las proteínas. Por ejemplo, si un sustrato enzimático se acopla covalentemente a una matriz inerte, como pueden ser pequeñas partículas de un polisacárido, la enzima específica de este sustrato fijado a la columna será retenida en la matriz y podrá ser eluida (lavada) en forma casi pura. De forma similar, pueden inmovilizarse pequeños oligonucleótidos de DNA de secuencia diseñada específicamente y utilizarse para purificar proteínas que se unan al DNA y que reconozcan esta secuencia de nucleótidos en los cromosomas (véase Figura 7–28). Otra opción es acoplar anticuerpos específicos a una matriz para purificar moléculas proteicas reconocidas por estos anticuerpos. Debido a la elevada especificidad de estas columnas de afinidad, algunas veces se pueden conseguir, en un solo paso, purificaciones del orden de 1000 a 10.000 veces.

Marcas diseñadas genéticamente proporcionan una manera fácil para purificar proteínas

Como se describirá en la sección siguiente, cualquier gen puede ser modificado usando los métodos de DNA recombinante para que su proteína contenga unida una marca molecular, permitiendo una posterior purificación, sencilla y rápida, de la proteína por cromatografía de afinidad. A menudo la propia marca de reconocimiento es un determinante antigénico, o *epítopo*, que puede ser reconocido por un anticuerpo muy específico. El anticuerpo, también se utiliza para localizar a la proteína en las células y para purificarla (**Figura 8–15**). Otros tipos de marcas se diseñan especialmente para la purificación proteica. El aminoácido histidina, por ejemplo, se une a determinados iones metálicos como el níquel y el cobre. Si se utilizan las técnicas de ingeniería genética para unir una pequeña cadena de residuos de histidina a alguno de los extremos de la proteína, se podrá retener esta proteína ligeramente modificada de forma selectiva usando una columna de afinidad que contenga iones de níquel inmovilizados. De este modo, la cromatografía de afinidad basada en la utilización de metales puede usarse para purificar estas proteínas modificadas a partir de una mezcla molecular compleja.

En otros casos, se utiliza como marcador molecular una proteína entera. Cuando las células están diseñadas por ingeniería para sintetizar la enzima glutatión S-transferasa (GST) enganchada a una proteína de interés, la **proteína de fusión** resultante puede purificarse en columnas de afinidad que contengan glutatión, un sustrato molecular que se une con fuerza y de forma específica a la GST (véase Figura 8–50, parte inferior). Si la purificación se realiza en condiciones que provoquen la ruptura de las interacciones proteína-proteína, la proteína de fusión puede ser aislada en asociación con las proteínas que interaccionan intracelularmente (**Figura 8–16**).

Como refinamiento aún mayor de esta técnica que utiliza marcas de reconocimiento, puede introducirse, entre la proteína de elección y la marca molecular, una secuencia de

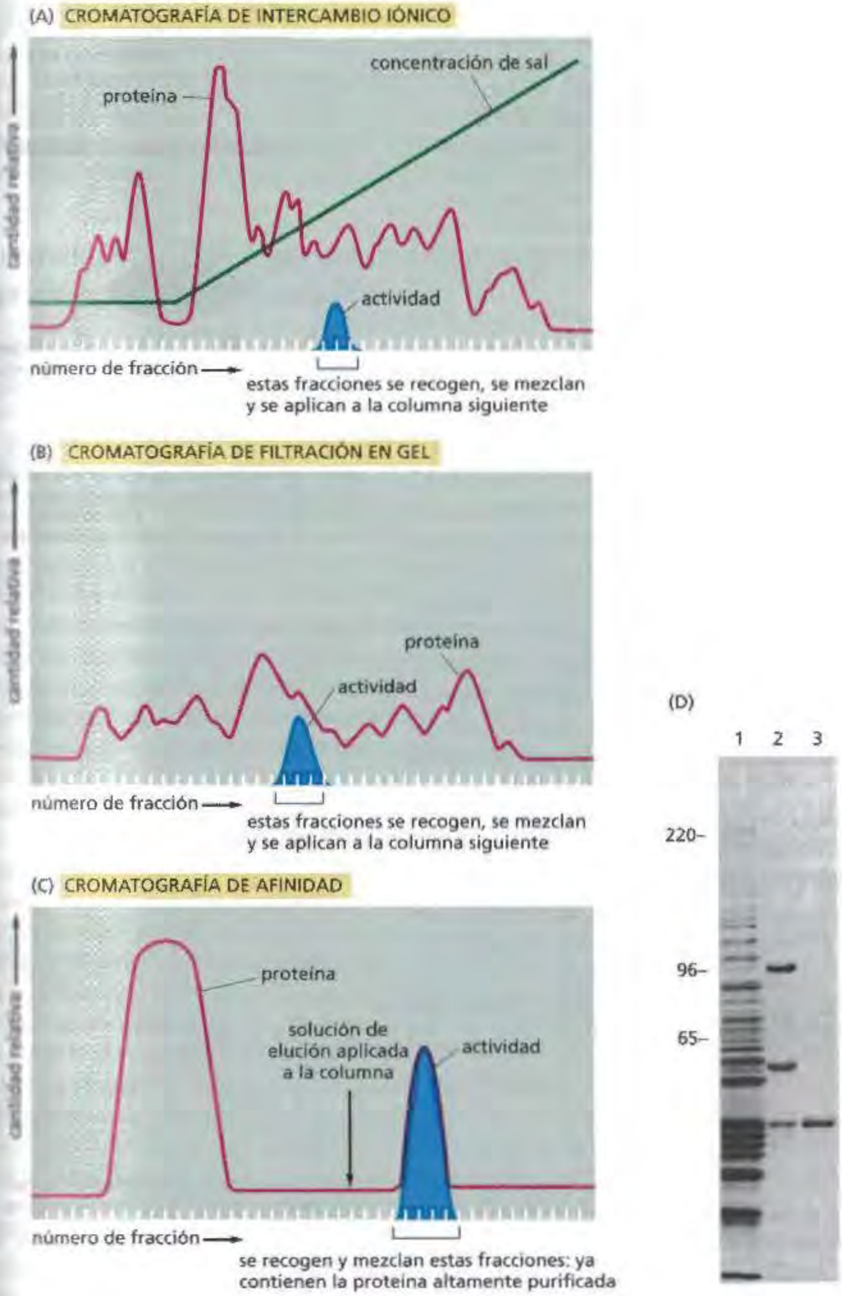


Figura 8–14 Purificación de proteínas por cromatografía. Resultados que se obtienen normalmente cuando se utilizan de forma sucesiva tres pasos cromatográficos diferentes para purificar una proteína. En este ejemplo, se fraccionó un extracto de células completo haciéndolo pasar primero a través de una resina de intercambio iónico empaquetada en una columna (A). La columna se lavó para eliminar todos los contaminantes no unidos y las proteínas se eluyeron haciendo pasar desde la parte superior de la columna una solución de sal a una concentración cada vez mayor. Las proteínas con menor afinidad por la resina de intercambio iónico pasaron directamente a través de la columna y fueron recogidas en las primeras fracciones eluidas que salieron por la parte inferior de la columna. Las restantes proteínas fueron eluidas de manera secuencial de acuerdo con su afinidad por la resina –las unidas más intensamente necesitaron una concentración de sal más elevada para ser eluidas. La proteína de interés se eluyó en varias fracciones y fue detectada ensayando su actividad enzimática. Se recogieron las fracciones con actividad y se pasaron a una segunda columna de filtración en gel (B). La posición de elución de la proteína todavía impura fue determinada de nuevo por su actividad enzimática; las fracciones activas fueron recogidas y purificadas hasta su homogeneidad mediante una columna de afinidad (C) que contenía inmovilizado un sustrato de la enzima. (D) Purificación mediante afinidad de proteínas de unión a ciclinas en *S. cerevisiae*; análisis del proceso mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (para su descripción véase Figura 8-18). El carril 1 corresponde al extracto celular total; el carril 2 muestra las proteínas eluidas de una matriz de afinidad que contenía ciclina B2; el carril 3 muestra una banda mayoritaria obtenida tras eluir una columna de afinidad que contenía ciclina B3. Las proteínas de los carriles 2 y 3 fueron eluidas de las columnas de afinidad con sal. El gel está teñido con azul Coomassie. La escala de la izquierda muestra los pesos moleculares de los marcadores de proteínas en kilodalton. (D, de D. Kellogg et al., *J. Cell Biol.* 130:675-685, 1995. Con la autorización de The Rockefeller University Press.)

aminoácidos que contenga una diana para una proteasa muy específica. Debido a que las secuencias de aminoácidos en la diana raras veces se encuentran en las proteínas, la marca puede ser eliminada posteriormente de forma específica por rotura de la diana sin destruir la proteína purificada.

Esta ruptura específica se utiliza sobre todo en una metodología muy poderosa de purificación conocida como *purificación por afinidad en tándem al etiquetado* (*tap-tagging*: ***t**andem **a**ffinity **p**urification **tagging***). Se diseña un extremo de la proteína para que contenga dos marcas de reconocimiento separadas por una diana para proteasas. La marca al final de la construcción se selecciona para que se una de forma irreversible a una columna de afinidad, permitiendo que la columna se pueda lavar extensamente para eliminar todas las proteínas contaminantes. El proceso de proteolisis libera la proteína que a continuación es purificada mediante su segunda etiqueta. Dado que este proceso en dos pasos de alto grado de purificación proteica no requiere mucho esfuerzo, se utiliza con frecuencia en biología celular. A modo de ejemplo, se ha construido un juego de 6000 cepas de levaduras, cada una de ellas con un gen unido a un DNA que codifica una marca de tap-tagging, para permitir que cualquier proteína de levadura sea purificada muy rápidamente.



Figura 8–15 El marcaje con epítopos permite la localización y purificación de proteínas. Utilizando técnicas estándar de ingeniería genética es posible añadir una marca en forma de epítopo a una determinada proteína de interés. Si la marca es por sí misma un tipo de determinante antigénico, o *epítopo*, puede ser diana de algún anticuerpo comercial. El anticuerpo, marcado convenientemente, puede ser utilizado tanto para seguir la localización celular de la proteína, como para purificarla por inmunoprecipitación o por cromatografía de afinidad. En la inmunoprecipitación, los anticuerpos dirigidos contra la marca se añaden a la solución que contiene la proteína etiquetada con la marca; los anticuerpos se unen de forma específica a las moléculas proteicas marcadas y las precipitan formando complejos entre la proteína y el anticuerpo

Se requieren sistemas libres de células para estudiar de forma precisa las funciones moleculares

Para el estudio de los procesos biológicos libres de todas las complejas reacciones que los envuelven en la célula, es importante utilizar **sistemas libres de células**. Para que esto sea posible, el fraccionamiento de los homogenados celulares tiene como objetivo purificar cada una de las macromoléculas necesarias para catalizar un proceso biológico de interés. Uno de los primeros éxitos de este sistema de estudio fue la deducción del mecanismo de síntesis proteica. El punto de partida lo constituyó un extracto celular crudo, capaz de traducir las moléculas de RNA a proteína. El fraccionamiento de este extracto dio lugar a ribosomas, tRNA y varias enzimas que, en conjunto, constituyen la maquinaria de la síntesis proteica. Una vez se dispuso de los componentes individuales purificados, fue posible añadirlos o extraerlos uno a uno del medio de incubación, consiguiéndose así definir el papel exacto de cada uno de ellos.

Actualmente, uno de los principales objetivos es reconstruir en sistemas libres de células cada proceso biológico, para así poder definir todos sus componentes y sus mecanismos de acción. Gran cantidad de la información de que disponemos acerca de la biología molecular de la célula, se ha obtenido estudiando sistemas libres de células. Como ejemplos se pueden citar, de entre los muchos posibles, que estudios de este tipo se han utilizado para analizar los detalles moleculares de la replicación y la transcripción del DNA, de la maduración por corte y empalme (ayuste) del RNA, de la traducción proteica, de la contracción muscular y del desplazamiento de partículas a lo largo de los microtúbulos.

Resumen

Las poblaciones celulares pueden analizarse bioquímicamente mediante su rotura y el fraccionamiento de sus componentes permitiendo el desarrollo de sistemas libres de células. Los sistemas libres de células altamente purificados son necesarios para determinar los detalles moleculares de procesos celulares complejos y requieren una purificación extensiva de todas las proteínas y de los otros componentes que intervienen. Las proteínas solubles de los extractos celulares se purifican por cromatografía en columna; dependiendo del tipo de matriz de la columna, las proteínas activas desde un punto de vista biológico se separan en función del peso molecular, la hidrofobicidad, las características de carga o la afinidad por otras moléculas. En una purificación normal, la muestra pasa secuencialmente por diferentes columnas y las fracciones enriquecidas de una columna se aplican a la siguiente. La tecnología del DNA recombinante, que será descrita más adelante, permite un reconocimiento de marcas especiales acopladas a las proteínas que simplifican en gran medida su purificación.

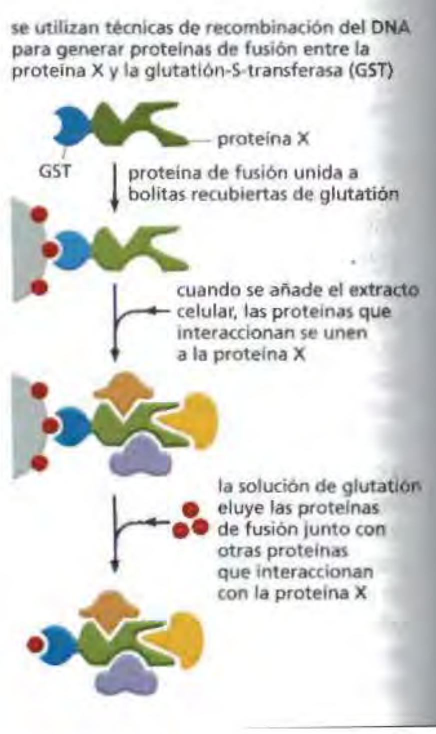


Figura 8–16 Purificación de complejos proteicos utilizando proteínas de fusión marcadas con GST. Las proteínas de fusión marcadas con GST, que se producen en las células por técnicas de recombinación de DNA, se pueden capturar en columnas de afinidad que contengan partículas recubiertas con glutatión. Las proteínas que no se unen a las partículas son eliminadas. La proteína de fusión, junto con las otras proteínas de la célula, se une fuertemente a la columna y se pueden eluir con glutatión. La identidad de estas proteínas adicionales se determina por espectrometría de masas (véase Figura 8-21). También se pueden hacer columnas de afinidad con anticuerpos contra GST u otra pequeña proteína o epítopo marcado de interés (véase Figura 8-15).

ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS

Las proteínas realizan la mayoría de los procesos celulares: catalizan reacciones metabólicas, utilizan la hidrólisis de nucleótidos para realizar el trabajo mecánico y constituyen los mayores elementos estructurales a la célula. La gran variedad de estructuras proteicas y sus funciones ha estimulado el desarrollo de una multitud de técnicas para su estudio.

Las proteínas pueden separarse mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

Las proteínas suelen tener una carga neta positiva o negativa como resultado de los aminoácidos cargados que contienen. Si se aplica un campo eléctrico a una solución que contenga una molécula proteica, la proteína migrará a una velocidad que dependerá de su carga neta, de su tamaño y de su forma. La aplicación más común de esta propiedad es la **electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS** (**SDS-PAGE**: ***SDS polyacrylamide-gel electrophoresis***). Como matriz inerte a través de la cual migran las proteínas, se utiliza un gel de poliacrilamida con numerosos puentes cruzados. El gel se prepara inmediatamente antes de utilizarse mediante la polimerización a partir de los monómeros; el tamaño del poro del gel puede ajustarse de forma que sea el adecuado para retrasar la migración de las moléculas proteicas de interés. Las proteínas no se colocan en una solución acuosa sencilla sino en una solución que contiene un potente detergente cargado negativamente, el dodecil sulfato sódico o SDS (*sodium **dodecyl dulfate***) (**Figura 8–17**). Puesto que este detergente se une a las regiones hidrofóbicas de las moléculas proteicas haciendo que las cadenas polipeptídicas se desplieguen, las diferentes moléculas proteicas quedan liberadas de sus asociaciones con otras moléculas proteicas o lipídicas y se disuelven libremente en la solución del detergente. Además, se suele añadir un agente reductor como el β-mercaptoetanol (véase Figura 8–17) con objeto de romper los enlaces S–S que pudieran existir en las proteínas, de forma que puedan analizarse separadamente todos los polipéptidos constitutivos de las moléculas con varias subunidades.

¿Qué sucede cuando una mezcla de proteínas solubilizadas con SDS se somete a electroforesis a través de una lámina de gel de poliacrilamida? Cada molécula de proteína se une a una gran cantidad de moléculas del detergente cargadas negativamente, que enmascaran la carga intrínseca de la proteína y hacen que cuando se aplica un voltaje la proteína migre hacia el electrodo positivo. Las proteínas del mismo tamaño tienden a comportarse de forma idéntica ya que (1) su estructura nativa está completamente desplegada por el SDS, por lo que presentan la misma forma, y (2) se unen a la misma cantidad de SDS y, por tanto, tienen la misma cantidad de carga negativa. Las proteínas grandes, con mayor carga, están sujetas a grandes fuerzas eléctricas pero también a mayores resistencias. En solución libre, ambos efectos podrían contrarrestarse, pero en las redes del gel de poliacrilamida, que actúa como un filtro molecular, las proteínas grandes son mucho más retardadas que las pequeñas. En consecuencia, una mezcla compleja de proteínas se fracciona en series de bandas proteicas discretas, ordenadas en función de su peso molecular (**Figura 8–18**). Las proteínas mayoritarias se detectan con facilidad tiñendo el gel con un colorante como el azul de Coomassie. Incluso las proteínas minoritarias se pueden visualizar en los geles tratados con tinciones de oro o plata y se pueden detectar en cada banda cantidades tan pequeñas como 10 ng de proteína.

La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS es un procedimiento muy utilizado, ya que puede separar todos los tipos de proteínas, incluyendo las que normalmente son insolubles en agua, tales como muchas proteínas de membrana. Debido a que el método separa los polipéptidos en función de su tamaño, también proporciona información sobre el peso molecular y la composición de subunidades de cualquier complejo proteico. En la **Figura 8–19** se presenta una fotografía de un gel utilizado para analizar cada una de las sucesivas etapas de la purificación de una proteína.

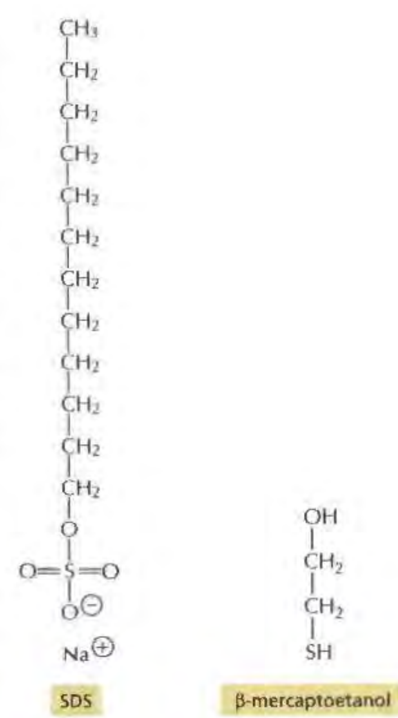


Figura 8–17 El detergente dodecil sulfato sódico (SDS) y el agente reductor β-mercaptoetanol. Estos dos reactivos químicos se utilizan para solubilizar proteínas para electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. El SDS se representa en su forma ionizada.

La hibridación con anticuerpos permite detectar proteínas de forma específica

Después de su resolución en geles de poliacrilamida, se puede identificar una determinada proteína exponiendo todas las proteínas presentes a un anticuerpo específico, que ha sido

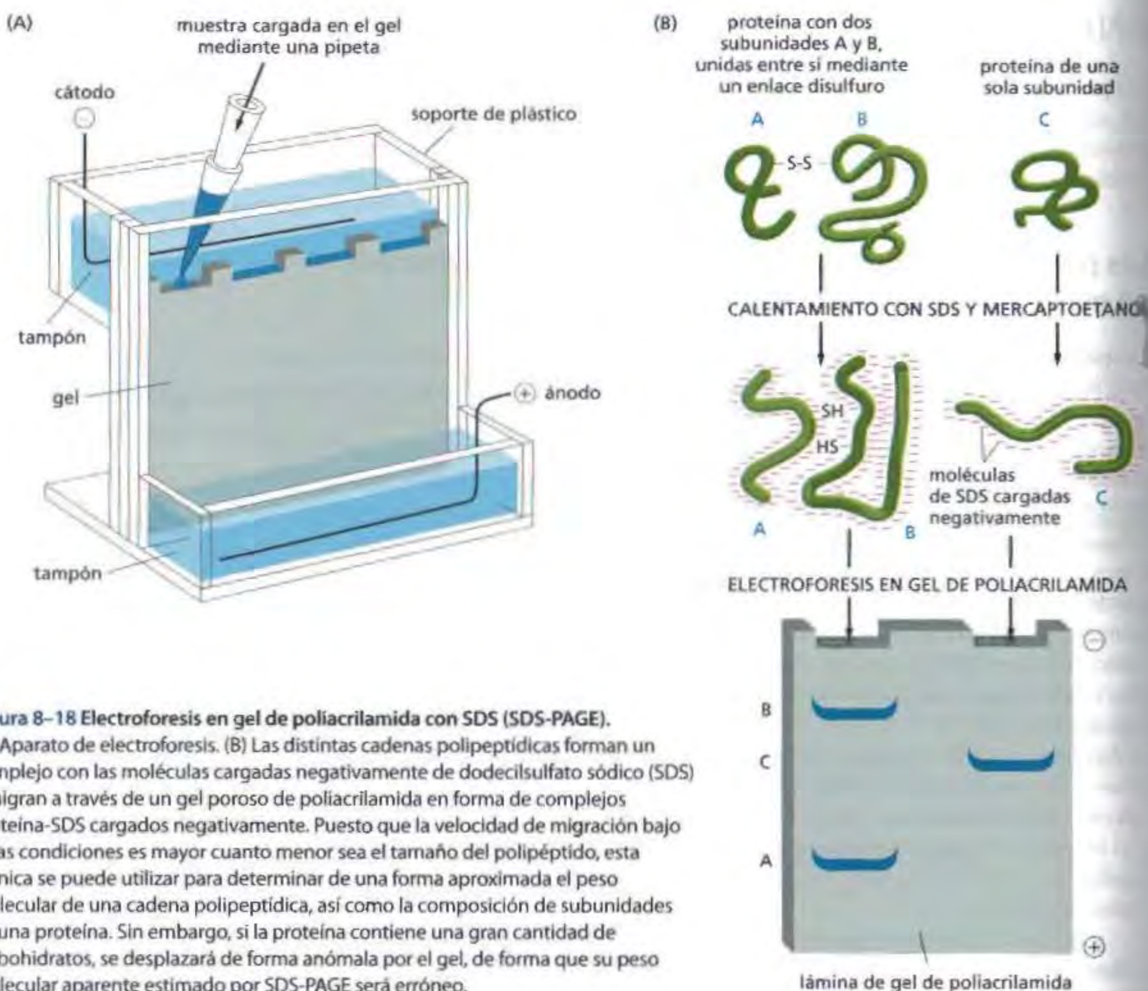


Figura 8–18 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). (A) Aparato de electroforesis. (B) Las distintas cadenas polipeptídicas forman un complejo con las moléculas cargadas negativamente de dodecilsulfato sódico (SDS) y migran a través de un gel poroso de poliacrilamida en forma de complejos proteína-SDS cargados negativamente. Puesto que la velocidad de migración bajo estas condiciones es mayor cuanto menor sea el tamaño del polipéptido, esta técnica se puede utilizar para determinar de una forma aproximada el peso molecular de una cadena polipeptídica, así como la composición de subunidades de una proteína. Sin embargo, si la proteína contiene una gran cantidad de carbohidratos, se desplazará de forma anómala por el gel, de forma que su peso molecular aparente estimado por SDS-PAGE será erróneo.

acoplado a un isótopo radiactivo, a una enzima fácilmente detectable o a un colorante fluorescente. Por lo general, este proceso se realiza después de que todas las proteínas presentes en el gel se han transferido (mediante "blotting") a una lámina de papel de nitrocelulosa o a una membrana de nailon. Situando la membrana sobre el gel, bajo la fuerza de un campo eléctrico, las proteínas son arrastradas fuera del gel y transferidas a la membrana. La membrana es incubada en una solución de anticuerpo marcado para revelar la proteína de interés. Este método de detección de proteínas se denomina **transferencia de tipo Western** (*Western blotting*) o **análisis inmunológico** (*immunoblotting*) (**Figura 8–20**).

La espectrometría de masas es un método muy sensible para la identificación de proteínas no identificadas

Un problema muy frecuente en biología celular y en bioquímica es la identificación de una o varias proteínas que se pueden obtener por los procedimientos de purificación antes men-



Figura 8–19 Análisis de muestras proteicas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. La fotografía muestra un gel teñido con azul Coomassie que se utiliza para detectar las proteínas presentes en los sucesivos estadios de purificación de una enzima. El carril izquierdo (carril 1) contiene la compleja mezcla de proteínas del extracto celular de partida; en cada uno de los carriles sucesivos se analizan las proteínas obtenidas después de un fraccionamiento cromatográfico de dicha muestra (véase Figura 8-14). En cada carril se cargó la misma cantidad de proteína (10 μg). Normalmente, cada proteína aparece como una fina banda teñida; sin embargo, las bandas se ensanchan cuando contienen demasiada proteína. (T. Formosa y B.M. Alberts, *J. Biol. Chem.* 261:6107-6118, 1986.)



(B)

Figura 8–20 Transferencia de tipo Western (*Western blotting*). Las proteínas de un cultivo de células en división de la planta del tabaco fueron separadas mediante electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (descrito en la Figura 8-23). En (A), sus posiciones se revelaron con un método muy sensible de tinción de proteínas. En (B), las proteínas separadas en un gel idéntico se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se las expuso a un anticuerpo que solamente reconoce las proteínas fosforiladas en residuos de treonina durante la mitosis. Las posiciones de la docena aproximada de proteínas reconocidas por este anticuerpo fueron reveladas mediante un anticuerpo secundario unido a una enzima. Esta técnica se conoce también con el nombre de análisis inmunológico. (De J.A. Traas et al., *Plant J.* 2:723-732, 1992. Con la autorización de Blackwell Publishing.)

revelados (véase p. ej. Figura 8–16). Dado que se conocen las secuencias genómicas de los organismos de experimentación más comunes, se puede acceder a los catálogos de proteínas producidas por ellos. La tarea de identificar proteínas desconocidas (o colecciones de proteínas desconocidas) se reduce a la comparación de las secuencias de aminoácidos presentes en una muestra con un catálogo de genes conocido. En la actualidad, este trabajo se realiza casi exclusivamente por espectrometría de masas en conjunción con búsquedas informáticas de los bancos de datos.

Las partículas cargadas presentan una dinámica muy precisa cuando se ven sujetas a campos magnéticos y eléctricos en el vacío. La espectrometría de masas aprovecha este principio para separar iones en base a la relación entre su masa y su carga. La espectrometría de masas es una técnica enormemente sensible que requiere muy poco material y es capaz de determinar la masa precisa de proteínas intactas y de sus péptidos derivados mediante degradación enzimática o química. Las masas se pueden obtener con gran exactitud, a menudo con un error menor a una parte por millón. El método de espectrometría de masas que se utiliza con mayor frecuencia se denomina MALDI-TOF (***matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight***). En este método, las proteínas de una muestra son en primer lugar degradadas en péptidos cortos. Estos péptidos se mezclan con un ácido orgánico y se secan sobre una lámina de metal o cerámica. A continuación, la muestra es volatilizada con un láser, con lo que los péptidos se desprenden de la lámina en forma de gas ionizado en el que una o más moléculas presentan una o más cargas positivas. Los péptidos ionizados son acelerados en un campo eléctrico y vuelan hacia un detector. El tiempo que tardan en llegar al detector depende de su masa y de su carga: los péptidos mayores se desplazan más despacio y las moléculas con mayor carga lo hacen más rápidamente. La masa exacta se determina con facilidad mediante el análisis de los péptidos que tiene una sola carga. La técnica de MALDI-TOF puede incluso utilizarse para medir la masa de proteínas intactas tan grandes como 200.000 dalton. Esta información se utiliza para buscar en las bases de datos genómicos, en los que las masas de todas las proteínas y de sus posibles fragmentos peptídicos han sido tabulados a partir de la secuencia genómica del organismo (Figura 8–21A). A menudo se puede hacer una identificación positiva exacta con una determinada pauta de lectura conociendo la masa de unos cuantos péptidos derivados de una proteína concreta.

La técnica del MALDI-TOF sirve para obtener mediciones precisas del peso molecular de proteínas y péptidos. Empleando dos espectrómetros en tándem (una aproximación conocida como MS/MS) es posible determinar de forma directa las secuencias de aminoácidos de péptidos individuales de una mezcla compleja. Primero, tal como se ha descrito, la proteína se digiere en pequeños fragmentos que son separados por espectrometría de masas. Después, cada péptido es fragmentado de nuevo mediante colisión con átomos de un gas con alta energía. Este método de fragmentación rompe preferentemente los enlaces peptídicos, generando un conjunto de fragmentos, cada uno de los cuales es diferente en un solo

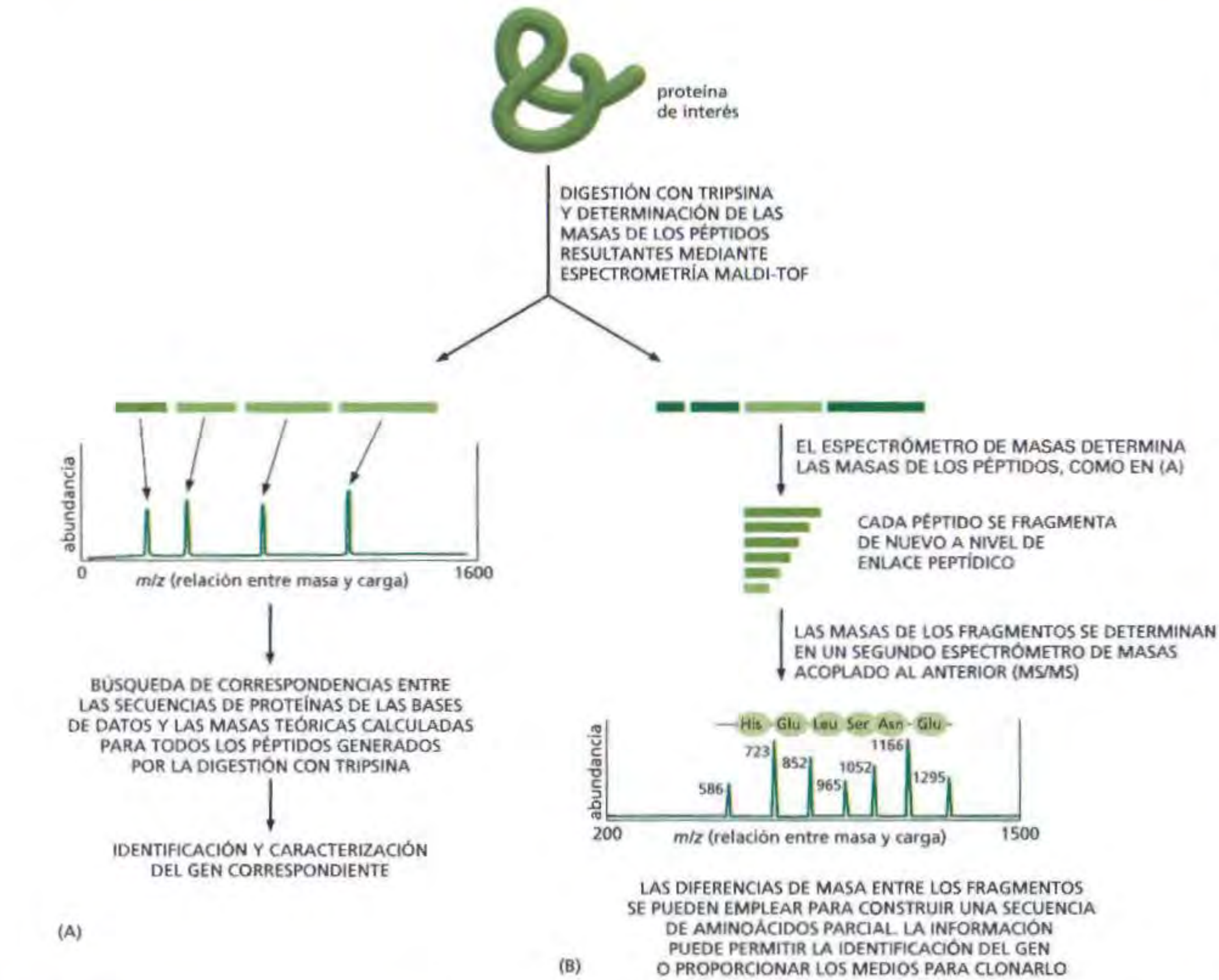


Figura 8–21 Aproximaciones de la espectrometría de masas a la identificación de proteínas y secuenciación de péptidos. Una proteína que ha sido purificada se digiere con tripsina y los fragmentos peptídicos se analizan por un espectrómetro de masas. Se pueden utilizar dos metodologías diferentes para identificar la proteína. (A) En el primer método, la masa de los péptidos se determina de una forma precisa mediante espectrometría de masas del tipo MALDI-TOF. A continuación se hace una búsqueda en las bases genómicas de datos, tratando de encontrar un gen que codifique una proteína cuyo patrón de digestión tríptica coincida con los valores obtenidos en el paso anterior. (B) La espectrometría de masas se utiliza también para determinar de forma directa la secuencia de aminoácidos de un determinado fragmento peptídico. En este ejemplo, en primer lugar los péptidos digeridos con tripsina son separados en base a su masa por espectrometría de masas. A continuación, y para determinar su secuencia exacta de aminoácidos, cada péptido se fragmenta aún más mediante la rotura de sus enlaces peptídicos. Este tratamiento genera un conjunto anidado de péptidos, con tamaños que difieren en un solo aminoácido. La masa de estos fragmentos se determina en un segundo espectrómetro de masas acoplado al anterior. La diferencia de masa entre dos péptidos de tamaño similar puede utilizarse para deducir cuál es el aminoácido que "falta". Mediante aplicaciones repetidas de este proceso se puede obtener una secuencia de aminoácidos parcial de la proteína original. Para simplificar, el análisis que se muestra empieza con una única muestra de proteína purificada. En realidad, la espectrometría de masas se realiza con mezclas de proteínas, tales como las que se obtienen de los experimentos de cromatografía de afinidad (véase Figura 8-16) y se pueden identificar todas las proteínas presentes en la mezcla. Como se explica en el texto, la espectrometría de masas también puede detectar modificaciones postraduccionales de las proteínas.

aminoácido. El segundo espectrómetro de masas separa estos fragmentos y muestra sus masas. Las diferencias de masa entre péptidos permiten deducir la secuencia de aminoácidos (Figura 8–21B).

La técnica MS/MS es particularmente útil para la detección y determinación precisa del mapa de las modificaciones postraduccionales de las proteínas, tales como las fosforilaciones o acetilaciones. Debido a que estas modificaciones comportan un incremento característico de la masa, son fácilmente detectables por espectrometría de masas. Como se ha descrito en el Capítulo 3, la proteómica, un término general que aglutina diferentes tecnologías, es la caracterización de todas las proteínas de una célula, incluyendo todas las interacciones proteína-proteína y todas las modificaciones postraduccionales. La espectrometría de masas, en combinación con las técnicas de purificación rápida que se han mencionado

en esta última sección, se ha erigido como el método más potente para determinar el mapa exacto de las modificaciones postraduccionales de una proteína concreta, como el de las proteínas que se mantienen asociadas a ella durante su purificación.

Los métodos de separación bidimensionales son especialmente potentes

Dado que en un cromatograma diferentes proteínas pueden tener tamaños, formas, masas y cargas totales parecidas, muchas técnicas de separación como la electroforesis con SDS sobre gel de poliacrilamida o la cromatografía de intercambio iónico no pueden resolver todas las proteínas de una célula o incluso de un orgánulo. Por el contrario, la **electroforesis bidimensional en gel**, que combina dos procedimientos diferentes de separación, se puede utilizar para resolver más de 2000 proteínas –el número total de proteínas diferentes que tiene una bacteria– en forma de un mapa proteico bidimensional.

En el primer paso, las proteínas se separan en función de su carga. La muestra se disuelve en un volumen reducido de una solución que contenga un detergente no iónico (no cargado), además de β-mercaptoetanol y un reactivo desnaturalizante como la urea. Esta solución disuelve, desnaturaliza y disocia todas las cadenas polipeptídicas sin alterar su carga intrínseca. Luego, las cadenas polipeptídicas se fraccionan mediante un procedimiento denominado *enfoque isoeléctrico* o *isoelectroenfoque*, que se basa en el hecho de que la carga neta de una molécula proteica varía con un gradiente de pH en la solución. Para cada proteína existe un pH característico, denominado punto isoeléctrico, en el que la proteína no presenta carga neta y, por lo tanto, no migrará en un campo eléctrico. En el isoelectroenfoque, las proteínas son sometidas a electroforesis en un tubo estrecho de gel de poliacrilamida donde se ha establecido un gradiente de pH mediante unas mezclas de soluciones amortiguadoras especiales. Cada proteína se desplaza hasta la zona de gradiente que presenta un pH igual a su punto isoeléctrico y permanece inmóvil (**Figura 8–22**). Ésta es la primera dimensión de la electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida.

En el segundo paso, el estrecho gel que contiene las proteínas separadas se somete otra vez a electroforesis, pero en una dirección perpendicular a la utilizada en el primer paso. En esta ocasión, se añade SDS y las proteínas se separan en función de su tamaño, como en el caso de electroforesis en SDS-PAGE de una dimensión: el estrecho gel original se empapa en SDS y se sitúa en un borde de una lámina de gel de poliacrilamida-SDS, a través del cual cada cadena polipeptídica migra formando una mancha discreta. Ésta es la segunda dimensión de la electroforesis bidimensional sobre gel de poliacrilamida. Las únicas proteínas que no se resolverán serán las que tengan un tamaño y un punto isoeléctrico idénticos, lo cual es bastante poco frecuente. Por este sistema pueden detectarse sobre el gel incluso cantidades traza de cada una de las cadenas polipeptídicas, mediante diversos procedimientos de tinción –o por medio de autorradiografía si la muestra estaba marcada inicialmente con un radioisótopo (**Figura 8–23**). Este sistema tiene un poder de resolución tan elevado que permite diferenciar fácilmente dos proteínas idénticas entre sí que difieran en un solo aminoácido cargado.

En la actualidad incluso existe una técnica "bidimensional" mucho más potente, cuyo objetivo es la identificación de todas las proteínas existentes en un orgánulo o en una mezcla compleja de proteínas. Puesto que la técnica se basa en la espectrometría de masas, re-

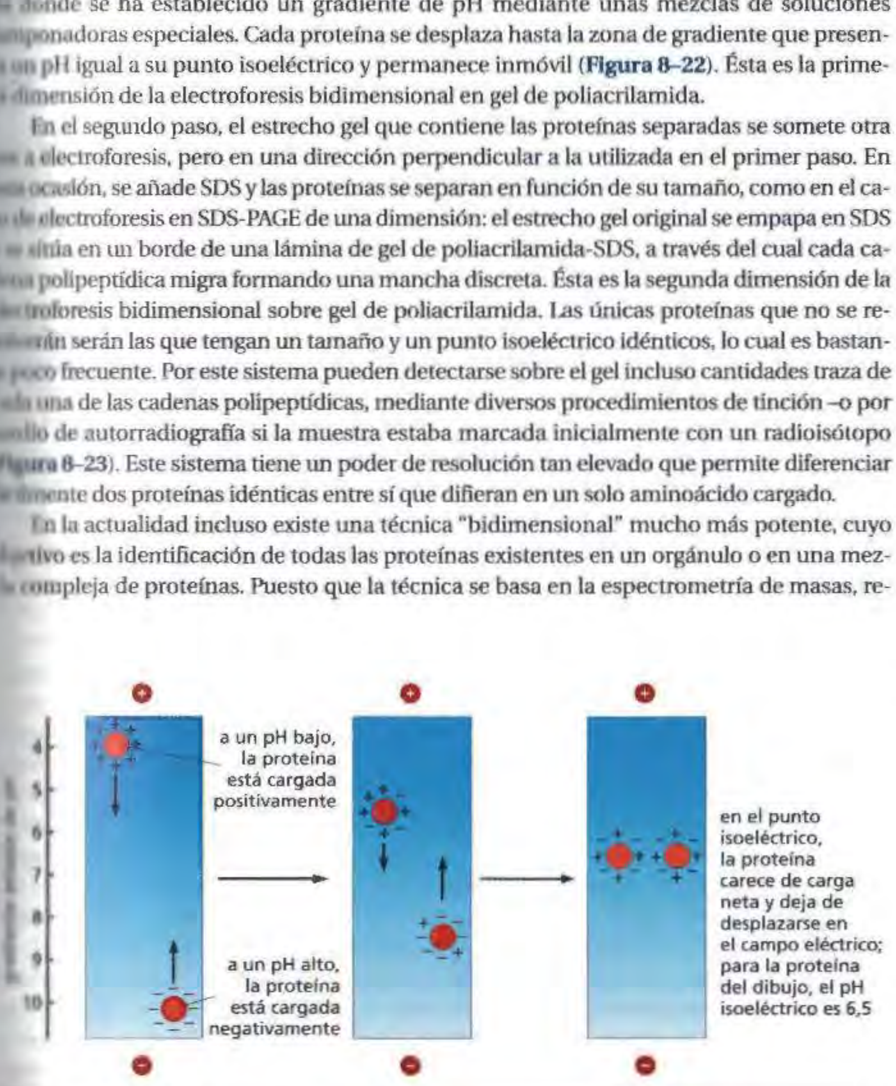


Figura 8–22 Separación de moléculas proteicas por isoelectroenfoque. A pH bajo (elevada concentración de H^+), los grupos ácidos carboxilo de las proteínas tienen tendencia a quedar sin carga (–COOH) y sus grupos nitrogenados básicos a quedar cargados (p. ej., $-NH_3^+$), confiriendo a la mayoría de las proteínas una carga neta positiva. A un pH elevado, los grupos ácidos carboxilo están cargados negativamente ($-COO^-$) y los grupos básicos tienden a estar sin carga (p. ej., $-NH_2$), confiriendo a la mayoría de las proteínas una carga neta negativa. A su *pH isoeléctrico*, una proteína carece de carga neta debido a que las cargas positivas y negativas se equilibran. Así, cuando se somete un tubo que contiene un gradiente de pH fijo a un campo eléctrico intenso aplicado en el sentido apropiado, cada proteína presente migra hasta formar una banda bien delimitada en su correspondiente pH isoeléctrico, tal como se muestra en la ilustración.

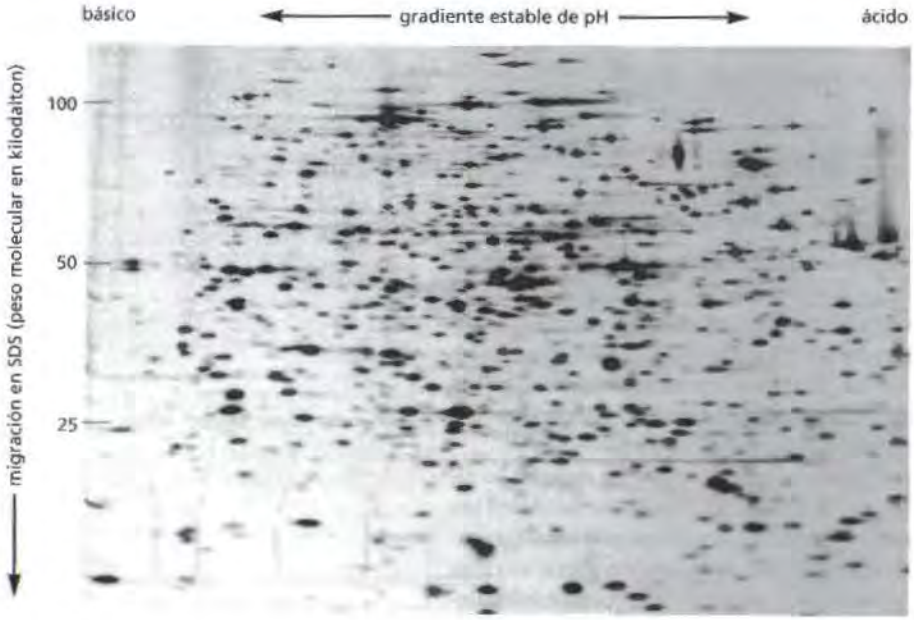


Figura 8–23 Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida. En este gel, se separaron todas las proteínas de una célula bacteriana de *E. coli*; cada mancha corresponde a una cadena polipeptídica diferente. En primer lugar, las proteínas fueron separadas de acuerdo con sus puntos isoeléctricos mediante isoelectroenfoque de izquierda a derecha. A continuación fueron nuevamente fraccionadas según sus pesos moleculares mediante electroforesis de arriba a abajo en presencia de SDS. Obsérvese que las distintas proteínas están presentes en cantidades muy diferentes. La bacteria fue alimentada con una mezcla de aminoácidos marcados con radioisótopos, de manera que todas sus proteínas resultaron radiactivas y pudieron ser fácilmente detectadas mediante autorradiografía (véase pp. 602-603). (Por cortesía de Patrick O'Farrell.)

quiere que las proteínas sean de un organismo que tenga el genoma secuenciado en su totalidad. En primer lugar, la mezcla de proteínas se digiere con tripsina para producir péptidos pequeños. Posteriormente, estos péptidos se separan por sucesivos pasos de cromatografía líquida automatizada. A continuación, y como segunda dimensión, cada péptido individual se introduce en un espectrómetro de masas en tándem (MS/MS) que permite la secuenciación de sus aminoácidos, así como determinar cualquier modificación postraduccional. Esta aproximación, en la que la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) se acopla a un sistema de cromatografía líquida automatizada (LC), se denomina LC-MS/MS. Actualmente, es un proceso rutinario someter una preparación entera de un orgánulo a un análisis por LC-MS/MS e identificar cientos de proteínas y sus modificaciones. Por supuesto, ninguna preparación de un orgánulo es perfecta y algunas de las proteínas identificadas son contaminantes. A menudo estas proteínas contaminantes se eliminan mediante el análisis de fracciones vecinas del orgánulo purificado y sustrayéndolas del pico de las fracciones del propio orgánulo.

Las medidas hidrodinámicas revelan el tamaño y la forma de un complejo proteico

La mayoría de proteínas celulares pertenecen a grandes complejos proteicos y el conocimiento del tamaño y de la forma de los complejos por lo general permite interpretar su función. Esta información se puede obtener de diferentes maneras. A veces, un complejo puede ser visualizado mediante microscopía electrónica, tal como se describe en el Capítulo 9. De manera complementaria se pueden estudiar las propiedades hidrodinámicas de un complejo, esto es, su comportamiento en un medio líquido. Normalmente, se realizan dos tipos de medidas. Una medida estudia la velocidad del complejo en desplazamiento bajo la influencia de un campo centrífugo producido por una ultracentrifugadora (Figura 8–11A). La constante de sedimentación (o valor S) obtenida dependerá tanto del tamaño como de la forma del complejo y no proporciona ninguna información especial en sí misma. Sin embargo, cuando se realiza la segunda medición hidrodinámica, estudiando la migración del complejo a través de una columna de filtración en gel (Figura 8–13B), se puede calcular tanto la forma del complejo como su peso molecular.

El peso molecular también puede ser calculado de forma directa mediante una ultracentrifugadora analítica. Estos aparatos permiten medir la absorbancia de una muestra que se ve sometida a fuerzas centrífugas. En esta metodología, la muestra se centrifuga hasta que alcanza el equilibrio, es decir, cuando la fuerza centrífuga de un complejo proteico se equilibra exactamente con su tendencia a la difusión. Debido a que este punto depende del peso molecular del complejo, pero no de su forma, se puede calcular directamente el peso molecular como requisito para determinar la estequiometría de cada proteína en el complejo.

Se pueden identificar grupos de proteínas que interaccionan entre sí mediante métodos bioquímicos

La mayoría de las proteínas de la célula actúan formando complejos con otras proteínas. Debido a esto, una forma importante de empezar a caracterizar el papel biológico de una determinada proteína consiste en identificar aquellas proteínas a las que se une.

Un método para la identificación de proteínas que se unen fuertemente es la *coinmunoprecipitación*. En este método, un anticuerpo reconoce una proteína diana específica. El anticuerpo está asociado a unos agentes que están unidos a una matriz sólida y que arrastran al complejo a la base del tubo de ensayo. Si la proteína se encuentra fuertemente unida a otra proteína en el momento de ser capturada por el anticuerpo, la proteína asociada también precipitará. Este método es útil para identificar proteínas que forman parte de complejos intracelulares, incluyendo aquellos que interaccionan de forma transitoria, como por ejemplo los formados en respuesta a moléculas de señalización (como se describirá en el Capítulo 15). Otro método frecuentemente utilizado para identificar asociaciones proteicas es la cromatografía de afinidad (Figura 8–13C). Para capturar mediante esta técnica proteínas que interaccionen, se lava un extracto celular a través de esta columna, las proteínas que interaccionen con la proteína diana se retendrán en la matriz de afinidad. Estas proteínas pueden ser eluidas después e identificadas por espectrometría de masas.

Además de capturar complejos proteicos en columnas o en tubos de ensayo, también se están desarrollando chips (*arrays*) de proteína de alta densidad para estudiar la función y la interacción de las proteínas. Estos chips contienen miles de proteínas o anticuerpos diferentes, dispuestos sobre láminas de vidrio o inmovilizados en pequeños pocillos, y permiten analizar de una sola vez las actividades bioquímicas y los perfiles de unión de un elevado número de proteínas. Por ejemplo, si se incuba un soporte que contiene miles de proteínas inmovilizadas, con una proteína marcada con fluorescencia, los puntos que permanecen fluorescentes tras un extenso lavado contienen una proteína que se une de forma específica a la proteína marcada.

Las interacciones proteína-proteína también pueden ser identificadas en levaduras mediante la técnica de los híbridos dobles

Hasta ahora hemos destacado las aproximaciones bioquímicas para el estudio de las interacciones entre proteínas. Sin embargo, una estrategia muy potente, denominada **sistema del híbrido doble**, se basa en aprovechar los propios mecanismos celulares para identificar interacciones proteicas.

Esta técnica saca partido de la naturaleza modular de las proteínas activadoras de genes (véase Figura 7–45). Estas proteínas se unen específicamente a secuencias del DNA y activan la transcripción génica; estas actividades están a menudo realizadas por dos dominios proteicos diferentes. Utilizando técnicas de DNA recombinante, esos dominios se usan para generar de forma separada unas proteínas de fusión que actúan como "cebo" y como "presa". Para generar la proteína de fusión cebo, la secuencia del DNA que codifica la proteína diana se fusiona con DNA que codifica el dominio de unión al DNA de una proteína activadora génica. Cuando esta construcción de DNA es introducida en levaduras, las células producen las proteínas de fusión, con una proteína diana acoplada a su dominio de unión al DNA (**Figura 8–24**). Esta proteína de fusión se une a la región reguladora de un gen reportero donde actúa como cebo para "pescar" proteínas que interaccionan con la proteína diana. Para buscar candidatos potenciales de unión (presas potenciales para el cebo), las proteínas candidatas deben ser construidas como proteínas de fusión: el DNA que codifica el dominio activador de una proteína activadora se fusiona a un gran número de genes diferentes. Los miembros de esta colección de genes –que codifican presas potenciales– se introducen individualmente en las levaduras que contienen el cebo. Si la levadura recibe un clon de DNA que expresa una presa para el cebo, las dos zonas del activador transcripcional se unen, conectando el gen reportero (véase Figura 8–24).

Esta técnica ingeniosa parece compleja, pero el sistema de híbridos dobles es relativamente sencillo de llevar a cabo en el laboratorio. Aunque las interacciones proteína-proteína ocurren en el núcleo celular de las levaduras, por este mecanismo pueden ser estudiadas proteínas de cualquier parte de la célula o de cualquier organismo. El sistema de híbridos dobles ha sido perfeccionado hasta determinar el mapa de las interacciones que ocurren en-

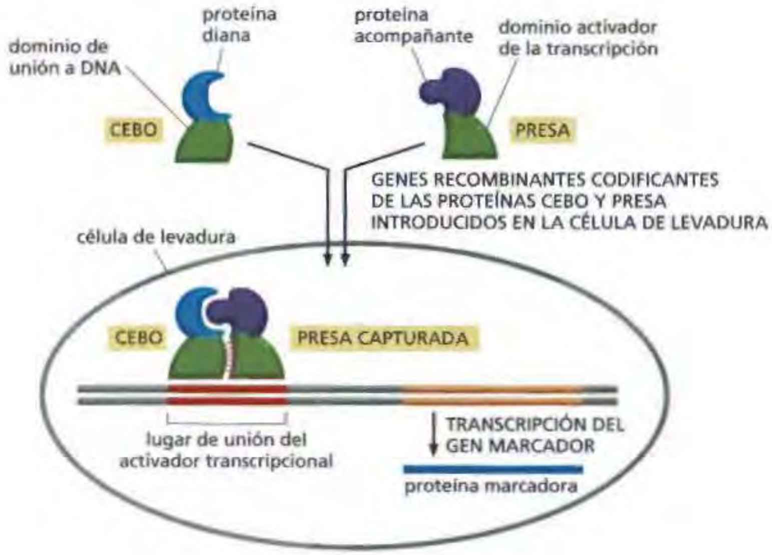


Figura 8–24 Sistema de doble híbrido en levadura para la detección de interacciones proteína-proteína. La proteína diana se fusiona a un dominio de unión a DNA, que situará a la proteína en la región reguladora de un gen marcador donde actuará como "cebo". Cuando, en el núcleo, la proteína diana se una a otra proteína especialmente diseñada ("presa"), su interacción provocará la unión de las dos mitades de un activador transcripcional, con lo que se activará la transcripción del gen marcador.

tre todas las proteínas que puede producir un organismo. En este caso, se genera un juego de cebos y presas fusionados para cada proteína celular y se puede analizar cada combinación cebo/presa. Así se han generado los mapas de interacción proteica para la mayoría de proteínas en levaduras, *C. elegans* y *Drosophila*.

La combinación de datos obtenidos mediante diferentes técnicas produce mapas fiables de interacción proteica

Tal como se indicó en el Capítulo 3, los mapas de interacciones proteicas pueden ser muy útiles para la identificación de las funciones de las proteínas (véase Figura 3–82). Por esta razón, tanto el método de híbridos dobles como las técnicas bioquímicas mencionadas anteriormente y conocidas como "tap-tagging" (véase pp. 515–516) se han automatizado para la determinación de interacciones entre miles de proteínas. No obstante, los resultados difieren entre distintos experimentos y muchas de las interacciones detectadas en un laboratorio no se reproducen en otros. Debido a esto, los mapas de interacción más útiles son aquellos que combinan los datos de muchos experimentos y que requieren que cada interacción venga refrendada por más de una técnica.

Los métodos ópticos pueden seguir interacciones proteicas en tiempo real

Una vez sabido que dos proteínas –o una proteína y una molécula pequeña– se asocian, es importante la caracterización detallada de su interacción. Las proteínas pueden asociarse de una forma más o menos permanente (como las subunidades de la polimerasa del RNA o el proteosoma) o realizar encuentros transitorios que pueden llegar a durar pocos milisegundos (como una proteína quinasa y su sustrato).

Para entender cómo actúa una proteína dentro de la célula se necesita determinar si su unión a otras proteínas es fuerte, la velocidad a la que se disocia de ellas y cómo pueden influenciar en esas interacciones las modificaciones covalentes, las pequeñas moléculas u otras proteínas. A menudo estos estudios de dinámica de proteínas utilizan métodos ópticos.

Ciertos aminoácidos, tales como el triptófano, presentan una fluorescencia débil que se puede detectar con fluorímetros muy sensibles. En muchos casos, la intensidad de la fluorescencia, o el espectro de emisión de los aminoácidos fluorescentes localizados en la superficie de interacción entre las proteínas, cambia cuando las proteínas se asocian. Cuando estos cambios pueden ser detectados por fluorometría, aportan una medida cuantitativa y sensible de la unión proteica.

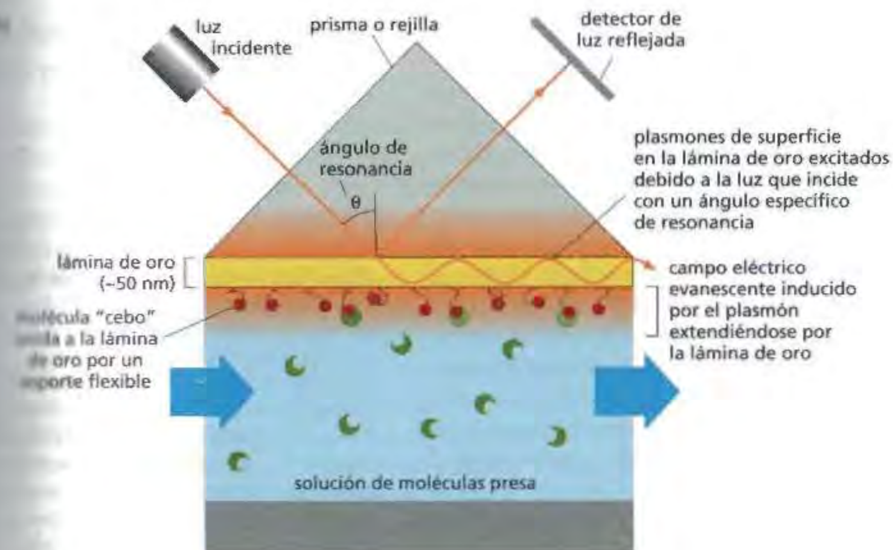
Un método particularmente útil para seguir la dinámica de la asociación de proteínas es la **resonancia de plasmón de superficie** (**SPR:** *surface plasmon resonance*). El método SPR se ha utilizado para caracterizar una amplia variedad de interacciones moleculares, que inclu-

... la unión antígeno-anticuerpo, la asociación ligando-receptor y la unión de las proteínas al DNA, a carbohidratos, a moléculas pequeñas o a otras proteínas.

En la técnica SPR, las interacciones de unión son detectadas mediante el seguimiento de la reflexión de un rayo de luz desde la interfase entre una solución acuosa de moléculas de unión potenciales y una superficie biosensora que contiene inmovilizada la proteína "cebo". La proteína cebo se encuentra unida a una fina capa de metal que recubre una de las caras de un prisma de cristal (**Figura 8–25**). Se hace pasar un haz de luz a través del prisma; a un determinado ángulo, llamado *ángulo de resonancia*, parte de la energía del haz interacciona con la nube de electrones de la película metálica, generando un plasmón –una oscilación de los electrones en ángulo recto respecto al plano de la película metálica, que rebotan entre la parte superior e inferior como un peso sobre un muelle. El plasmón genera a su vez un campo eléctrico que se extiende a lo largo de una corta distancia –aproximadamente igual a la longitud de onda de la luz incidente– por encima y por debajo de la superficie metálica. Cualquier cambio en la composición del entorno cercano al campo eléctrico comporta también un cambio del ángulo de resonancia, que podrá ser medido.

Para medir la unión, se hace pasar sobre la superficie del biosensor una solución que contiene proteínas u otras moléculas que supuestamente pueden interaccionar con la proteína cebo inmovilizada. Cuando las proteínas se unen al cebo, cambia la composición de los complejos moleculares en la superficie metálica, provocando un cambio en el ángulo de resonancia (véase Figura 8–25). Los cambios en el ángulo de resonancia se siguen a tiempo real y reflejan la cinética de asociación –o disociación– de las moléculas con la proteína ce-

(A)



(B) La unión de las moléculas presa a las moléculas cebo incrementa el índice de refracción de la capa superficial. Este hecho altera el ángulo de resonancia de la inducción por el plasmón, que puede ser medido por un detector.

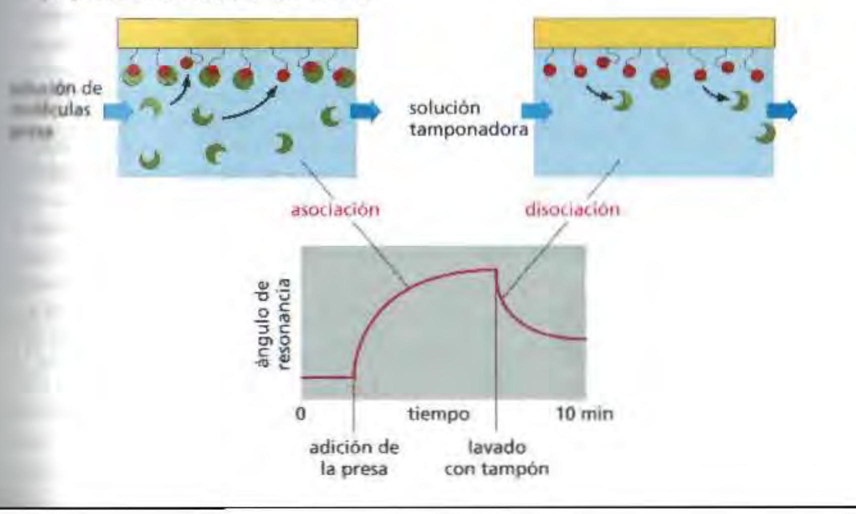


Figura 8–25 Resonancia de plasmón de superficie. (A) La técnica SPR puede detectar interacciones de unión, analizando la reflexión de un rayo de luz sobre la interfase de una solución acuosa de moléculas de unión potenciales (*verde*) y una superficie biosensora recubierta con una proteína "cebo" inmovilizada (*rojo*). (B) Se deja fluir una solución de proteínas "presa" sobre la proteína cebo inmovilizada. La unión de las moléculas presa a las proteínas cebo produce un cambio en el ángulo de resonancia que podrá ser medido. Estos cambios, seguidos en tiempo real, reflejan la asociación y disociación de los complejos moleculares.

bo. La constante de asociación (k_{on}) se determina mientras las moléculas interaccionan y la de disociación (k_{off}) mientras el tampón lava las moléculas unidas de la superficie del sensor. La constante de unión (K) se calcula dividiendo k_{off} por k_{on}. Aparte de determinar la cinética de unión, la técnica SPR se utiliza para determinar el número de moléculas que se unen en cada complejo: la magnitud del cambio en la señal es proporcional a la masa del complejo inmovilizado.

El método SPR es especialmente útil ya que sólo necesita pequeñas cantidades de proteína, éstas no tienen por que estar marcadas de ninguna forma y las interacciones proteína-proteína se pueden seguir a tiempo real.

Un tercer método óptico para analizar la interacción de proteínas utiliza la *proteína verde fluorescente* (comentada más adelante) y sus derivados en diferentes colores. Esta aplicación concreta consiste en marcar dos proteínas de interés con fluorocromos diferentes, de modo que el espectro de emisión de uno de los fluorocromos se solape con el espectro de absorción del segundo fluorocromo. Si las dos proteínas –y los fluorocromos que contienen– se acercan a una distancia de 1-10 nm, la energía de la luz absorbida será transferida de un fluorocromo al otro. La transferencia de energía, llamada **transferencia de energía fluorescente por resonancia (FRET:** *fluorescence resonance energy transfer*), se determina iluminando el primer fluorocromo y midiendo la emisión del segundo (**Figura 8–26**). La utilización como fluorocromos de dos variantes espectrales diferentes de la GFP permite visualizar la interacción de dos proteínas cualesquiera en el interior de las células.

Algunas técnicas permiten analizar moléculas individuales

Los métodos descritos hasta el momento en este capítulo son utilizados para estudiar grandes poblaciones de moléculas, una limitación que refleja el pequeño tamaño de las moléculas biológicas en relación con la sensibilidad de los métodos para detectarlas. Sin embargo, el reciente desarrollo de métodos altamente sensibles y de medición precisa, ha generado nuevas disciplinas de la biofísica: el estudio de las moléculas individuales. Los estudios de moléculas individuales son particularmente importantes en biología celular ya que muchos procesos se basan en las actividades celulares de un número reducido de moléculas críticas.

El primer ejemplo de una técnica para el estudio de la función de moléculas proteicas individuales es el uso de un electrodo de parche para medir el flujo de corriente a través de un único canal iónico (véase Figura 11–33). Otra aproximación es la unión de la proteína a una gran estructura, tal como una partícula de poliestireno, que se puede observar por microscopía convencional. Esta estrategia ha sido en especial útil en las medidas de los movimientos de las proteínas motoras. Por ejemplo, las moléculas de la proteína motora de quinesina (mencionada en el Capítulo 16) se pueden unir a una partícula y, mediante la observación del desplazamiento a lo largo del microtúbulo de esta partícula, se puede medir el

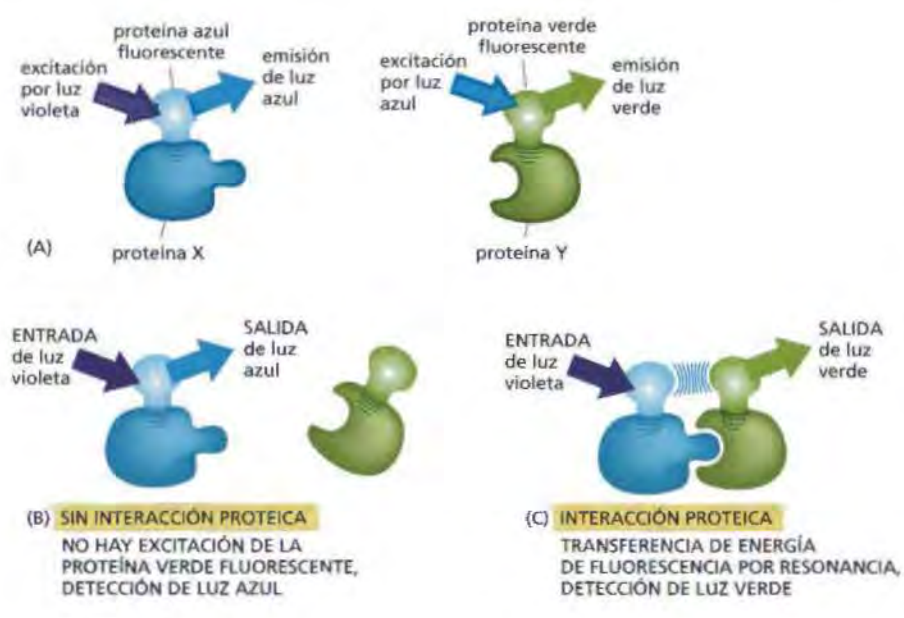


Figura 8–26 Transferencia de energía de fluorescencia por resonancia (FRET). Para observar si dos proteínas interaccionan y, en caso afirmativo, determinar el lugar de la célula en el que lo hacen, en primer lugar se sintetizan como proteínas de fusión unidas a diferentes variantes de GFP. (A) En el ejemplo mostrado, la proteína X está acoplada a una proteína azul fluorescente, excitable con luz violeta (370-440 nm) y que emite luz azul (440-480 nm); la proteína Y está acoplada a una proteína verde fluorescente, excitable con luz azul y que emite luz verde (510 nm). (B) Si las proteínas X e Y no interaccionan, al iluminar la muestra con luz violeta sólo emite fluorescencia la proteína azul. (C) Cuando las proteínas X e Y interaccionen, podrá darse la transferencia de tipo FRET. La iluminación de la muestra con luz violeta induce la excitación de la proteína azul fluorescente, cuya emisión excita a su vez a la proteína verde fluorescente: el resultado es una emisión neta de luz verde. Para que pueda darse esta transferencia de energía, los fluorocromos tienen que estar muy próximos entre sí (entre 1-10 nm). Puesto que no todas las moléculas de proteína X y proteína Y estarán unidas a cada momento, es posible detectar algo de luz azul; ahora bien, a medida que las dos proteínas empiezan a interaccionar, disminuye la emisión de la GFP dadora, al mismo tiempo que aumenta la de la GFP aceptora.

tamaño de los pasos del motor (es decir, la distancia recorrida por la proteína motor por cada molécula de ATP que hidroliza). Tal como veremos en el Capítulo 9, los microscopios ópticos tienen una resolución limitada debido a la difracción de la luz, pero se pueden utilizar los métodos computacionales y ópticos para determinar la posición de una partícula con una precisión más fina que el límite de resolución del microscopio. Utilizando estas técnicas, pueden ser fácilmente detectados y cuantificados movimientos extremadamente pequeños, incluso del orden de nanómetros.

Otra de las ventajas de unir moléculas a grandes partículas es que esas partículas pueden servir como "asas" a través de las cuales pueden manipularse las moléculas. Esto permite aplicar fuerzas a las moléculas y observar su respuesta. Por ejemplo, se puede medir la velocidad o el tamaño de los pasos de un motor en función de la fuerza que está aplicando la proteína motor. Como se describirá en el próximo capítulo, un haz láser enfocado se puede utilizar como unas "pinzas ópticas" para generar una fuerza mecánica sobre una partícula, permitiendo estudiar a las proteínas motor bajo una fuerza aplicada (véase Figura 9–35). Las partículas también se manipulan utilizando campos magnéticos, una tecnología conocida como "pinzas magnéticas". Si en un campo magnético están presentes muchas partículas, todas experimentarán la misma fuerza, permitiendo potencialmente la manipulación de un gran número de partículas de forma paralela en un mismo experimento.

Aunque las partículas pueden ser utilizadas como marcadores para estudiar los movimientos de las proteínas, es claramente preferible visualizar las proteínas por ellas mismas. En el próximo capítulo, constataremos que los recientes avances en microscopía han hecho esto posible.

La función de una proteína puede ser eliminada selectivamente con pequeñas moléculas

Los inhibidores químicos han contribuido al desarrollo de la biología celular. Por ejemplo, el inhibidor microtubular colchicina se utiliza para estudiar si los microtúbulos son necesarios en un proceso biológico concreto y hace algunas décadas también contribuyó a la primera purificación de la tubulina. En el pasado, estas pequeñas moléculas generalmente eran productos naturales, ya que eran sintetizados por seres vivos. Pero, aunque de manera general los productos naturales han sido extraordinariamente útiles en ciencia y medicina (véase p. ej., Tabla 6–4, p. 385), actúan en un número limitado de procesos biológicos. Sin embargo, el reciente desarrollo de métodos para sintetizar cientos de miles de pequeñas moléculas y realizar búsquedas automatizadas a gran escala, mantiene la esperanza de identificar inhibidores químicos para casi cualquier proceso biológico. En estas aproximaciones, se prueban de forma simultánea grandes colecciones de pequeños compuestos químicos, tanto en células vivas como en ensayos con sistemas libres de células. Cuando se identifica un inhibidor, éste se puede utilizar como sonda para identificar, mediante cromatografía de afinidad (Figura 8–13C) u otros medios, la proteína a la que se une el inhibidor. Esta estrategia general, a menudo denominada **biología química**, ha identificado eficientemente ligandos de muchas proteínas que intervienen en procesos claves en la biología celular. Por ejemplo, la proteína quinesina, que actúa en la mitosis, se identificó por este método (**Figura 8–27**). Los inhibidores químicos proporcionan a los biólogos celulares un gran control sobre los estadios de inhibición, ya que los compuestos pueden ser rápidamente añadidos o eliminados de las células, permitiendo que la función proteica se active o se inhiba con rapidez.

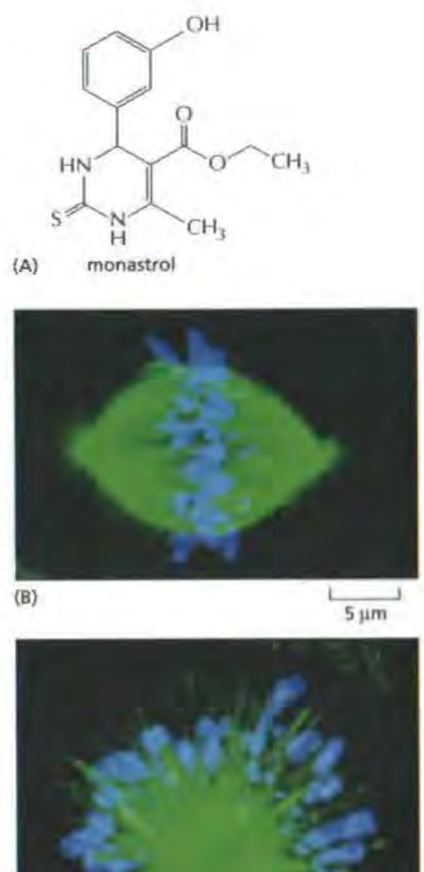


Figura 8–27 Pequeñas moléculas inhibidoras para la manipulación de células vivas. (A) Estructura química del monastrol, un inhibidor de la quinesina identificado en una búsqueda a gran escala de pequeñas moléculas que bloquean la mitosis. (B) Huso mitótico normal visto en células no tratadas. Los microtúbulos se tiñen de *verde* y los cromosomas de *azul*. (C) Huso monopolar que se forma en las células tratadas con monastrol. (B y C, de T.U. Mayer et al., *Science* 286:971-974, 1999. Con la autorización de AAAS.)

La estructura proteica se determina utilizando difracción de rayos X

La principal técnica que se utiliza para determinar a nivel atómico la estructura tridimensional de las moléculas, incluidas las proteínas, es la **cristalografía de rayos X**. Los rayos X, como la luz, son una forma de radiación electromagnética, pero de una longitud de onda mucho menor, normalmente alrededor de 0,1 nm (el diámetro de un átomo de hidrógeno). Si se dirige un haz estrecho y paralelo de rayos X a una muestra de una proteína pura, la mayoría de los rayos X pasarán a su través. Sin embargo una pequeña fracción de ellos será dispersada por los átomos de la muestra. Si la muestra es un cristal bien ordenado, los haces dispersados se reforzarán unos a otros en ciertos puntos y aparecerán como manchas de difracción cuando los rayos X sean recogidos sobre un detector (**Figura 8–28**).

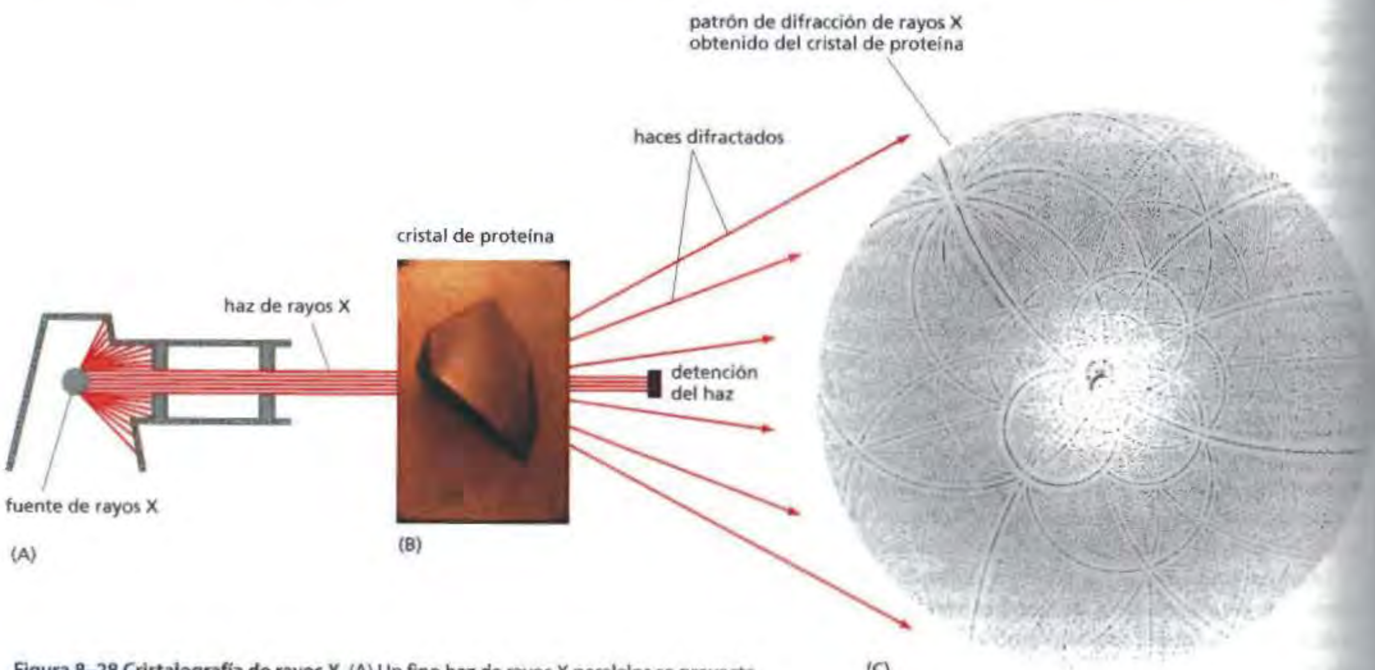
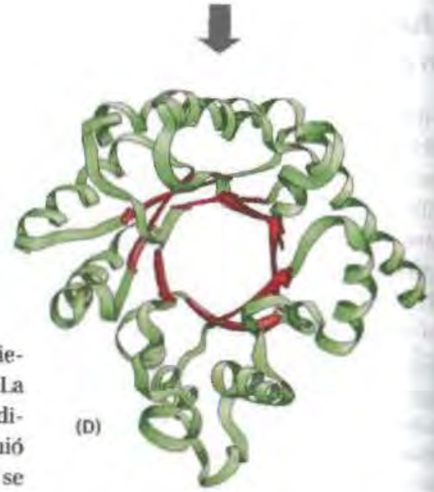


Figura 8–28 Cristalografía de rayos X. (A) Un fino haz de rayos X paralelos se proyecta sobre un cristal bien ordenado. (B) En la figura se muestra un cristal proteico de ribulosa bisfosfato carboxilasa, una enzima que tiene un papel crucial en la fijación de CO_2 durante la fotosíntesis. Parte del haz es dispersado por los átomos del cristal. Las ondas dispersadas se refuerzan entre sí en ciertos puntos y aparecen como un patrón de puntos de difracción. (C) El patrón de difracción de rayos X, junto a la secuencia de aminoácidos de la proteína, puede utilizarse para generar un modelo atómico de la misma. (D) El modelo atómico completo es difícil de interpretar, pero esta versión simplificada derivada de los datos de la difracción de rayos X, muestra claramente las características estructurales de la proteína (hélices α en *verde*, láminas β en *rojo*). Nótese que los componentes representados en A y D no se muestran a escala. (B, por cortesía de C. Branden; C, por cortesía de J. Hajdu e I. Andersson; D, adaptado del original cedido por B. Furugren.)



La posición e intensidad de cada mancha en el patrón de difracción de rayos X contiene información sobre las posiciones de los átomos en el cristal que intentamos deducir. La deducción de la estructura tridimensional de una gran molécula a partir del patrón de difracción de su cristal es una tarea compleja y para una molécula de proteína no se consiguió hasta la década de 1960. Sin embargo, recientemente los análisis de difracción de rayos X se han automatizado cada vez más, de forma que ahora el proceso más lento es el de la producción de cristales proteicos adecuados. Este proceso requiere grandes cantidades de una proteína muy pura y a menudo supone años de tanteo en la búsqueda de las condiciones de cristalización adecuadas. La marcha se ha acelerado con el uso de las técnicas del DNA recombinante, produciendo proteínas puras, y con las técnicas robóticas, que permiten tantear un gran número de condiciones de cristalización.

El resultado del análisis del patrón de difracción resultante produce un complejo mapa tridimensional de densidades electrónicas. Interpretar este mapa, es decir, convertir los contornos en una estructura tridimensional, resulta una tarea complicada y requiere la secuencia de aminoácidos de la proteína. Fundamentalmente mediante ensayo y error se consigue correlacionar la secuencia y el mapa de densidades electrónicas mediante un ordenador, intentando conseguir el mejor resultado posible. La fiabilidad del modelo atómico final depende de la resolución de los datos cristalográficos iniciales: una resolución de 0,5 nm puede producir un mapa de baja resolución del esqueleto polipeptídico, mientras que una resolución de 0,15 nm permite situar todos los átomos (excepto los de hidrógeno) en la molécula.

A menudo, un modelo atómico completo resulta demasiado complejo para poderlo observar directamente, pero a partir de él se pueden derivar versiones simplificadas que muestran las características estructurales esenciales de la estructura (véase Panel 3–2, pp. 132–133). Mediante cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (véase p. siguiente) se ha determinado la estructura de unas 20.000 proteínas diferentes, lo cual es suficiente para empezar a entrever familias de estructuras comunes. A menudo, estas es-

estructuras resultan más conservadas a lo largo de la evolución que las secuencias de aminoácidos que las forman (véase Figura 3–13).

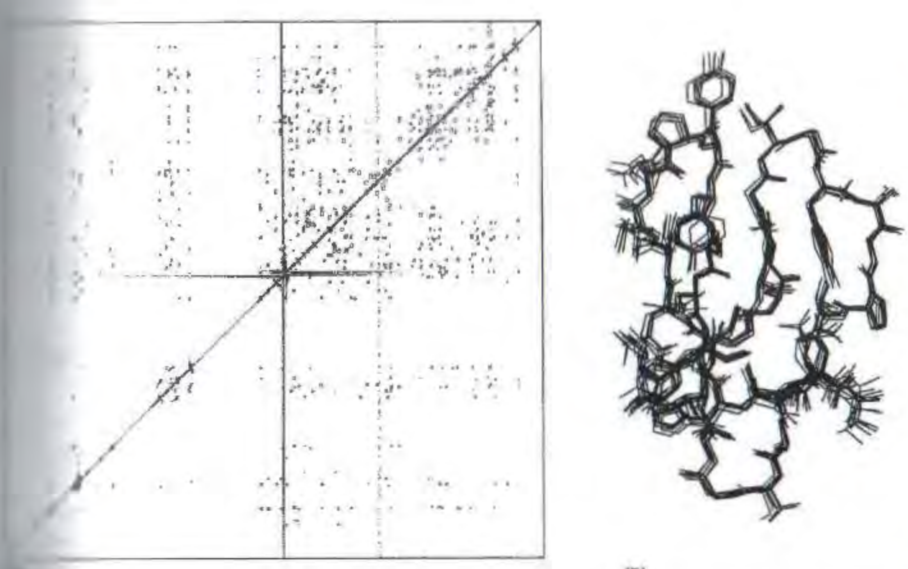
Las técnicas de cristalografía de rayos X también pueden utilizarse para estudiar complejos macromoleculares. Uno de los éxitos más recientes ha sido la resolución de la estructura del ribosoma, una máquina grande y compleja formada por varios RNA y más de 50 proteínas (véase Figura 6–64). Esta determinación requirió la utilización de un sincrotón, una fuente de radiación que genera rayos X de la intensidad necesaria para analizar complejos macromoleculares. <GGCC>

La estructura proteica se puede determinar en solución utilizando espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR)

La espectroscopia de **resonancia magnética nuclear (NMR: *nuclear magnetic resonance*)** se ha utilizado para analizar la estructura de pequeñas moléculas y actualmente se utiliza cada vez más para estudiar la estructura de pequeñas proteínas o de dominios proteicos. A diferencia de la cristalografía de rayos X, la NMR no requiere que la muestra esté cristalizada; simplemente se necesita un pequeño volumen de una solución proteica concentrada, que se coloca en un fuerte campo magnético. De hecho, esta técnica es la que proporciona mayor detalle sobre la estructura tridimensional de moléculas en solución.

Algunos núcleos atómicos, particularmente los de hidrógeno, tienen un momento magnético o *espín*: es decir, tienen una magnetización intrínseca, como una barra magnética. El espín se alinea en el interior de un fuerte campo magnético, pero puede variar a un estado semialineado al ser excitado en respuesta a una aplicación de pulsos de radiofrecuencia (RF) de radiación electromagnética. Cuando los núcleos de hidrógeno excitados se relajan a su estado alineado, emiten radiación de RF, la cual se puede medir y expresar en forma de espectro. La naturaleza de la radiación emitida depende del entorno de cada núcleo de hidrógeno, de forma que la excitación de un núcleo influye en la absorción y la emisión de radiación de otro núcleo que esté suficientemente cerca de él. Por tanto es posible, mediante una ingeniosa elaboración de la técnica básica de NMR conocida como NMR bidimensional, distinguir las señales procedentes de núcleos de hidrógeno de diferentes residuos de aminoácidos e identificar y medir los pequeños cambios que ocurren en estas señales cuando los núcleos de hidrógeno se acercan suficientemente como para interaccionar entre sí: la magnitud del cambio revela la distancia entre el par de átomos de hidrógeno que interactúan. De esta forma, la NMR aporta información sobre las distancias entre partes de la molécula de proteína. Combinando esta información con la de la secuencia de aminoácidos es posible, en principio, identificar la estructura tridimensional de la proteína (Figura 8–29).

Por razones técnicas, mediante espectroscopia de NMR solamente se pueden determinar las estructuras de pequeñas proteínas de 20.000 daltons o menos. La técnica pierde re-



(B)

Figura 8–29 Espectroscopia NMR. (A) Ejemplo de los resultados obtenidos a partir de un aparato de NMR. Se trata de un espectro bidimensional de NMR derivado del dominio C-terminal de la enzima celulasa. Las manchas representan interacciones entre átomos de hidrógeno que son casi vecinos en la proteína y, por tanto, reflejan la distancia que los separa. Diferentes programas de cálculo por ordenador junto con la secuencia de aminoácidos, que debe ser conocida, permiten deducir posibles estructuras compatibles. En (B) se presentan superpuestas 10 estructuras, cada una de las cuales satisface tan bien como las demás, las distancias de constricción que se han calculado. El conjunto de estructuras constituye un buen indicador de la estructura tridimensional más probable. (Por cortesía de P. Kraulis.)

solución al incrementar el tamaño de la macromolécula, aunque avances técnicos recientes han elevado el límite hasta los 100.000 daltons, haciendo posible el análisis estructural por medio de NMR de la mayoría de proteínas.

Puesto que los estudios de NMR se realizan en solución, el método presenta la ventaja de poder seguir cambios en la estructura de la proteína, por ejemplo durante su plegamiento o durante su unión a un sustrato. La NMR también se utiliza con éxito para estudiar moléculas no proteicas y, por ejemplo, resulta valiosa como método para identificar las estructuras tridimensionales de las moléculas de RNA y de las complejas cadenas laterales hidrocarbonadas de las glicoproteínas.

En la **Tabla 8–2** se recogen algunos hitos del desarrollo de la cristalografía de rayos X y de la NMR.

La secuencia proteica y la estructura proporcionan pistas sobre la función de las proteínas

Una vez descrita la metodología para la purificación y para el análisis de las proteínas, el investigador se encuentra con una situación muy frecuente en la biología celular y molecular: ha identificado un gen importante para un proceso biológico, pero no tiene conocimiento acerca de las propiedades bioquímicas de su producto proteico.

Gracias al aumento del número de secuencias de proteína y de ácidos nucleicos catalogados en las bases genómicas de datos, a menudo puede predecirse la función de un gen –y de la proteína que codifica– simplemente comparando su secuencia con la de genes caracterizados previamente (véase Figura 3–14). Dado que la secuencia de aminoácidos determi-

Tabla 8–2 Hitos del desarrollo de la cristalografía por rayos X, de la resonancia magnética nuclear y de sus aplicaciones a las moléculas biológicas

1864	**Hoppe-Seyler** cristalizaron y dieron nombre a la proteína hemoglobina.
1895	**Röntgen** observó que cuando los rayos catódicos (electrones) inciden sobre un blanco de metal, se produce una nueva forma de radiación penetrante, que denominó rayos X.
1912	**Von Laue** obtuvo los primeros modelos de difracción de rayos X, haciendo pasar rayos X a través de un cristal de sulfuro de zinc. **W.L. Bragg** propuso una relación simple entre un patrón de difracción de rayos X y la disposición de los átomos en el cristal que produce este patrón.
1926	**Summer** obtuvo cristales de la enzima ureasa a partir de extractos de judías y demostró que las proteínas tienen actividad catalítica.
1931	**Pauling** publicó sus primeros ensayos sobre "La Naturaleza del enlace químico", detallando las reglas del enlace covalente.
1934	**Bernal** y **Crowfoot** presentaron los primeros modelos detallados de difracción de rayos X de una proteína, obtenidos a partir de cristales de la enzima pepsina.
1935	**Patterson** desarrolló un método analítico para determinar las distancias interatómicas a partir de los datos de difracción de rayos X.
1941	**Astbury** obtuvo el primer patrón de difracción de rayos X del DNA.
1946	**Block** y **Purcell** describen la NMR.
1951	**Paulin** y **Corey** propusieron la estructura de una conformación helicoidal de una cadena de L-aminoácidos –la hélice α– y la estructura de la lámina β, la presencia de las cuales fue descrita más tarde en numerosas proteínas.
1953	**Watson** y **Crick** propusieron el modelo de doble hélice del DNA, basándose en los patrones de difracción de rayos X obtenidos por **Franklin** y **Wilkins.**
1954	**Perutz** y colaboradores desarrollaron métodos de átomos pesados para solucionar el problema de fases en la cristalografía de las proteínas.
1960	**Kendrew** describió la primera estructura detallada de una proteína (la mioglobina de cachalote) con una resolución de 0,2 nm; **Perutz** propuso una estructura de resolución menor de la hemoglobina, una proteína mayor que la anterior.
1966	**Phillips** describió la estructura de la lisozima, la primera enzima analizada en detalle.
1971	**Jeener** propuso la utilización de NMR bidimensional; **Wuthrich** y colaboradores durante los primeros años de la década de 1980 utilizaron por primera vez este método para resolver la estructura de una proteína.
1976	**Kim** y **Rich**, y **Klug** y colaboradores describieron la estructura tridimensional del tRNA, determinada mediante difracción de rayos X.
1977-1978	**Holmes** y **Klug** determinaron la estructura del virus del mosaico del tabaco (VMT); **Harrison** y **Rossman** determinaron la estructura de dos pequeños virus esféricos.
1985	**Michel, Deisenhofer** y colaboradores determinaron la primera estructura de una proteína transmembrana (un centro de reacción de una bacteria) mediante cristalografía de rayos X. **Henderson** y colaboradores obtuvieron la estructura de la bacteriorrodopsina, una proteína transmembrana, mediante métodos de microscopía electrónica de alta resolución descritos entre 1975 y 1990.

```
Score =  399 bits (1025), Expect = e-111
Identities = 198/290 (68%), Positives = 241/290 (82%), Gaps = 1/290

Query: 57  MENFQKVEKIGEGTYGVVYKARNKLTGEVVALKKIRLDTETEGVPSTAIREISLLKELNH 116
            ME ++KVEKIGEGTYGVVYKA +K T E +ALKKIRL+ E EGVPSTAIREISLLKE+NH
Sbjct: 1   MEQYEKVEKIGEGTYGVVYKALDKATHETIALKKIRLEQEDEGVPSTAIREISLLKEMNH 60

Query: 117 PNIVKLLDVIHTENKLYLVFEFLHQDLKKFMDASALTGIPLPLIKSYLFQLLQGLAFCHS 176
             NIV+L DV+H+E ++YLVFE+L  DLKKFMD+           LIKSYL+Q+L G+A+CHS
Sbjct: 61  GMIVRLHDVVHSEKRLYLVFEYLDLDLKKFMDSCPEFAKNPTLIKSYLYQILHGVAYCHS 120
                              ▼
Query: 177 HRVLHRDLKPQNLLINTE-GAIKLADFGLARAFGVPVRTYTHEVVTLWYRAPEILLGCKY 235
            HRVLHRDLKPQNLLI+    A+KLADFGLARAFG+PVRT+THEVVTLWYRAPEILLG +
Sbjct: 121 HRVLHRDLKPQNLLIDRRTMALKLADFGLARAFGIPVRTFTHEVVTLWYRAPEILLGARQ 180

Query: 236 YSTAVDIWSLGCIFAEMVTRRALFPGDSEIDQLFRIFRTLGTPDEVVWPGVTSMPDYKPS 295
            YST VD+WS+GCIFAEMV ++ LFPGDSEID+LF+IFR LGTP+E  WPGV+ +PD+K +
Sbjct: 181 YSTPVDVWSVGCIFAEMVNQKPLFPGDSEIDELFKIFRILGTPNEQSWPGVSCLPDFKTA 240

Query: 296 FPKWARQDFSKVVPPLDEDGRELLSQMLHYDPNKRISAKAALAHPFFQDV 345
            FP+W  QD + VVP LD  G  LLS+ML Y+P+KRI+A+ AL H +F+D+
Sbjct: 241 FPRWQAQDLATVVPNLDPAGLDLLSKMLRYEPSKRITARQALEHEYFKDL 290
```

Figura 8–30 Resultados de una búsqueda de tipo BLAST. Se pueden utilizar las bases de datos de secuencias para encontrar secuencias similares de aminoácidos o de nucleótidos. En este ejemplo, se muestra el resultado de la búsqueda de proteínas similares a la proteína humana reguladora del ciclo celular Cdc2 (*Query*); el programa de búsqueda localiza la proteína Cdc2 del maíz (*Sbjct*), que es un 68% idéntica (y un 82% similar) a la secuencia de aminoácidos de la Cdc2 humana. La alineación de ambas secuencias empieza en el residuo 57 de la proteína humana, lo que sugiere que esta presenta una región N-terminal que no se encuentra en la proteína del maíz. Los rectángulos *verdes* indican diferencias en la secuencia y los de color *amarillo* resumen las semejanzas: cuando dos secuencias de aminoácidos son idénticas, se muestra el residuo; las sustituciones de aminoácidos conservativas se indican con un signo (+). Sólo se ha introducido un salto en la secuencia –indicado por la *flecha roja* en la posición 194 de la secuencia humana– con el objetivo de alinear de forma máxima las dos secuencias. La puntuación del proceso de alineación (*Score*) tiene en cuenta las penalizaciones debidas a sustituciones o a espacios vacíos; cuanto más alta es la puntuación del proceso de alineación mayor es la coincidencia entre ambas secuencias. El grado en el que la alineación es significativa queda reflejado en el valor de *esperanza* (E), que representa el número esperado de alineaciones debidas al azar con puntuaciones iguales o mejores que la puntuación obtenida para el par de secuencias alineadas. Cuanto menor es el valor E, más significativa es la coincidencia entre ambas secuencias; el valor bajo de la Figura (e^{-111}) indica que la alineación es muy significativa. Con valores de E superiores a 0,1 es poco probable que exista una relación real entre las dos secuencias. Por ejemplo, un valor de E de 0,1 significa que hay una 1 entre 10 posibilidades de que esta coincidencia se realizara únicamente por azar.

de la estructura de la proteína y, a su vez, la estructura determina su función bioquímica, las proteínas que comparten secuencias de aminoácidos, a menudo realizan funciones bioquímicas similares, incluso aunque se encuentren en organismos poco relacionados entre sí. Por lo tanto, hoy en día la determinación de la función de una proteína recién descubierta empieza normalmente por la búsqueda de proteínas ya identificadas que presenten una secuencia de aminoácidos similar a la de la nueva proteína.

Cuando se quieren encontrar homologías entre genes o entre proteínas, la búsqueda de una colección de secuencias se realiza habitualmente a través de Internet, y consiste en seleccionar una base de datos e introducir la secuencia deseada. Un programa de alineamiento de secuencias –entre los más populares se encuentra BLAST y FASTA– recorre la base de datos buscando secuencias similares, tratando de alinear con ellas la secuencia introducida, hasta que un grupo de residuos coincide parcial o totalmente con alguna de las secuencias almacenadas (**Figura 8–30**). Los resultados de una búsqueda realizada sobre una secuencia de nucleótidos o de proteína, por compleja que ésta sea, se obtienen en pocos minutos. Las comparaciones obtenidas se utilizan para predecir la función de proteínas individuales o de familias de proteínas, e incluso para predecir la dotación proteica de un organismo una vez se ha secuenciado su genoma.

Como ya se ha explicado en el Capítulo 3, muchas proteínas que adoptan la misma conformación y presentan funciones relacionadas están muy distanciadas para ser consideradas homólogas a partir de su secuencia de aminoácidos (véase Figura 3–13). De esta manera, la habilidad para predecir la estructura tridimensional de una proteína a partir de la secuencia de aminoácidos mejoraría la capacidad de asociar una función a una proteína a partir de los bancos de datos genómicos. Últimamente, se han realizado grandes avances en la predicción de estructuras proteicas. Estas predicciones se basan, en parte, en el conocimiento de decenas de miles de estructuras proteicas resueltas por cristalografía de rayos X, espectroscopia NMR y, en parte, por modulación informática utilizando el conocimiento de las fuerzas físicas que actúan sobre los átomos. Sin embargo, sigue siendo un reto predecir grandes estructuras proteicas, proteínas que contengan múltiples dominios, o un elevado nivel de resolución, que puedan ayudar al desarrollo de fármacos basándose en el diseño por ordenador.

Aunque el hallazgo de secuencias y estructuras homólogas de nuevas proteínas aporta numerosos indicios sobre su función, es necesario probar esta información mediante la experimentación. Sin embargo, las evidencias generadas por comparación de secuencias, normalmente conducen al investigador hacia un buen camino experimental y su uso se ha erigido como una de las estrategias más importantes en la biología celular moderna.

Resumen

La mayoría de proteínas funcionan coordinadamente con otras proteínas; existen muchos métodos para identificar y estudiar las interacciones proteína-proteína. Pequeñas moléculas inhibidoras permiten estudiar en las células vivas las funciones de las proteínas sobre las que actúan. Dado que

las proteínas con estructuras similares a menudo tienen funciones similares, con frecuencia se puede predecir la actividad bioquímica específica de una proteína mediante la búsqueda en los bancos de datos de proteínas caracterizadas de forma previa y que tengan una secuencia de sus aminoácidos similar.

ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DEL DNA

Hasta principios de la década de 1970, el DNA era la molécula biológica que planteaba más dificultades para su análisis bioquímico. Enormemente larga y químicamente monótona, la secuencia de nucleótidos del DNA, que constituye el material genético de un organismo, tan sólo podía ser estudiada de forma indirecta mediante la secuenciación de las proteínas o del RNA, o mediante el análisis genético. En la actualidad, la situación ha cambiado por completo. De ser la macromolécula celular más difícil de analizar, el DNA ha pasado a ser la más fácil de estudiar. Hoy en día es posible separar una determinada región del DNA de casi cualquier genoma, obtener un número de copias casi ilimitado y determinar en pocas horas su secuencia de nucleótidos. En pleno auge del proyecto Genoma Humano, las grandes instalaciones que cuentan con tecnología automatizada, han estado generando secuencias de DNA a una velocidad en torno a 1000 nucleótidos por segundo. Mediante técnicas relacionadas, un gen aislado puede ser alterado a voluntad (sometido a ingeniería) y ser transferido a la línea germinal de animales o plantas, donde se incorpora como parte funcional y permanente del genoma del organismo.

Estos adelantos técnicos en la **ingeniería genética** –la capacidad de manipular el DNA con precisión en un tubo de ensayo o en un organismo– han tenido un impacto espectacular en la biología celular, permitiendo el estudio de las células y de sus macromoléculas mediante sistemas que antes eran inimaginables. La **tecnología del DNA recombinante** constituye un conjunto variado de técnicas, algunas de las cuales son nuevas y otras han sido adoptadas de otros campos de la ciencia, como la genética microbiana (**Tabla 8–3**). Las más importantes son:

1. La rotura específica del DNA mediante nucleasas de restricción, que facilita enormemente el aislamiento y la manipulación de los genes individualmente.
2. La unión del DNA que hace posible el diseño y la construcción de moléculas de DNA que no se encuentran en la naturaleza.
3. La clonación de DNA, mediante el uso de vectores de clonación o de la reacción en cadena de la polimerasa, de tal manera que una molécula sencilla de DNA puede ser reproducida generando muchos miles de millones de copias idénticas.
4. La hibridación de los ácidos nucleicos, que hace posible localizar secuencias determinadas de DNA o de RNA con una gran exactitud y sensibilidad, utilizando la capacidad que tienen estas moléculas de unirse de forma selectiva a secuencias complementarias de otros ácidos nucleicos.
5. La secuenciación rápida de todos los nucleótidos de un fragmento purificado de DNA (incluso genomas enteros), que hace posible identificar genes y deducir la secuencia de aminoácidos de las proteínas que codifican.
6. El seguimiento simultáneo del nivel de mRNA producido por cada uno de los genes de una célula, mediante microchips de ácidos nucleicos que permiten efectuar simultáneamente decenas de miles de reacciones de hibridación.

En esta sección se describirá cada una de estas técnicas básicas que, en su conjunto, han revolucionado el estudio de la biología celular.

Las nucleasas de restricción cortan en fragmentos las largas moléculas de DNA

A diferencia de las proteínas, los genes no existen en las células como entidades independientes, sino como regiones de una molécula de DNA de gran tamaño. Aunque las moléculas de DNA se pueden fragmentar mecánicamente al azar en pequeños trozos, un fragmento que contenga un gen aislado del genoma de un mamífero no será más que uno entre cientos de miles, imposibles de diferenciar entre ellos por su tamaño. Entonces, ¿cómo se puede purificar un gen? Todas las moléculas de DNA están formadas por una mezcla aproximada-

Tabla 8-3 Algunas de las etapas principales del desarrollo de la tecnología de transgénicos y del DNA recombinante

[illegible]	**Miescher** aisló por primera vez el DNA a partir de leucocitos obtenidos de vendajes empapados de pus de un hospital cercano.
[illegible]	**Avery** demostró que es el DNA, y no la proteína, el que contiene la información genética durante la transformación bacteriana.
[illegible]	**Watson** y **Crick** propusieron el modelo de la doble hélice para la estructura del DNA, basado en los resultados de rayos X de **Franklin** y **Wilkins**.
[illegible]	**Kornberg** descubre la DNA polimerasa, la enzima que se utiliza para producir sondas de DNA marcadas.
[illegible]	**Marmur** y **Doty** descubrieron la renaturalización del DNA, estableciendo la especificidad y la posibilidad de las reacciones de hibridación de los ácidos nucleicos.
[illegible]	**Arber** proporcionó la primera evidencia de la existencia de las nucleasas de restricción del DNA, que condujo a su posterior purificación y utilización en la caracterización de la secuencia del DNA por parte de **Nathans** y **H. Smith**.
[illegible]	**Nirenberg, Ochoa** y **Khorana** dilucidaron el código genético.
[illegible]	**Gellert** descubrió la DNA ligasa, la enzima utilizada para unir fragmentos de DNA.
[illegible]-1973	Se desarrollaron las técnicas de clonación del DNA en el laboratorio de **Boyer, Cohen, Berg** y colaboradores, en la Universidad de Stanford y en la Universidad de California en San Francisco.
[illegible]	**Southern** desarrolló la hibridación tras transferencia sobre gel, para la detección de secuencias específicas de DNA.
[illegible]-1977	**Sanger** y **Barrell** y **Maxam** y **Gilbert** desarrollaron métodos rápidos de secuenciación del DNA.
[illegible]-1982	**Palmiter** y **Brinster** produjeron un ratón transgénico; **Spradling** y **Rubin** produjeron moscas del vinagre transgénicas.
[illegible]	**GenBank**, la base pública de datos de secuencias del NIH, que se halla en el Laboratorio Nacional de los Álamos.
[illegible]	**Mullis** y colaboradores inventaron la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *polymerase chain reaction*).
[illegible]	**Capecchi** y **Smithies** desarrollaron métodos para realizar sustituciones génicas dirigidas en células madre embrionarias de ratón.
[illegible]	**Fields** y **Song** desarrollaron el sistema del doble híbrido en levadura para la identificación y estudio de las interacciones entre proteínas.
[illegible]	**Olson** y colaboradores describieron los lugares de secuencia marcadora, fragmentos únicos de DNA que se utilizan para realizar mapas físicos de los cromosomas humanos.
[illegible]	**Lipman** y colaboradores hacen público BLAST, un algoritmo utilizado para buscar homologías entre secuencias de DNA o proteína.
[illegible]	**Simon** y colaboradores estudiaron cómo emplear de forma eficiente los cromosomas artificiales de bacteria (BAC), de modo que pudiesen transportar grandes fragmentos de DNA humano clonado para su posterior secuenciación.
[illegible]	**Hood** y **Hunkapillar** desarrollaron una nueva tecnología de secuenciación automática de DNA.
[illegible]	**Venter** y colaboradores secuenciaron el primer genoma completo, correspondiente a la bacteria *Haemophilus influenzae*.
[illegible]	**Goffeau** y un consorcio internacional de investigadores anunciaron la finalización de la primera secuencia genómica de un eucariota, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
[illegible]-1997	**Lockhart** y colaboradores y **Brown** y **DeRisi** desarrollaron los microchips de DNA, que permiten el estudio simultáneo de miles de genes.
[illegible]	**Sulston** y **Waterston** y colaboradores finalizaron la primera secuencia completa de un organismo pluricelular, el gusano nematodo *Caenorhabditis elegans*.
[illegible]	Un consorcio de investigadores anunció la finalización del borrador de la secuencia del genoma humano.
[illegible]	Se publica la secuencia finalizada del genoma humano.

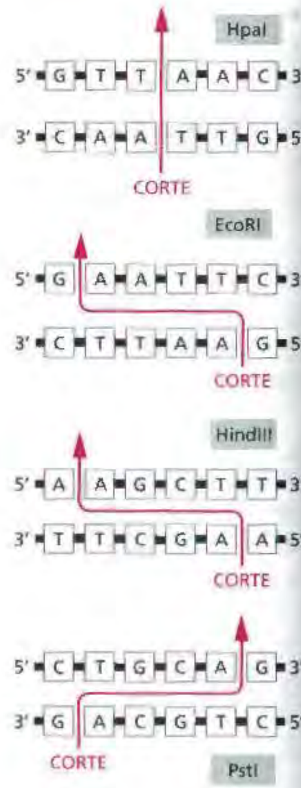
parte equivalente de los mismos cuatro nucleótidos, por lo que no pueden separarse, como se hace con las proteínas, según procedimientos basados en su diferente carga, composición o propiedades de unión.

La solución a todos estos problemas apareció con el descubrimiento de las **nucleasas de restricción**. Estas enzimas, que pueden aislarse de bacterias, cortan la doble cadena de la molécula de DNA por puntos específicos definidos por la secuencia de nucleótidos y producen así fragmentos de DNA de diversos tamaños. Distintas especies de bacteria fabrican diferentes endonucleasas de restricción con distintas especificidades de secuencia, de forma que resulta bastante sencillo encontrar una endonucleasa de restricción que libere un fragmento de DNA que incluya a un determinado gen. El tamaño del fragmento liberado puede ser utilizado para purificar parcialmente el gen de una mezcla de ellos.

Las bacterias de diferente especie producen nucleasas de restricción diferentes, que las protegen de los virus degradando el DNA vírico que entra en la célula. Cada enzima bacteriana reconoce una secuencia específica del DNA de entre cuatro a ocho nucleótidos de longitud. Cuando estas secuencias se encuentran en el genoma de la propia bacteria están protegidas de la degradación gracias a la metilación de un nucleótido A o C; en cambio, por lo general las secuencias del DNA exógeno no se hallan metiladas, por lo que son atacadas por la nucleasa de restricción. A partir de diferentes especies de bacteria se han purificado muchas nucleasas de restricción y, actualmente, existen más de 100 de estas enzimas comercializadas, capaces de reconocer un gran número de secuencias nucleotídicas diferentes.

Algunas nucleasas de restricción producen cortes que dejan secuencias cortas de DNA de cadena sencilla en los dos extremos de cada fragmento (**Figura 8–31**). Este tipo de extre-

Figura 8–31 Secuencias de nucleótidos del DNA reconocidas por cuatro nucleasas de restricción ampliamente utilizadas. Como ocurre en estos ejemplos, estas secuencias suelen tener seis pares de bases y son palindrómicas, esto es, las secuencias de ambas hebras son iguales entre sí si se gira la hélice 180 grados alrededor del centro de la corta región de hélice que es reconocida. Las enzimas cortan las dos cadenas de DNA en el lugar de la secuencia de reconocimiento o cerca de ella. En el caso de algunas enzimas como HpaI, el corte libera extremos romos; en otros casos como EcoRI, HindIII y PstI, el corte es escalonado y genera extremos cohesivos. Las nucleasas de restricción se obtienen de varias especies de bacterias: HpaI de *Haemophilus parainfluenzae*; EcoRI de *Escherichia coli*, HindIII de *Haemophilus influenzae* y PstI de *Providencia stuartii*.



mos se denominan *extremos cohesivos*, ya que cada extremo tiene una secuencia que es complementaria a la que genera la misma endonucleasa de restricción en cualquier otro fragmento (**Figura 8–32**). Los extremos cohesivos permiten unir fácilmente fragmentos de DNA obtenidos con la misma endonucleasa de restricción (o con otra que genere los mismos extremos cohesivos). Las moléculas de DNA producidas mediante la unión de dos o más fragmentos de DNA se denominan moléculas de **DNA recombinante**.

Las moléculas de DNA de diferentes tamaños pueden separarse mediante la electroforesis en gel

La longitud y la pureza de las moléculas de DNA pueden determinarse con precisión utilizando los mismos métodos de electroforesis en gel que han demostrado ser tan útiles para el análisis de las proteínas. En la actualidad el proceso es más sencillo que para las proteínas: dado que en las moléculas de ácido nucleico cada nucleótido presenta una carga negativa única (en el grupo fosfato), no es necesario utilizar el detergente cargado negativamente SDS que se requiere para conseguir que las moléculas de proteína se desplacen de una manera uniforme hacia el electrodo positivo. Para los fragmentos de DNA menores de 500 nucleótidos, existen geles de poliacrilamida especialmente diseñados que permiten la separación de moléculas que se diferencian en un solo nucleótido de longitud (**Figura 8–33A**). No obstante, los poros de los geles de poliacrilamida son demasiado pequeños para permitir el paso de moléculas grandes de DNA; para separar estas moléculas según su tamaño, se utilizan geles mucho más porosos formados por soluciones diluidas de agarosa (un polisacárido aislado de algas marinas) (Figura 8–33B). Ambos métodos de separación de DNA son muy utilizados con finalidad tanto analítica como preparativa.

Una variación de la electroforesis en agarosa, llamada *electroforesis en gel de campo pulsante*, hace posible la separación de moléculas enormes de DNA. La electroforesis en gel ordinaria no consigue separar estas moléculas porque el campo eléctrico uniforme las extiende adoptando configuraciones serpenteantes que viajan a través del gel a una velocidad que es independiente de su longitud. Sin embargo, alteraciones frecuentes en la dirección del campo eléctrico fuerzan a las moléculas a reorientarse para poderse desplazar. Este proceso de reorientación es más lento cuanto mayor es el tamaño de la molécula, por lo que las moléculas largas se van retrasando respecto a las más cortas. Como consecuencia de ello, los cromosomas completos de bacterias o de levaduras aparecen como bandas discretas y pueden ser aislados e identificados en base a su tamaño (Figura 8–33C). Aunque un cromosoma típico de mamífero de 10^8 pares de bases es demasiado grande incluso para poder ser aislado con este método, pueden aislarse e identificarse grandes regiones si el DNA cromosómico se corta primero con nucleasas de restricción que reconocen secuencias muy poco frecuentes (p. ej., una vez cada 10.000 o más pares de nucleótidos).

En los geles de agarosa o de poliacrilamida, las bandas de DNA serán invisibles a menos que el DNA esté marcado o teñido de alguna manera. Un método sensible de tinción del

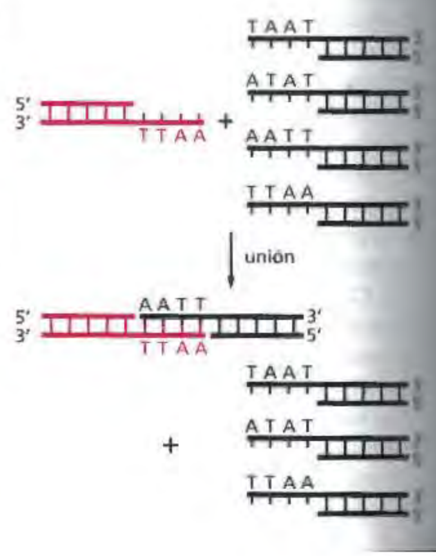


Figura 8–32 Las nucleasas de restricción producen fragmentos de DNA que se pueden unir fácilmente entre sí. Los fragmentos de DNA que tengan los mismos extremos cohesivos se pueden unir mediante apareamiento de bases complementarias entre sus extremos cohesivos, tal como se ilustra en la figura. En este ejemplo, los dos fragmentos de DNA que se unen entre sí fueron producidos por la nucleasa de restricción EcoRI, mientras que los otros tres fueron producidos por diferentes nucleasas de restricción que dieron lugar a diferentes extremos cohesivos (véase Figura 8–31). Los fragmentos con extremos romos, tales como los producidos por HpaI (véase Figura 8–31), pueden unirse también pero con mayor dificultad.

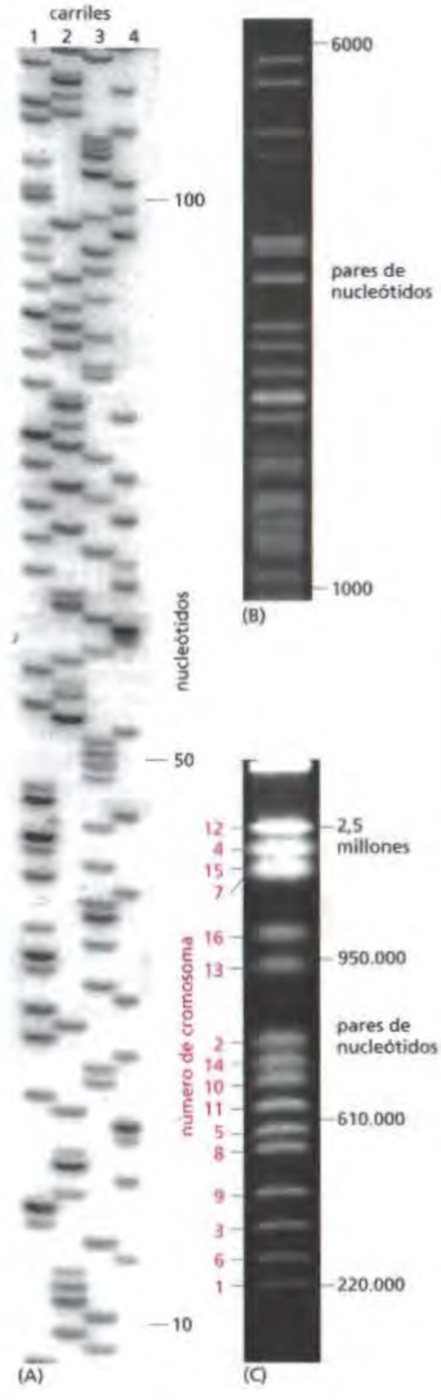


Figura 8-33 Técnicas de electroforesis en gel para separar moléculas de DNA en función de su tamaño. En los tres ejemplos que se presentan, la electroforesis va de arriba a abajo, de forma que las moléculas mayores de DNA –y por tanto las que se desplazan más despacio en el gel– están cerca de la parte superior del gel. (A) Gel de poliacrilamida de poros pequeños para fraccionar moléculas de DNA de cadena única. Las moléculas en el rango de tamaños de 10 a 500 nucleótidos pueden separarse unas de otras aunque la diferencia de tamaño sea de tan sólo un nucleótido. En este ejemplo, los cuatro carriles corresponden a los productos de cuatro reacciones diferentes de secuenciación de DNA. El DNA a secuenciar se ha replicado artificialmente a partir de un extremo fijo hacia un punto variable de paro, produciendo una serie de réplicas parciales de diferentes longitudes. (En la Figura 8-50 se explica cómo se obtiene este conjunto de réplicas parciales.) En el carril 1 se encuentran las réplicas parciales que terminan en G; en el carril 2, aquellas que terminan en A; en el carril 3, aquellas terminadas en T, y en el carril 4, aquellas que terminan en C. Debido a que las moléculas de DNA del experimento se encuentran marcadas radiactivamente, sus posiciones se pueden determinar mediante autorradiografía, como se muestra.
(B) Gel de agarosa de poros de tamaño medio para separar moléculas de DNA de doble hebra. Este método es más útil en el rango de tamaños comprendido entre 300 y 10.000 pares de nucleótidos. Estas moléculas de DNA son fragmentos de restricción producidos a partir del genoma de un virus bacteriano; se han detectado mediante la fluorescencia que emiten después de ser teñidas con el colorante bromuro de etidio. (C) Técnica de electroforesis en campo pulsante para separar en un gel de agarosa 16 cromosomas diferentes de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) cuyo tamaño oscila entre 220.000 y 2,5 millones de pares de nucleótidos. El DNA se ha teñido como en (B). Sobre este tipo de geles se pueden separar moléculas de DNA de tamaños tan grandes como 10^7 pares de nucleótidos. (A, por cortesía de Leander Lauffer y Peter Walter; B, por cortesía de Ken Kreuzer; C, de D. Vollrath y R.W. Davis, *Nucleic Acids Res.* 15:7865-7876, 1987. Con la autorización de Oxford University Press.)

DNA consiste en ponerlo en contacto con el colorante *bromuro de etidio* que, cuando se ha unido al DNA, emite fluorescencia al ser expuesto a luz ultravioleta (Figuras 8-33B y C). Un método de detección aún más sensible que éste consiste en la incorporación de un radioisótopo a la molécula de DNA antes de la electroforesis; habitualmente se utiliza el ^{32}P, ya que puede ser incorporado en los fosfatos del DNA y emite partículas β muy energéticas que son fáciles de detectar por autorradiografía como se observa en la Figura 8-33. (Para una exposición del tema de los radioisótopos véase p. 601.)

Las moléculas purificadas de DNA se pueden marcar *in vitro* con radioisótopos o con marcadores químicos

Para añadir distintas marcas a las moléculas de DNA aisladas se utilizan fundamentalmente dos sistemas. En el primero, una DNA polimerasa copia el DNA en presencia de nucleótidos radiactivos (por lo general marcados con ^{32}P) o marcados químicamente (**Figura 8-34**A). De esta forma se generan "sondas de DNA" altamente marcadas para las reacciones de hibridación de ácidos nucleicos (véase más adelante). El segundo método utiliza la enzima polinucleótido quinasa de bacteriófago para transferir un solo fosfato marcado con ^{32}P desde el ATP hasta el extremo 5' de cada cadena de DNA (Figura 8-34B). Dado que la quinasa incorpora un solo átomo de ^{32}P en cada hebra de DNA, estas cadenas de DNA no son lo bastante radiactivas como para utilizarlas como sondas; pero como sólo están marcadas en uno de sus extremos, son muy útiles para otras aplicaciones incluyendo el estudio de las huellas del DNA (*footprinting*), tal como se ha explicado en el Capítulo 7.

Los métodos de marcaje radiactivo están siendo sustituidos por otros en los que se utilizan moléculas que pueden ser detectadas químicamente o mediante fluorescencia. Para conseguir estas moléculas de DNA no radiactivas, se utilizan precursores de nucleótidos modificados (Figura 8-34C). Una molécula de DNA marcada de esta forma puede unirse a su complementaria por hibridación, tal como se expone en la sección siguiente, y entonces ser detectada con un anticuerpo (u otro ligando) que reconocerá de forma específica su cadena lateral modificada (**Figura 8-35**).

La hibridación de ácidos nucleicos proporciona un método sensible para la detección de secuencias determinadas de nucleótidos

Cuando una solución acuosa de DNA se calienta a 100 °C o se expone a un pH muy alto (pH ≥ 13), se rompen las bases complementarias que mantienen unidas entre sí a las dos ca-

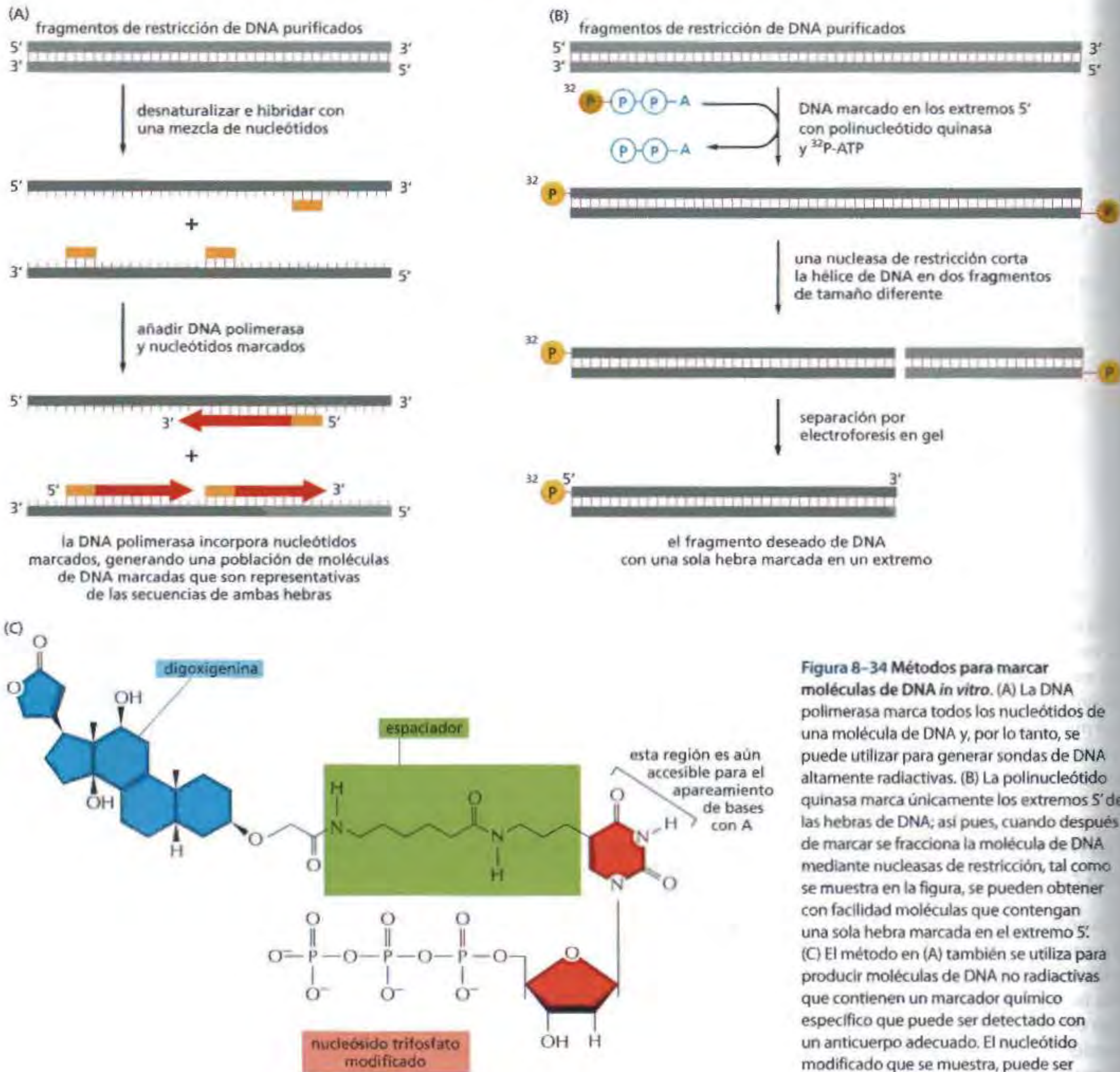


Figura 8-34 Métodos para marcar moléculas de DNA *in vitro*. (A) La DNA polimerasa marca todos los nucleótidos de una molécula de DNA y, por lo tanto, se puede utilizar para generar sondas de DNA altamente radiactivas. (B) La polinucleótido quinasa marca únicamente los extremos 5' de las hebras de DNA; así pues, cuando después de marcar se fracciona la molécula de DNA mediante nucleasas de restricción, tal como se muestra en la figura, se pueden obtener con facilidad moléculas que contengan una sola hebra marcada en el extremo 5'. (C) El método en (A) también se utiliza para producir moléculas de DNA no radiactivas que contienen un marcador químico específico que puede ser detectado con un anticuerpo adecuado. El nucleótido modificado que se muestra, puede ser incorporado al DNA por la DNA polimerasa, permitiendo que la molécula de DNA se puede utilizar como sonda y detectarse de forma eficiente. La base del nucleótido que se muestra es un análogo de la timina, en la que se ha reemplazado el grupo metilo en T con un espaciador unido al esteroide vegetal digoxigenina. Para visualizar la sonda, se utiliza un anticuerpo específico contra la digoxigenina que a su vez se encuentra unido a un marcador visible, como sería un colorante de tipo fluorescente. Otras moléculas, como por ejemplo la biotina, se pueden unir a los nucleótidos y se detectan de un modo similar a éste.

denas de la doble hélice, disociándose rápidamente en dos hebras separadas. Durante muchos años se consideró que este proceso, llamado *desnaturalización del DNA*, era irreversible. Sin embargo, en 1961 se descubrió que si se mantienen hebras complementarias de DNA a 65 °C durante un periodo prolongado, forman de nuevo una doble hélice (proceso denominado **hibridación** o *renaturalización del DNA*). Reacciones de hibridación similares a ésta se producen entre dos cadenas cualesquiera de ácido nucleico de una sola hebra (DNA/DNA, RNA/RNA o RNA/DNA) siempre que ambas cadenas tengan una secuencia de nucleótidos complementaria. Estas reacciones específicas de hibridación son ampliamente utilizadas para detectar y caracterizar secuencias nucleotídicas específicas tanto en moléculas de RNA como de DNA.

Las moléculas de DNA de cadena sencilla utilizadas para la detección de secuencias complementarias se conocen como **sondas**; estas moléculas contienen marcadores radiactivos o químicos para facilitar su detección, y pueden tener longitudes que van desde los quince hasta varios miles de nucleótidos. Las reacciones de hibridación mediante sondas

de DNA son tan sensibles y selectivas que pueden utilizarse para detectar secuencias complementarias cuya concentración sea incluso de una sola molécula por célula. Así, es posible determinar el número de copias de cualquier secuencia de DNA presente en una determinada muestra de DNA. Se puede utilizar esta misma técnica para buscar genes relacionados pero no idénticos, o para encontrar un gen de interés en un organismo cuyo genoma no haya sido secuenciado, por ejemplo, utilizando como sonda un fragmento de un gen conocido (**Figura 8–36**).

Alternativamente, las sondas de DNA pueden utilizarse en reacciones de hibridación con RNA en lugar de DNA, para detectar cuándo una célula está expresando un gen determinado. En este caso se hibrida la sonda de DNA, que contiene parte de la secuencia del gen, con RNA purificado a partir de la célula en cuestión, con el fin de determinar si el RNA celular contiene secuencias nucleotídicas complementarias al DNA de la sonda y, si es así, en qué cantidad. En métodos más elaborados, la sonda de DNA se trata con nucleasas específicas después de la hibridación, para determinar la región exacta de la sonda que se ha apareado con moléculas de RNA de la célula. De esta forma se pueden determinar los lugares de principio y final de la transcripción del RNA, así como los límites precisos de los intrones y de los exones de un gen (**Figura 8–37**).

En la actualidad, las posiciones de los límites intrón/exón se determinan a partir de la secuenciación del *DNA complementario* (cDNA), que representa los mRNA expresados por la célula y comparándolos con la secuencia del gen completo. Posteriormente en este capítulo se describirá con más detalle el método utilizado para la preparación de los cDNA desde los mRNA.

La hibridación de sondas de DNA con los RNA de la célula permite determinar si un gen particular está siendo o no transcrito; además, cuando la expresión de un gen cambia, es posible determinar si el cambio es debido a mecanismos transcripcionales o bien postranscripcionales (véase Figura 7–92). En sus inicios, estos estudios de la expresión génica se realizaban con una sonda de DNA por ensayo. En la actualidad, los *microchips de DNA* permiten el estudio simultáneo de cientos o miles de genes en un solo ensayo, como se describirá más adelante. La utilización de los métodos de hibridación está tan extendida en biología celular, que es difícil imaginar cómo podría estudiarse la estructura y la expresión de los genes sin ellos.



Figura 8–35 Hibridación *in situ* para poder localizar genes de forma específica en los cromosomas. Se han utilizado seis sondas diferentes para determinar la posición de sus respectivas secuencias de nucleótidos en el cromosoma 5 humano en metafase. Las sondas estaban marcadas químicamente y se han detectado mediante anticuerpos marcados con anticuerpos fluorescentes. Se muestran las dos copias del cromosoma 5 alineadas. Cada sonda detecta dos puntos en cada cromosoma dado que un cromosoma metafásico tiene su DNA replicado y por ello contiene dos hélices de DNA idénticas. (Cortesía de David C. Ward.)

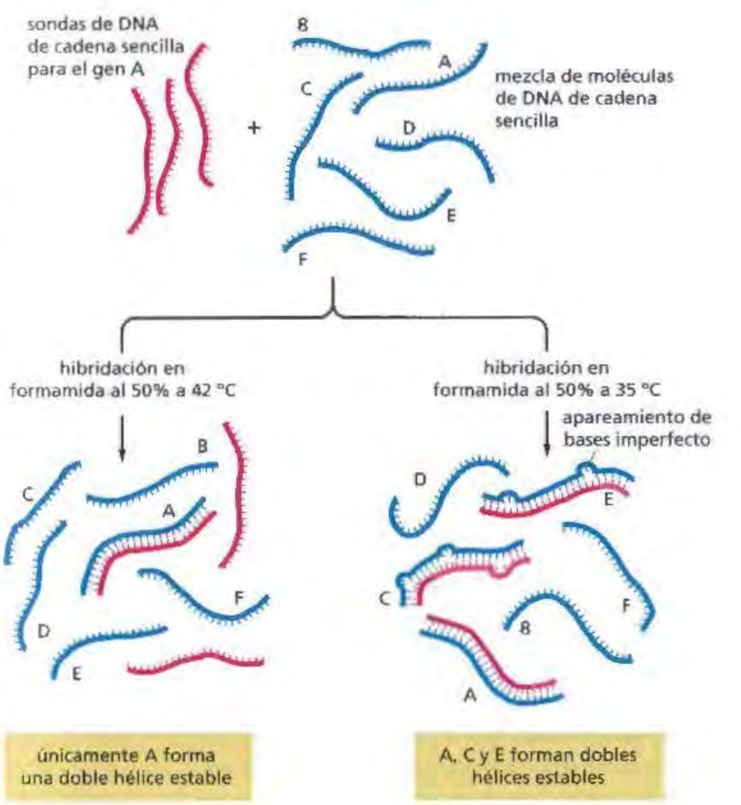


Figura 8–36 Diferentes condiciones de astringencia en la hibridación. Cuando sólo se desea un apareamiento idéntico con una sonda de DNA, se utilizan condiciones astringentes; la reacción de hibridación se mantiene unos cuantos grados por debajo de la temperatura a la que una hélice de DNA perfecta se desnaturaliza en el solvente utilizado (su *temperatura de fusión*), y, por tanto, todas las hélices imperfectas formadas son inestables. Cuando el objetivo consiste en encontrar moléculas de DNA con secuencias relacionadas, o idénticas, se utilizan condiciones menos restrictivas; la hibridación se realiza a una temperatura inferior que permite la formación de dobles hélices apareadas de forma imperfecta. Las condiciones de hibridación a baja temperatura pueden utilizarse para buscar genes que no sean idénticos al gen A pero que en cambio se encuentren relacionados con él (C y E, en el ejemplo de la figura).

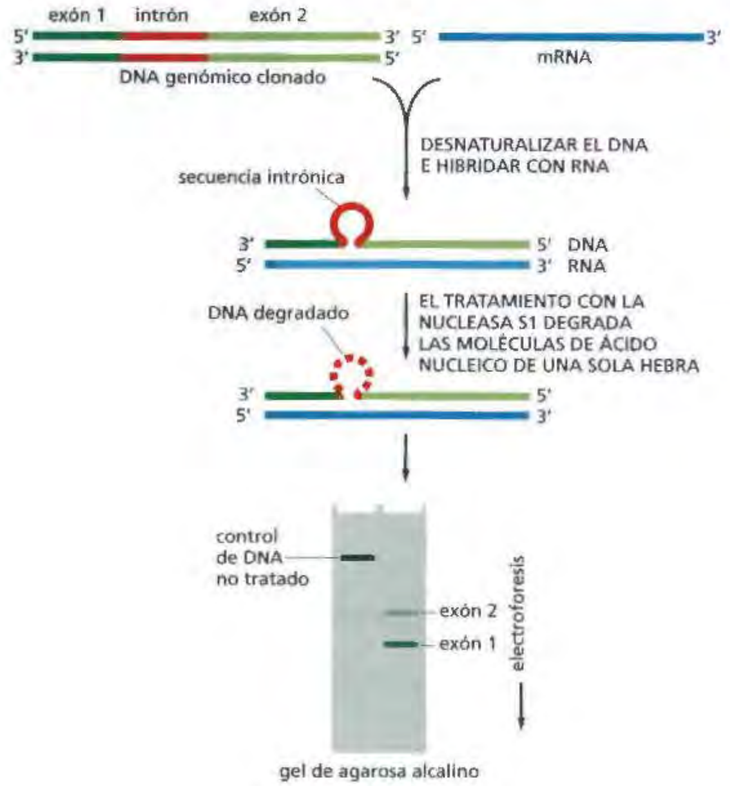


Figura 8–37 Utilización de la técnica de hibridación de ácidos nucleicos para determinar qué región de un fragmento clonado de DNA está presente en una molécula de mRNA. El método mostrado requiere la utilización de una nucleasa que, al hibridar el DNA con una cadena de RNA complementaria, únicamente corte la cadena de DNA en las regiones que no queden apareadas. Tal como se muestra, el método permite determinar las posiciones de los intrones en los genes eucariotas. En este tipo de análisis, la electroforesis de DNA se realiza en un gel de agarosa desnaturalizante, con lo que el DNA migra en forma de moléculas de cadena sencilla. El inicio y final de una molécula de RNA pueden determinarse utilizando métodos similares.

Las transferencias de tipo Northern y de tipo Southern facilitan la hibridación con moléculas de ácidos nucleicos separadas por electroforesis

A menudo las sondas de DNA se utilizan en combinación con la electroforesis en gel para detectar moléculas de ácidos nucleicos que tengan una secuencia complementaria a toda o a una parte de la sonda. Antes de llevar a cabo la reacción de hibridación, se separan por electroforesis las diferentes moléculas de RNA o de DNA de una mezcla, según su tamaño; podremos estar seguros de que la hibridación fue específica si la sonda se une a moléculas de un solo o de muy pocos tamaños. Además, la información obtenida respecto al tamaño puede ser muy valiosa en sí misma. Un ejemplo servirá para ilustrar este punto.

Supongamos que se desea determinar la naturaleza del defecto de un ratón mutante que produce cantidades demasiado bajas de albúmina, una proteína que normalmente segrega el hígado a la sangre en grandes cantidades. En primer lugar, habrá que recolectar muestras de tejido hepático idénticas de un ratón mutante y de uno normal (este último servirá de control); las células se disgregan con un detergente fuerte para inactivar las nucleasas, que en caso contrario podrían degradar los ácidos nucleicos. A continuación, se separa el RNA y el DNA de los otros componentes celulares: las proteínas presentes se desnaturalizan por completo y se eliminan mediante extracciones continuadas con fenol (un potente disolvente orgánico que es parcialmente miscible en agua), los ácidos nucleicos, que permanecen en la fase acuosa, se precipitan con alcohol para separarlos de las moléculas pequeñas de la célula. Entonces se separa el DNA del RNA aprovechando su diferente solubilidad en alcohol y se degrada cualquier ácido nucleico contaminante del tipo que no queremos estudiar, mediante tratamiento con enzimas altamente específicas, ya sea una RNAsa o una DNAsa. Los mRNA se separan del RNA total por retención en una columna cromatográfica que une de forma específica las colas de poli-A de los mRNA.

Para analizar los RNA que codifican la albúmina con una sonda de DNA, se utiliza una técnica llamada **transferencia de tipo Northern** (*Northern blotting*). Primero, las diferentes moléculas de RNA intacto, tanto de los hígados mutantes como de los normales, se separan en bandas mediante electroforesis en gel. Entonces, para hacer que las moléculas de RNA sean accesibles a las sondas de DNA, se hace una réplica del patrón de bandas de RNA del

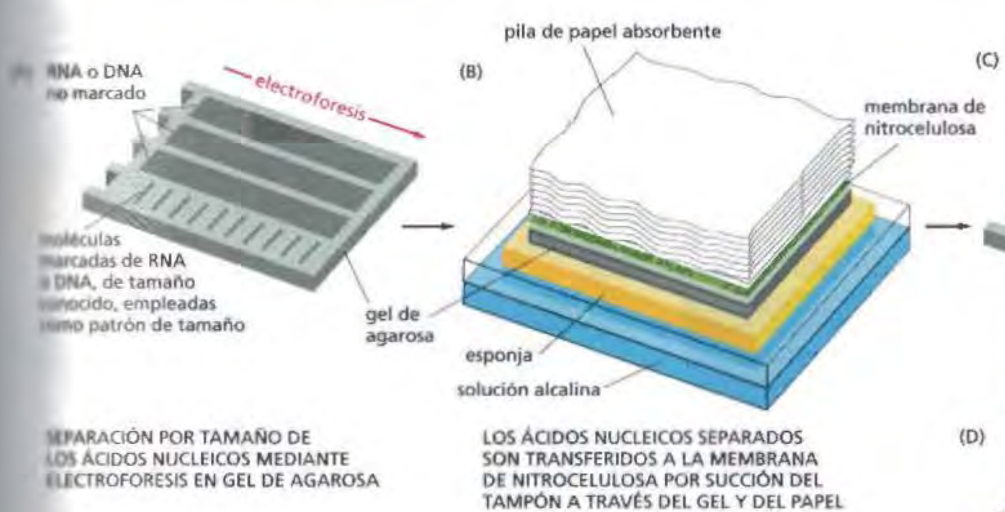




Figura 8-38 Detección específica de moléculas de RNA o de DNA mediante transferencia e hibridación. En el ejemplo presentado la sonda de DNA se detecta en función de su radiactividad. La utilización de sondas detectables por métodos químicos o fluorescentes también se encuentra ampliamente extendida (véase Figura 8-34). (A) Una mezcla de moléculas de RNA de cadena sencilla (transferencia de tipo Northern), o de fragmentos DNA de doble cadena, generados tras el tratamiento con nucleasas de restricción (transferencia de tipo Southern), se separan en función de su tamaño mediante electroforesis. (B) Sobre el gel se dispone una membrana de nailon o de nitrocelulosa; los fragmentos de DNA o de RNA separados se transfieren a la membrana por capilaridad. (C) La membrana de nitrocelulosa se retira con cuidado del gel. (D) La membrana, que contiene los ácidos nucleicos unidos, se coloca entonces en una bolsa sellada junto a una solución salina tamponada que contiene la sonda de DNA marcada radiactivamente. La membrana se expone a la sonda de DNA marcado durante un tiempo prolongado, en condiciones que favorecen la hibridación. (E) La membrana se retira de la bolsa y se lava intensamente, de forma que permanezcan unidas sólo aquellas moléculas de sonda marcada que se hayan hibridado con el RNA o el DNA inmovilizado en la membrana. Después de la autorradiografía, el DNA hibridado con la sonda aparece en forma de bandas en el film fotográfico. En el caso de la transferencia Southern, las dos hebras del DNA presentes en la membrana deben separarse previamente al proceso de hibridación; esto puede conseguirse exponiendo el DNA a condiciones alcalinas desnaturalizantes después de la electroforesis (no mostrado en la figura).

gel mediante la transferencia (*blotting*) de las moléculas fraccionadas de RNA a una hoja de nitrocelulosa o de papel de nailon. El papel se incuba con una solución que contiene la sonda de DNA marcada cuya secuencia corresponde en parte a la cadena molde que produce el mRNA de la albúmina. Las moléculas de RNA que se hibridan en el papel con la sonda de DNA marcada (por ser complementarias a parte de la secuencia normal del gen de la albúmina) se localizan detectando la sonda unida mediante autorradiografía o métodos químicos (**Figura 8–38**). El tamaño de las moléculas de RNA hibridadas se determina utilizando como referencia la migración de moléculas de RNA de tamaño conocido (patrones de RNA) que se someten a electroforesis junto a la muestra. De esta manera, se puede descubrir que las células hepáticas del ratón afectado fabrican mRNA de albúmina de tamaño normal y en cantidades normales, o también podría ocurrir que el mRNA de la albúmina se detectara en cantidades muy reducidas. Otra posibilidad sería que el mRNA de la albúmina mutante fuese anormalmente corto. En este caso, el gel transferido se podría volver a estudiar con sondas de DNA más selectivas que revelasen qué zona del RNA está ausente.

El método original de hibridación, llamado **transferencia de tipo Southern** (*Southern blotting*) analiza el DNA en vez del RNA. Se denominó de esta forma en reconocimiento a su inventor y se tomó como referencia en la nomenclatura de las técnicas de transferencia de tipo Northern y Western. En primer lugar, se corta el DNA aislado con nucleasas de restricción generando fragmentos que se puedan separar fácilmente. A continuación, los fragmentos de cadena doble se separan de acuerdo a su tamaño mediante electroforesis en gel y, mediante transferencia e hibridación, se identifican los fragmentos que son complementarios a la sonda de DNA, tal como se ha descrito para el caso del RNA (véase Figura 8–38). Para caracterizar la estructura del gen de la albúmina en el ratón mutante, se podría utilizar

una sonda de DNA específica para la albúmina y construir un *mapa de restricción* detallado de la región del genoma que codifica esta proteína. Este mapa consiste en un patrón de fragmentos del DNA que se produce por la acción de varias nucleasas de restricción. Sobre este mapa se puede determinar si el gen de la albúmina ha sido reordenado en los ratones afectados, por ejemplo, mediante la deleción o inserción de una secuencia corta de DNA; sin embargo, de este modo no es posible detectar las sustituciones de una sola base.

Los genes se pueden clonar utilizando bibliotecas de DNA

Cualquier fragmento de DNA se puede clonar. En biología molecular, el término **clonación de DNA** tiene un doble sentido. Por una parte se refiere, literalmente, a la acción de realizar copias idénticas de una molécula de DNA, es decir, a la amplificación de una secuencia concreta de DNA. Sin embargo, el término también se utiliza para describir el aislamiento de un fragmento de DNA (a menudo de un gen determinado) del resto del DNA de la célula, puesto que este aislamiento se ve facilitado en gran medida al realizar varias copias idénticas del DNA de interés. Como se ha indicado antes en este capítulo, la clonación, utilizada en el contexto de la biología del desarrollo, se refiere a la generación de muchas células genéticamente idénticas a partir de una célula inicial o incluso la generación de organismos idénticos desde un punto de vista genético. En todos los casos, la clonación es el acto de realizar copias genéticas idénticas. En esta sección, utilizaremos el término clonación (clonación de DNA o clonación génica) para referirnos a los métodos diseñados para generar muchas copias idénticas de un segmento de un ácido nucleico.

En su sentido genérico, la clonación de DNA puede realizarse de diferentes formas. La más sencilla supone la inserción de un fragmento particular de DNA en el genoma purificado de un elemento genético autorreplicativo, por lo general un virus o un plásmido. En un tubo de ensayo, por ejemplo, se puede unir un fragmento de DNA que contenga un gen humano con el cromosoma de un virus bacteriano; la nueva molécula de DNA recombinante podrá ser introducida en una bacteria, donde el fragmento de DNA insertado se replicará junto con el DNA vírico. Partiendo de una sola molécula de DNA recombinante que infecta a una bacteria, los mecanismos normales de replicación del virus pueden producir más de 10^{12} moléculas idénticas de DNA viral en menos de un día, amplificando por tanto el fragmento de DNA humano insertado en esta misma proporción. A los virus o plásmidos utilizados de este modo se les denomina *vectores de clonación* y se considera que el DNA insertado que propagan ha sido *clonado* en ellos.

Para clonar un gen se empieza construyendo una *biblioteca de DNA** –una colección de fragmentos de DNA clonado a partir de células, tejidos u organismos. Esta biblioteca incluye (probablemente) al menos un fragmento que contiene el gen de interés. La biblioteca puede construirse tanto con vectores víricos como plasmídicos y, en general, se mantiene en una población de células bacterianas. Los principios básicos de los métodos utilizados para clonar genes son los mismos para cualquier tipo de vector utilizado, aunque pueden diferir en algunos detalles. En la actualidad, la clonación se realiza sobre todo con vectores plasmídicos.

Los **vectores plasmídicos** utilizados para la clonación de genes son pequeñas moléculas circulares de DNA de doble cadena, derivados de grandes plásmidos que aparecen de forma natural en bacterias. Por lo general suponen una pequeña parte del total del DNA de la célula huésped, pero se pueden separar fácilmente gracias a su menor tamaño respecto a las moléculas de DNA cromosómicas, las cuales son mucho mayores y sedimentan por centrifugación. Para utilizar los plásmidos circulares de DNA como vectores de clonación, una vez purificados se cortan con una nucleasa de restricción para generar moléculas lineales. El DNA genómico de la célula que se va a utilizar en la construcción de la genoteca también es cortado con la misma nucleasa de restricción; los fragmentos de restricción resultantes (entre los que se encuentran los que contienen el DNA que va a ser clonado) se añaden a los plásmidos cortados y se cierran, formando moléculas circulares de DNA recombinante. Estas moléculas recombinantes, que contienen insertos de DNA ajeno, se unen covalentemente mediante la enzima DNA ligasa (**Figura 8–39**).

El siguiente paso en la preparación de la genoteca consiste en introducir las moléculas circulares de DNA recombinante en bacterias temporalmente permeables al DNA; se dice

* No es correcto llamarla "librería" de DNA, un error muy habitual debido a una traducción literal del inglés "library". *(N. de los T.)*

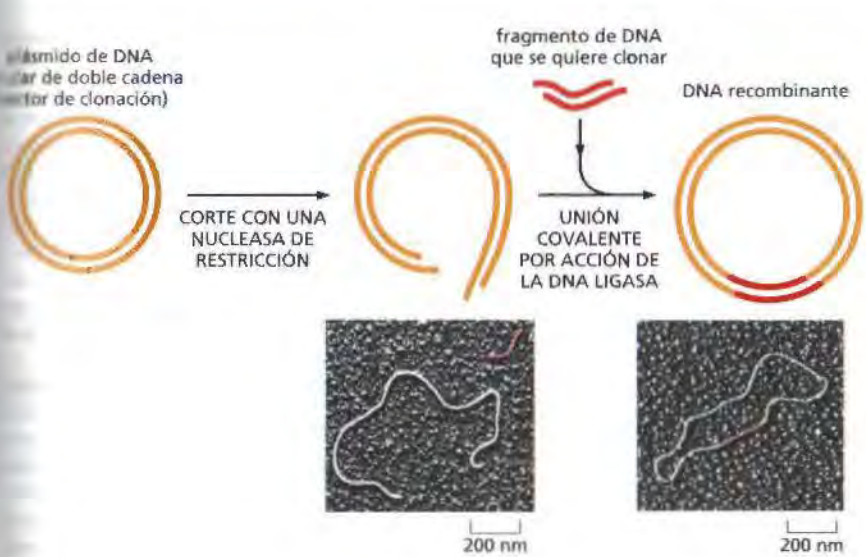


Figura 8–39 Inserción de un fragmento de DNA en un plásmido bacteriano mediante la enzima DNA ligasa. El plásmido se abre realizando un corte con una nucleasa de restricción (en este caso, una que produce extremos cohesivos), y se mezcla con la DNA ligasa, ATP y el fragmento de DNA que se desea clonar (el cual ha sido preparado con la misma nucleasa de restricción). Los extremos cohesivos se aparean entre sí y la DNA ligasa sella los cortes de la cadena de DNA, produciendo una molécula recombinante de DNA completa. (Micrografías cortesía de Huntington Potter y David Dressler.)

que estas células han sido *transfectadas* con el plásmido. A medida que estas células van creciendo y dividiéndose –duplican su número cada 30 minutos– los plásmidos recombinantes también se van replicando y produciendo un número enorme de copias de DNA circulares que contienen el DNA ajeno (**Figura 8–40**). Muchos plásmidos bacterianos transportan genes que les confieren resistencia a los antibióticos (mencionado en el Capítulo 24), una propiedad que se utiliza para seleccionar las células transfectadas con éxito; si la bacteria se hace crecer en presencia del antibiótico, solamente sobrevivirán las células que contengan los plásmidos. Cada una de las bacterias que fue transfectada contendrá, en general, un fragmento de DNA insertado diferente; este inserto será heredado por todas las células de la progenie de la bacteria, que formarán una pequeña colonia en una placa de cultivo.

Los plásmidos han sido utilizados durante años para clonar fragmentos de DNA de entre 1000 y 30.000 pares de bases. La clonación de fragmentos de DNA de mayor tamaño tenía una mayor dificultad dado que son más difíciles de manipular. Los investigadores empezaron entonces a utilizar *cromosomas artificiales de levadura* (*YAC: yeast **a**rtificial **c**hromosomes*) que podían transportar fragmentos largos de DNA (**Figura 8–41**). Actualmente se utilizan unos vectores plasmídicos nuevos, basados en el plásmido F de *E. coli*, que aparece de forma natural en esta bacteria, para clonar fragmentos de DNA de entre 300.000 y 1 millón de pares de bases. A diferencia de los vectores bacterianos de menor tamaño, el plásmido F –y su derivado, el **cromosoma artificial de bacteria** (**BAC**: ***b**acterial **a**rtificial **c**hromosome*)– sólo presentan una o dos copias por célula de *E. coli*. El hecho de que el número de copias de los BAC sea bajo contribuye a su capacidad para mantener estables grandes secuencias de DNA clonado: al existir pocos BAC en la célula, es menos probable que los fragmentos de DNA clonados queden fragmentados por una recombinación con secuencias procedentes de otras copias del plásmido. Dada su estabilidad, su capacidad para aceptar grandes insertos de DNA y su fácil manejo, los BAC se han convertido en los vectores preferidos para generar bibliotecas de DNA de organismos complejos, incluyendo aquellas que representan los genomas de humano y de ratón.



Figura 8–40 Amplificación de fragmentos de DNA insertados en un plásmido. Con el objetivo de producir gran cantidad del DNA de interés, el plásmido recombinante de DNA de la Figura 8-39, se introduce en una bacteria por transfección, donde podrá ser replicado varios millones de veces a medida que la bacteria se vaya multiplicando.

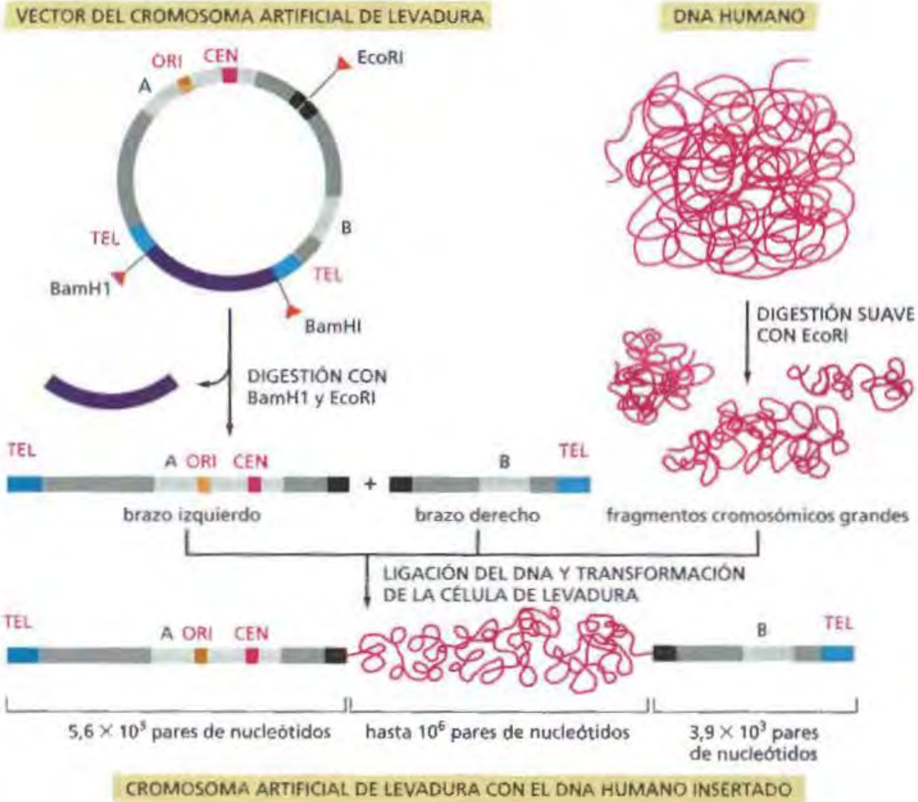


Figura 8–41 Construcción de un cromosoma artificial de levadura (YAC). Los vectores de tipo YAC permiten clonar moléculas de DNA que tienen gran tamaño. TEL, CEN y ORI son respectivamente las secuencias del telómero, centrómero y origen de la replicación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Todas ellas son necesarias para propagar el YAC. BamHI y EcoRI son los lugares donde las correspondientes nucleasas de restricción cortan la doble hélice de DNA. Las secuencias señaladas como A y B codifican enzimas que actúan como marcadores selectivos y permiten la rápida purificación de aquellas células de levadura que hayan adquirido el cromosoma artificial. Puesto que las bacterias se dividen más rápidamente que las levaduras, la mayoría de los proyectos de clonación a gran escala actualmente utilizan *E. coli* para amplificar el DNA. (Adaptado de D.T. Burke, G.F. Carle y M.V. Olson, *Science* 236:806-812, 1987. Con la autorización de la AAAS.)

Dos tipos de bibliotecas de DNA cubren diferentes propósitos

El procedimiento de cortar el genoma completo de una célula mediante una nucleasa de restricción y clonar cada fragmento, tal como se acaba de describir, produce una gran cantidad de fragmentos de DNA –del orden de un millón para un genoma de una célula de mamífero. Los fragmentos se distribuyen entre los millones de colonias diferentes de células transfectadas. Cuando no se trabaja con plásmidos típicos sino con BAC, la inserción de fragmentos mayores permite cubrir el genoma completo con un menor número de colonias transfectadas. En ambos casos, cada una de estas colonias estará compuesta por células clónicas derivadas de una sola célula antecesora y, por tanto, contendrá varias copias de una zona concreta del genoma fragmentado (**Figura 8–42**). Se dice que un plásmido como éste contiene un **clon de DNA genómico**; la colección completa de plásmidos se denomina una **biblioteca de DNA genómico**. Sin embargo, debido a que el DNA genómico se ha cortado al azar en pequeños fragmentos, únicamente algunos de estos fragmentos contendrán genes enteros. Muchos de los clones de DNA genómico obtenidos del DNA de una célula eucariota superior contendrán DNA no codificante, el cual, como se vio en el Capítulo 4, constituye la mayor parte del DNA de estos genomas.

Una estrategia alternativa consiste en iniciar el proceso de clonación seleccionando las secuencias de DNA que se transcriben a RNA y que, por tanto, probablemente corresponden a genes. Esto se realiza mediante la extracción del mRNA de las células y, a continuación, haciendo una copia de *DNA complementario (cDNA)* de cada una de las moléculas de mRNA presentes. La reacción está catalizada por la enzima transcriptasa inversa de retrovirus, la cual sintetiza una cadena complementaria de DNA sobre un molde de RNA. Las moléculas de cDNA de una sola cadena sintetizadas por la transcriptasa inversa se transforman en cDNA de doble cadena mediante la DNA polimerasa, se insertan en vectores víricos o plasmídicos, y se clonan (**Figura 8–43**). Cada uno de los clones obtenidos de esta forma se



Figura 8–42 Construcción de una biblioteca de DNA genómico humano. Una biblioteca genómica suele guardarse como un conjunto de bacterias, cada una de las cuales contiene un fragmento diferente de DNA humano. Para simplificar, se muestra en la figura la clonación de unos cuantos fragmentos representativos (*señalados con diferentes colores*). En realidad, los fragmentos de DNA de color *gris* también se clonarían.

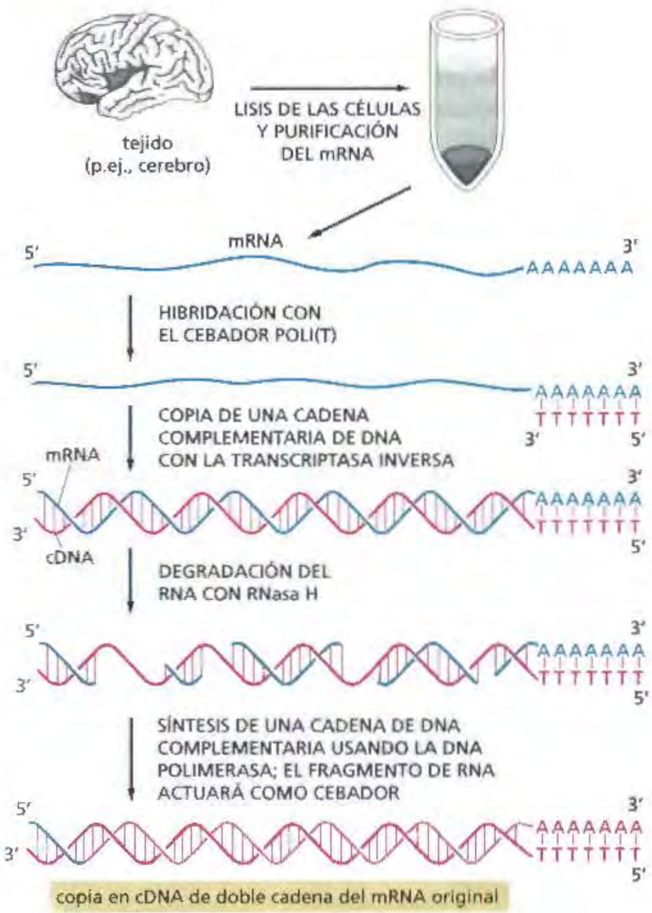


Figura 8–43 Síntesis de cDNA. Se extrae el mRNA total de un determinado tejido y se realizan copias a DNA (cDNA) mediante la enzima transcriptasa inversa (véase p. 320). Para simplificar, sólo se ilustra la copia de uno de estos mRNA a cDNA. Un oligonucleótido corto complementario en la cola de poli-A del extremo 3' del mRNA (descrito en el Capítulo 6), se hibrida en primer lugar al RNA, actuando de cebador para la transcriptasa inversa; esta enzima copiará el RNA a su cadena complementaria de DNA, formando, por tanto, una doble hélice híbrida DNA/RNA. El tratamiento de este híbrido DNA/RNA con la RNasa H (véase Figura 5-12) generará cortes y deleciones en la cadena de RNA. Entonces, el cDNA de cadena sencilla restante podrá ser copiado a doble cadena de DNA mediante la enzima DNA polimerasa; el fragmento del mRNA original actuará como cebador para esta reacción de síntesis, tal como se muestra en la figura. Dado que la DNA polimerasa utilizada para sintetizar la segunda cadena de DNA puede sintetizar DNA a partir de las moléculas de RNA unidas, el fragmento de RNA apareado al extremo 3' de la primera cadena de DNA actuará normalmente como cebador en la síntesis de la segunda cadena; este RNA será degradado en posteriores pasos del proceso de clonación. Como resultado de todo este proceso, a menudo la biblioteca de cDNA no tiene las secuencias de los extremos 5' de las moléculas originales de mRNA.

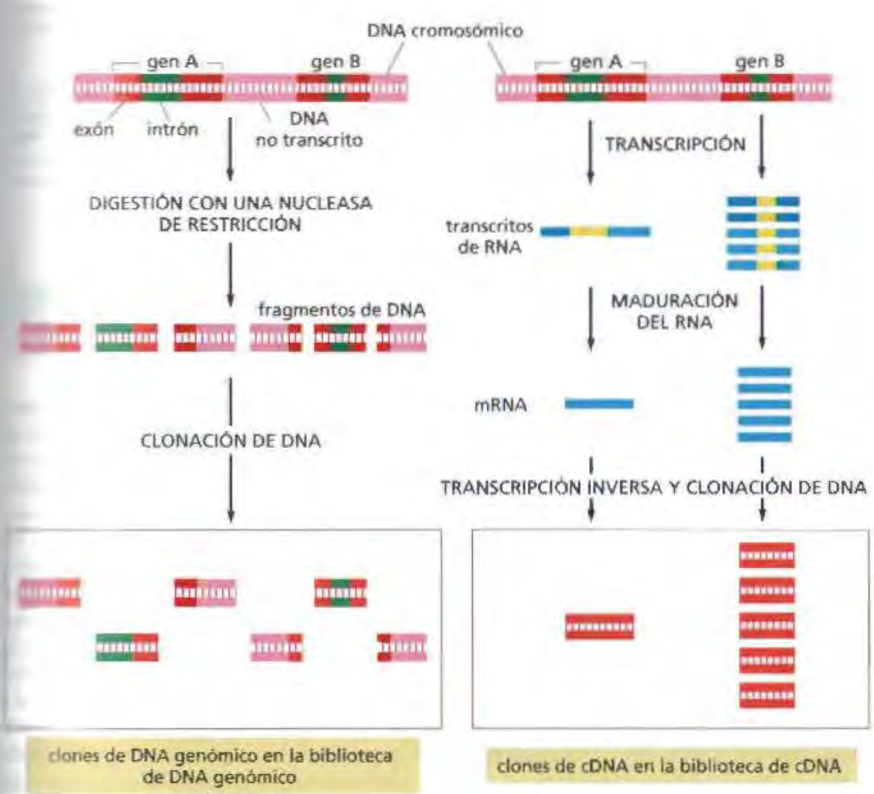


Figura 8–44 Diferencias entre clones de cDNA y clones genómicos derivados de la misma región de DNA. En este ejemplo, el gen A se transcribe muy poco mientras que el gen B lo hace frecuentemente; ambos genes contienen intrones (*verde*). En la biblioteca de DNA genómico, tanto los intrones como el DNA no transcrito (*rosa*) están incluidos en los clones. La mayoría de estos clones contienen, como mucho, una parte de la secuencia codificante del gen (*rojo*). En los clones de cDNA, las secuencias intrónicas (*amarillo*) han sido eliminadas durante la maduración del mRNA (*azul*) y, por tanto, cada clon presenta una secuencia codificante continua. Puesto que el gen B se transcribe más que el gen A en las células en las que se obtuvo la biblioteca de cDNA, este gen se encuentra mucho más representado en la biblioteca que el gen A. En cambio, en la biblioteca de DNA genómico A y B, los dos genes se encuentran, en principio, representados por igual.

denomina un **clon cDNA**, y la colección completa de clones derivados de una preparación de mRNA constituye una **biblioteca de cDNA**.

Existen importantes diferencias entre los clones de DNA genómico y los clones de cDNA, tal como se ilustra en la **Figura 8–44**. Los clones genómicos representan una muestra al azar de todas las secuencias de DNA de un organismo y, salvo muy raras excepciones, serán iguales independientemente del tipo celular utilizado para prepararlos. Por el contrario, los clones cDNA sólo contienen las regiones del genoma que se han transcrito a mRNA. Como las células de diferentes tejidos contienen diferentes juegos de moléculas de mRNA, se obtendrá una biblioteca de cDNA diferente en función del tipo celular utilizado para su construcción.

Los clones cDNA contienen secuencias codificantes continuas

La utilización de una biblioteca de cDNA para la clonación de genes tiene varias ventajas. En primer lugar, algunas células especializadas producen grandes cantidades de determinadas proteínas. En este caso, el mRNA que codifica una determinada proteína se produce en un exceso tal, que la biblioteca de cDNA preparada a partir de estas células estará muy enriquecida en las moléculas de cDNA que codifican esa proteína y será más sencillo identificar el clon deseado en la biblioteca (véase Figura 8–44). Por ejemplo, la hemoglobina se fabrica en grandes cantidades en los eritrocitos (células rojas de la sangre) en desarrollo; por ello los genes de las globinas fueron de los primeros en ser clonados.

La característica más importante de los clones cDNA es que contienen la secuencia ininterrumpida de un gen. Como se ha indicado frecuentemente los genes eucariotas consisten en pequeñas secuencias cortas de DNA codificante (exones) separadas por largas regiones de DNA no codificante (intrones); la producción del mRNA supone la eliminación de las secuencias no codificantes del transcrito de RNA inicial y la unión entre sí de todas las secuencias codificantes. Ni las células bacterianas ni las levaduras realizan estas modificaciones sobre el RNA producido a partir de un gen de una célula eucariota. Así pues, tanto si la intención del proceso de clonación estriba en deducir la secuencia de aminoácidos de una proteína a partir de la del DNA, como en producir grandes cantidades de la proteína expresando el gen clonado en una bacteria o en una levadura, es mucho mejor partir del cDNA. Las bibliotecas de cDNA tienen un uso adicional: como se menciona en el Capítulo 7, muchos mRNA humanos, o procedentes de otros organismos complejos, son mRNA procesados alternativamente y una biblioteca cDNA representa a menudo muchos, si no todos, los mRNA procesados de este modo pertenecientes a una célula o tejido en concreto.

Las bibliotecas genómicas y las bibliotecas de cDNA constituyen recursos inagotables muy utilizados en investigación. En la actualidad muchas de estas bibliotecas también son asequibles comercialmente.

Los genes pueden ser amplificados selectivamente mediante una reacción de polimerización en cadena (PCR)

Actualmente se dispone de tantas secuencias genómicas, que los genes pueden ser clonados de forma directa sin necesidad de construir primero bibliotecas de DNA. Una técnica denominada **reacción en cadena de la polimerasa** (**PCR**: *polymerase chain reaction*) hace posible esta clonación rápida. La técnica de PCR permite amplificar más de mil millones de veces un DNA obtenido a partir de una región seleccionada de un genoma, "purificando" de forma eficiente este DNA del DNA genómico restante.

Mediante métodos químicos se sintetizan dos oligonucleótidos de DNA, seleccionados para flanquear la secuencia de nucleótidos deseada del gen. Estos oligonucleótidos se utilizan como cebadores para la síntesis de DNA sobre cadenas de una sola hebra generadas al desnaturalizar el DNA por calentamiento. El DNA recién sintetizado es el producto de la reacción *in vitro* de una DNA polimerasa purificada y los cebadores acaban quedando en los extremos 5' de los fragmentos de DNA sintetizados (**Figura 8–45**A).

El primer ciclo de síntesis de DNA no produce nada especial; la verdadera potencia del método de PCR se revela sólo después de repetir varias veces el proceso de síntesis de DNA. Cada ciclo duplica la cantidad de DNA sintetizada en el ciclo anterior. Puesto que cada ciclo de reacción requiere un breve calentamiento para separar las dos cadenas del DNA genómico de doble hélice, la técnica depende de la utilización de una DNA polimerasa especial, aislada de una bacteria termófila, que es mucho más estable a temperaturas elevadas que la

polimerasa común, de modo que no se desnaturaliza por calentamientos repetidos. Con cada ciclo de síntesis de DNA, los nuevos fragmentos generados actúan, a su vez, de molde, y en pocos ciclos el producto predominante es un único tipo de fragmento de DNA cuya longitud corresponde a la distancia entre los dos cebadores originales (véase Figura 8–45B).

La amplificación efectiva del DNA requiere en la práctica de unos 20-30 ciclos de reacción, en los que los productos de cada ciclo actúan de moldes de DNA para el ciclo siguiente -de aquí el término "reacción en cadena". Cada ciclo sólo requiere aproximadamente 5 minutos y el proceso completo es fácilmente automatizable. Por tanto, el método de PCR permite la clonación de un fragmento de DNA en un "sistema libre de células" en pocas horas, comparado con el proceso estándar de clonación que requiere varios días. Esta técnica se utiliza de forma rutinaria para clonar directamente el DNA de genes de interés -a partir tanto de DNA genómico como de mRNA purificado de células (**Figura 8–46**).

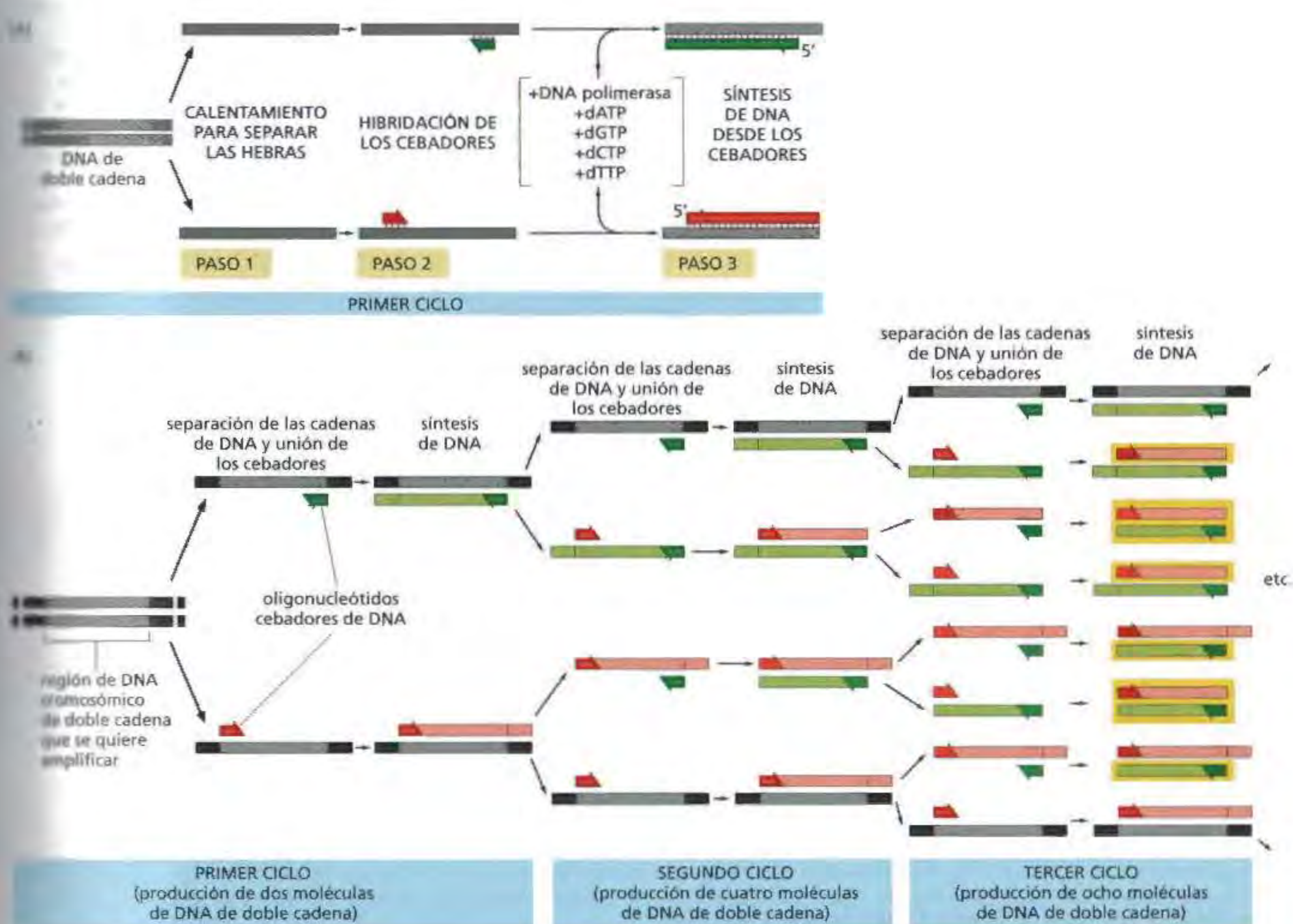


Figura 8–45 Amplificación de DNA utilizando la técnica PCR. <TACG> El conocimiento de la secuencia de DNA que se desea amplificar permite diseñar dos oligonucleótidos sintéticos de DNA. Uno de ellos es complementario de la secuencia de una de las cadenas de la doble hélice de DNA y el otro de la secuencia de la otra cadena, pero en los extremos opuestos de la región que se desea amplificar. Estos oligonucleótidos actúan como cebadores de la síntesis in vitro de DNA y determinan el segmento de DNA que será amplificado; el proceso de síntesis se realiza utilizando la enzima DNA polimerasa. (A) La PCR parte de una molécula de DNA de doble cadena; cada ciclo de reacción empieza con un corto calentamiento de la muestra para separar las dos cadenas de DNA (paso 1). Tras la separación de las cadenas, el proceso de enfriamiento del DNA en presencia de un exceso de los dos cebadores permite que éstos se hibriden con sus secuencias complementarias de ambas hebras de DNA (paso 2). Esta mezcla se incuba entonces con la DNA polimerasa y los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato, iniciándose la síntesis de DNA a partir de los dos cebadores (paso 3). El ciclo completo se repite de nuevo, calentando la muestra para separar las cadenas de DNA recién sintetizadas. (B) Puesto que el proceso se realiza una y otra vez, los nuevos fragmentos sintetizados actúan a su vez de moldes y en unos cuantos ciclos el DNA predominante es idéntico, e incluye la secuencia delimitada por los dos cebadores iniciales. Del DNA presente al inicio del proceso, sólo la secuencia delimitada por los cebadores se ve amplificada, dado que no existen cebadores unidos a ningún otro punto de la cadena de DNA. En el ejemplo ilustrado en (B), tres ciclos de reacción dan lugar a 16 cadenas de DNA, 8 de las cuales (*recuadradas en amarillo*) tienen la misma longitud y corresponden exactamente a una u otra cadena de la secuencia original, marcada en *gris* en la parte izquierda de la figura; la otra cadena contiene DNA extra en la región 3', el cual es replicado en los primeros ciclos. Después de cuatro ciclos más, 240 de las 256 cadenas de DNA corresponden exactamente a la secuencia original señalada en color *gris* y, tras unos cuantos ciclos más, casi todas las cadenas de DNA tienen esta misma longitud.

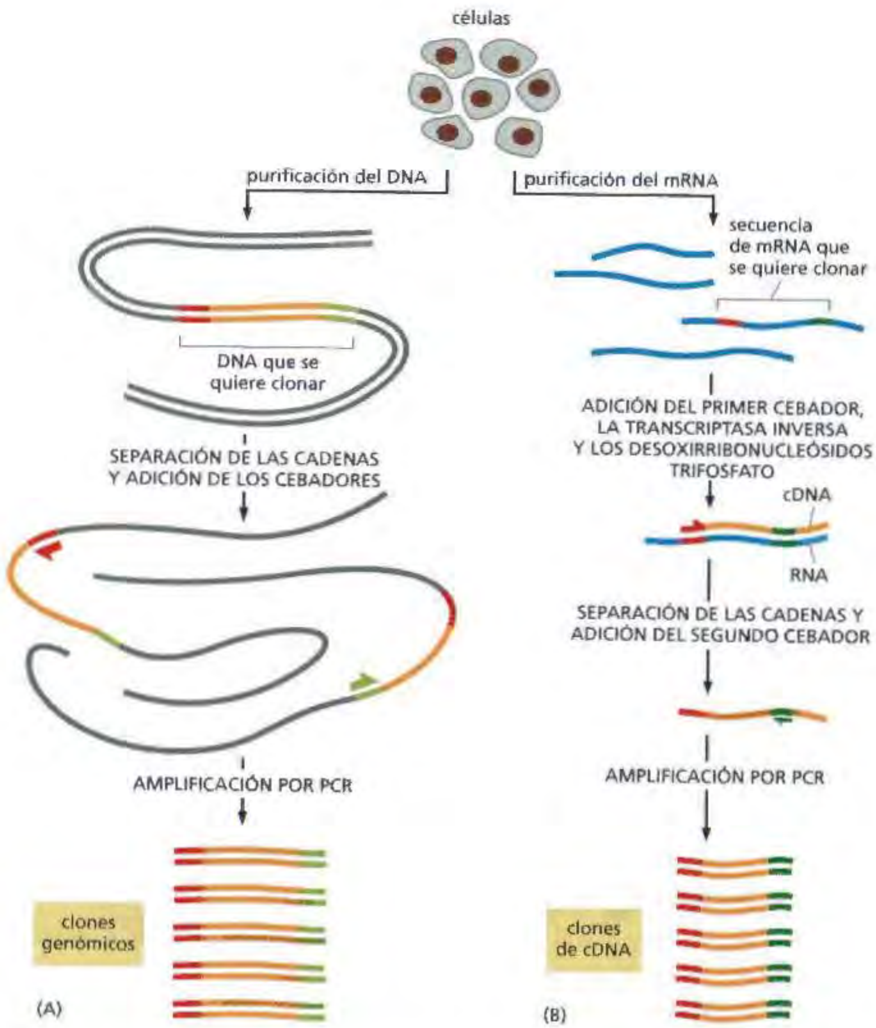


Figura 8–46 Utilización de la PCR para obtener un clon genómico o de cDNA. (A) Para obtener un clon genómico utilizando la técnica de PCR, en primer lugar se purifica el DNA cromosómico de las células. Entonces se añaden los cebadores, que flanquean la región de DNA que se desea clonar y se realizan varios ciclos de reacción (véase Figura 8–45). Dado que sólo se amplifica el DNA localizado entre (e incluyendo) los cebadores, la PCR permite obtener selectivamente regiones cortas de DNA cromosómico en forma pura. (B) La obtención de un clon de cDNA de un gen determinado utilizando la técnica de PCR, empieza con la purificación del mRNA de las células. Se añade entonces el primer cebador a la población de mRNA y, mediante la transcriptasa inversa, se realiza una copia complementaria de DNA. La adición de un segundo cebador permite amplificar la molécula de cadena sencilla de DNA mediante varios ciclos de PCR, tal como se muestra en la Figura 8–45. Para ambos tipos de clonación, se debe conocer de antemano, al menos, la secuencia de nucleótidos de una parte de la región que se desee clonar.

El método PCR es extremadamente sensible; es posible detectar una sola molécula de DNA en una muestra. De una forma similar se pueden analizar trazas de RNA, transformando este RNA en secuencias de DNA mediante la acción de la transcriptasa inversa. La técnica de clonación mediante PCR está sustituyendo con rapidez a la de transferencia de tipo southern para el diagnóstico de enfermedades genéticas y para la detección de bajos niveles de infección vírica. También constituye una técnica prometedora para la medicina forense, ya que permite analizar pequeñas cantidades de sangre o de otros tejidos –tan pequeñas como una sola célula– e identificar a la persona de la que procede por su "huella dactilar" genética (**Figura 8–47**).

Las células se utilizan como fábricas para producir proteínas específicamente

La inmensa mayoría de los millares de proteínas diferentes de una célula eucariota, incluidas algunas proteínas con funciones de vital importancia, se hallan presentes en cantidades muy reducidas. Resulta muy difícil, cuando no imposible, obtener más de unos cuantos miligramos de material puro de la mayoría de estas proteínas minoritarias. Una de las contribuciones más trascendentales de la clonación del DNA y de la ingeniería genética a la biología celular es que han hecho posible la producción en grandes cantidades de cualquiera de las proteínas celulares.

Para producir grandes cantidades de la proteína de interés en células vivas, se utilizan **vectores de expresión** (**Figura 8–48**). Generalmente estos vectores son plásmidos diseñados para producir una gran cantidad de mRNA estable, que puede traducirse a proteína de forma eficiente en la célula transfectada, ya sea una bacteria, una levadura o una célula de insecto o de mamífero. Para prevenir la interferencia de la proteína exógena con el propio

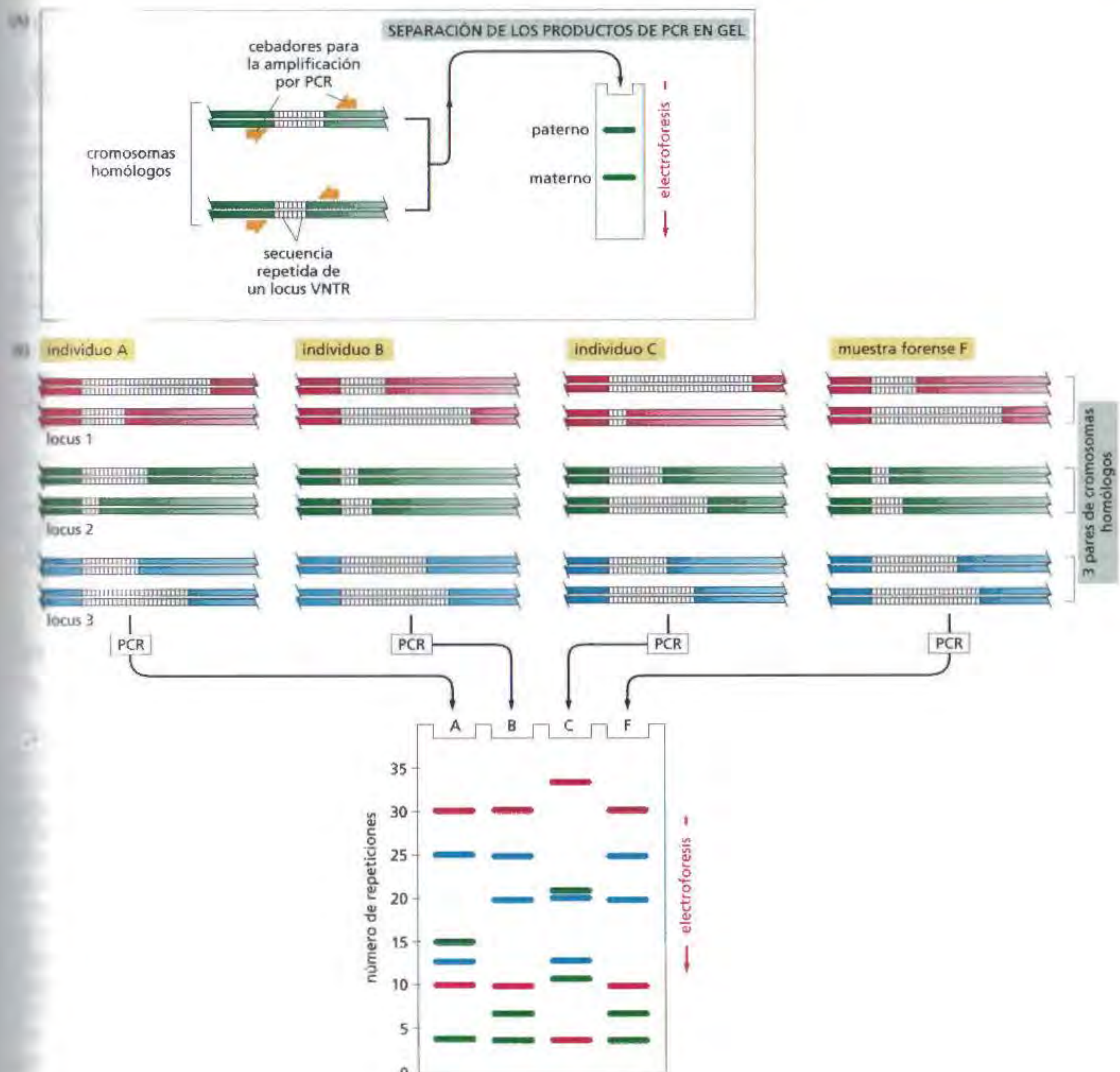


Figura 8–47 Utilización de la PCR en medicina forense. (A) Las secuencias de DNA responsables de la variabilidad en la que se basa este análisis contienen series de secuencias cortas repetidas, tales como CACACA..., y se encuentran en varias posiciones (loci) del genoma humano. En la población, el número de repeticiones en cada serie puede ser muy variable, oscilando entre 4 y 40 en individuos diferentes. A una serie de nucleótidos repetidos de este tipo se la denomina secuencia *microsatélite hipervariable* –también conocida como secuencia VNTR (***v****ariable* ***n****umber of* ***t****andem* ***r****epeat*; número variable de repetición en tándem). Debido a la variabilidad de estas secuencias en cada locus, por lo general cada individuo hereda una variante diferente de su padre y de su madre; por tanto, normalmente dos individuos no emparentados no tienen la misma pareja de secuencias. El análisis por PCR utilizando cebadores que flanquean el locus produce un par de bandas de DNA amplificado para cada individuo: una de ellas representa la variante materna y la otra la paterna. La longitud del DNA amplificado y, por tanto, la posición de la banda obtenida tras la electroforesis depende del número exacto de repeticiones en el locus. (B) En el ejemplo esquemático mostrado, se analizan los tres mismos loci de secuencias VNTR (que requieren tres pares diferentes de oligonucleótidos cebadores especialmente seleccionados) de tres individuos sospechosos (individuos A, B y C); después de la electroforesis en gel de poliacrilamida se obtienen seis bandas de DNA para cada individuo. Aunque algunos individuos presentan bandas en común, el patrón global es bastante característico de cada uno de ellos. Por lo tanto, el patrón de bandas sirve como una "huella digital" que permite identificar a cada individuo de forma casi exclusiva. El cuarto carril (F) contiene los productos de la misma reacción llevada a cabo con una muestra forense. El material de partida en esta aplicación concreta de la PCR puede ser un solo cabello o una pequeña muestra de sangre dejados en la escena del crimen. Cuando se examina la variabilidad existente entre individuos utilizando entre 5 a 10 loci VNTR diferentes, las posibilidades de que dos individuos al azar compartan el mismo patrón genético pueden ser de 1 entre 10 mil millones. En el caso mostrado, los individuos A y C pueden ser descartados para posteriores interrogatorios, en tanto que el individuo B parece un claro sospechoso del crimen cometido. Actualmente se utiliza una aproximación similar para las determinaciones de paternidad.



Figura 8–48 Producción de grandes cantidades de una proteína a partir de una secuencia de DNA codificante clonada en un vector de expresión e introducido en células. Se construye un vector plasmídico que contiene un promotor de alta actividad; este promotor es responsable de la producción de mRNA, en cantidades anormalmente elevadas, a partir de un gen codificante adyacente insertado en el vector plasmídico. Dependiendo de las características del vector de clonación, el vector se introduce en células de bacteria, levadura, insecto o mamífero, en las que el gen insertado se transcribe y traduce a proteína de forma eficiente.

crecimiento de la célula transfectada, a menudo el vector de expresión se diseña de modo que la síntesis del RNA y de la proteína exógena puede retrasarse hasta poco antes de la recolección de las células (**Figura 8–49**).

La proteína de interés se produce en el interior de la célula, por lo que deberá ser purificada del resto de las proteínas celulares del huésped mediante cromatografía tras lisar las células; ahora bien, al ser una de las proteínas más abundantes del lisado celular (a menudo un 1-10% del total de proteína celular), su purificación se consigue fácilmente en unas cuantas etapas. Muchos vectores de expresión han sido diseñados para incorporar una etiqueta molecular a la proteína expresada -una zona rica en residuos de histidina o una pequeña proteína marcadora- lo que facilita su purificación por cromatografía de afinidad, como se describió anteriormente (véase Figura 8–16). En la actualidad, disponemos de numerosos vectores de expresión, cada uno de ellos diseñado para que actúe en el tipo celular en el que queremos producir la proteína. De esta forma las células pueden ser inducidas a producir grandes cantidades de proteínas útiles en medicina -tales como insulina humana y hormona de crecimiento, interferón o antígenos víricos utilizados en vacunas. En un sentido más amplio, estos métodos permiten producir cualquier proteína -incluso las que se encuentran en número de copias muy bajo en la célula- en cantidades suficientemente elevadas como para permitir su utilización en estudios detallados de estructura y de función que describiremos en la sección siguiente.

La tecnología de DNA también puede utilizarse para producir grandes cantidades de cualquier molécula de RNA cuyo gen haya sido caracterizado. Los estudios de maduración del RNA, de síntesis de proteínas o de enzimas basadas en RNA son mucho más fáciles si se dispone de moléculas de RNA puras. La mayoría de moléculas de RNA están presentes en cantidades muy bajas en la célula y son difíciles de purificar de otros componentes celulares, especialmente de los otros miles de moléculas de RNA presentes en la célula. Sin embargo, cualquier RNA de interés puede ser sintetizado de forma eficiente *in vitro* mediante la transcripción de su secuencia de DNA (a partir de alguno de los métodos descritos) por parte de una polimerasa de RNA viral de elevada eficiencia. Entonces, el único tipo de RNA producido puede ser separado con facilidad del molde de DNA y de la RNA polimerasa.

Algunas proteínas y ácidos nucleicos se sintetizan directamente por reacciones químicas

Las reacciones químicas han evolucionado permitiendo sintetizar de forma directa secuencias específicas de aminoácidos y ácidos nucleicos. Estas metodologías proveen de fuentes directas de moléculas biológicas y no dependen de células o enzimas. La síntesis química es el método de elección para obtener ácidos nucleicos en el rango inferior a 100 nucleótidos, que son especialmente útiles en la metodología basada en PCR mencionada. La síntesis química es también rutinaria para producir péptidos específicos que, cuando están químicamente acoplados a otras proteínas, se utilizan para producir anticuerpos contra el propio péptido.

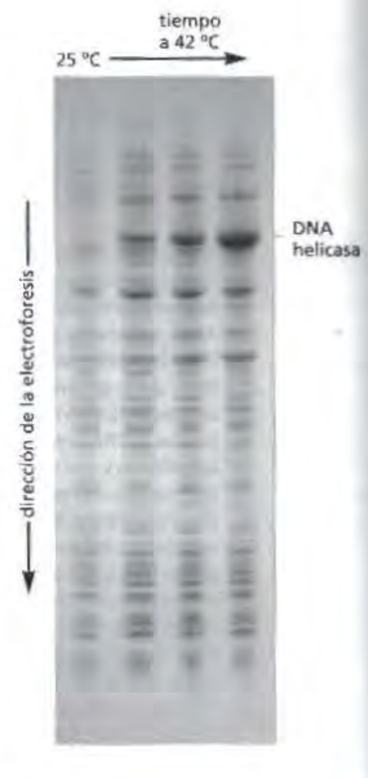


Figura 8–49 Producción de grandes cantidades de proteína utilizando un vector de expresión plasmídico. En este ejemplo, las células bacterianas han sido transfectadas con la secuencia codificante de la enzima DNA helicasa; la transcripción de esta secuencia codificante está bajo el control de un promotor vírico que se activa únicamente a temperatura igual o superior a 37 °C. La proteína celular total ha sido analizada por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, tanto en bacterias creciendo a 25 °C (donde no hay producción de helicasa), como en aquellas a las que se incrementó la temperatura a 42 °C durante un periodo máximo de 2 horas (la helicasa se convierte entonces en la proteína más abundante en el lisado celular). (Cortesía de Jack Barry.)

El DNA puede ser secuenciado rápidamente

Los métodos que permiten determinar de manera sencilla y rápida la secuencia de nucleótidos de cualquier fragmento de DNA purificado han posibilitado la obtención de las secuencias completas de DNA de miles de genes y de genomas completos de numerosos organismos (véase Tabla 1–1, p. 18). La cantidad de información respecto a secuencias de DNA es tan grande (muchas decenas de miles de millones de nucleótidos) que para almacenarla y analizarla se tienen que utilizar ordenadores muy potentes.

La secuenciación de DNA a gran escala se hizo posible gracias al desarrollo, a mediados de la década de 1970, del **método dideoxi** de secuenciación de DNA. Este método se basa en la síntesis *in vitro* de DNA en presencia de dideoxirribonucleósidos trifosfato terminadores de cadena (**Figura 8–50**).

En la actualidad, se utiliza básicamente este mismo método, pero con una serie de mejoras del método original. La secuenciación de DNA está por completo automatizada: aparatos robotizados mezclan los reactivos, cargan, corren y leen el orden de los nucleótidos en el gel. Este proceso se ve facilitado por la utilización de nucleótidos terminadores de cadena, marcados con colorantes fluorescentes de diferente color; en este caso, las cuatro reacciones de síntesis se llevan a cabo en el mismo tubo y los productos se pueden separar en un solo carril del gel. Un detector situado cerca del extremo inferior del gel mediante un rayo láser lee y almacena el color de la marca fluorescente de cada banda a medida que pasa (**Figura 8–51**). Un ordenador lee y almacena la secuencia de nucleótidos. Algunos sistemas modernos prescinden del gel tradicional, separando ácidos nucleicos por electroforesis capilar, un método que facilita la rápida automatización.

Las secuencias de nucleótidos se utilizan para predecir las secuencias de aminoácidos de las proteínas

Como la secuenciación de DNA puede realizarse de forma rápida y fiable, se ha convertido en el método de elección para determinar de forma indirecta la secuencia de aminoácidos de la mayoría de las proteínas. El proceso es bastante sencillo cuando se dispone de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína. Aunque en principio existen seis pautas de lectura posibles para traducir una secuencia de DNA a proteína (tres en cada hebra), la pauta correcta puede ser reconocida porque no presenta un gran número de codones de terminación (**Figura 8–52**). Como se indicó al describir el código genético en el Capítulo 6, una secuencia aleatoria de nucleótidos leídos en pauta codificará aproximadamente una señal de terminación cada 20 aminoácidos. Aquellas secuencias de nucleótidos que codifiquen péptidos mayores serán las candidatas a formar parte de exones, y pueden ser traducidas (mediante un ordenador) a sus correspondientes secuencias de aminoácidos y comparadas con las bases de datos para buscar similitudes con proteínas conocidas de otros organismos. En caso necesario, la determinación de un pequeño trozo de la secuencia de aminoácidos de la proteína purificada permite confirmar la secuencia determinada a partir del DNA.

Sin embargo, el problema surge cuando se quiere determinar qué secuencias de nucleótidos –del total del DNA genómico– representan genes que codifican proteínas. La identificación de genes es más sencilla cuando la secuencia de DNA procede del cromosoma de bacterias o de arqueobacterias, que carecen de exones, o de un clon de cDNA. Puede predecirse la localización de genes en estas secuencias de nucleótidos examinando características distintivas del DNA (como se describió en el Capítulo 6). Estos genes se identifican buscando la secuencia de nucleótidos que proporciona una *pauta de lectura abierta* (*ORF: open reading frame*) que empiece con un codón de inicio, por lo general ATG, y termine con un codón de parada TAA, TAG o TGA. Para minimizar errores, los ordenadores utilizados para la búsqueda de ORF se programan de modo que consideren como posibles genes secuencias mayores de, por ejemplo, 100 codones de longitud.

En el caso de los genomas de mayor complejidad, tales como los de animales y plantas, el proceso es más difícil por la presencia de grandes intrones insertados entre las porciones codificantes de los genes. En numerosos organismos pluricelulares, incluido el hombre, el tamaño medio de los exones es de 150 nucleótidos. Por tanto, se deben buscar otras características indicativas de la presencia de un gen, como por ejemplo las secuencias que señalan los límites intrón/exón o las regiones reguladoras 5' distintivas. Actualmente, numerosos esfuerzos para resolver el problema de predicciones de exones se centran en algoritmos de

inteligencia artificial, en los que el ordenador aprende, se basa en sus propios ejemplos conocidos y fija las características más indicativas de una región limítrofe de un exón.

Una segunda aproximación para la identificación de regiones codificantes en los cromosomas puede realizarse mediante la caracterización de las secuencias de nucleótidos de los

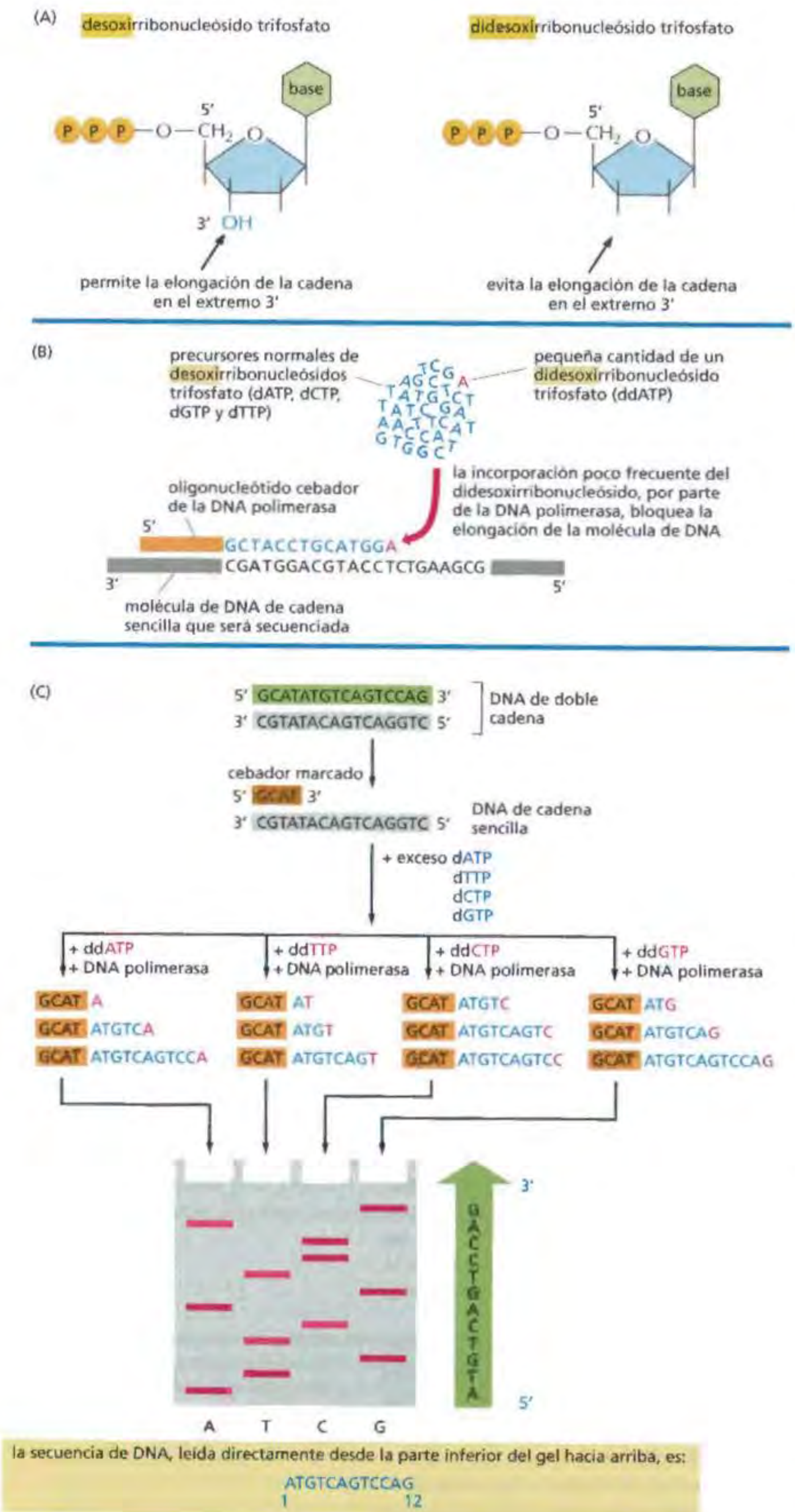


Figura 8–50 Método enzimático –o didesoxi– de secuenciación de DNA. (A) Este método está basado en la utilización de didesoxirribonucleósidos trifosfato, que son derivados de los desoxirribonucleósidos trifosfato normales que carecen del grupo hidroxilo en la posición 3'. (B) El DNA se sintetiza *in vitro*; la mezcla de reacción contiene moléculas de cadena sencilla del DNA que se desea secuenciar (*gris*), la enzima DNA polimerasa, un corto cebador de DNA (*naranja*) que permite el inicio de la síntesis por parte de la DNA polimerasa y los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP: A, C, G y T en color *azul*). Los análogos didesoxirribonucleósido (*rojo*), cuando se encuentran presentes en la mezcla de nucleótidos, podrán ser incorporados en la cadena de DNA en elongación. Ahora esta cadena carecerá del grupo 3'OH, por lo que la adición del siguiente nucleótido se verá bloqueada y la cadena de DNA terminará en ese punto. En el ejemplo ilustrado, una pequeña cantidad de didesoxiATP (ddATP, simbolizado con una A de color *rojo*) ha sido incorporada a la mezcla de nucleótidos. El ddATP compite con un exceso de la forma normal desoxiATP (dATP, simbolizado con una A de color *azul*), con lo que el ddATP se incorpora ocasionalmente, y de forma aleatoria, a la cadena de DNA en elongación. Esta mezcla de reacción producirá un conjunto de secuencias de DNA de diferentes longitudes, complementarias al molde de DNA que está siendo secuenciado, que terminarán en cada una de las diferentes A. Así, las longitudes exactas de los productos de la síntesis de DNA pueden ser utilizadas para determinar la posición de cada A en la cadena en elongación. (C) Para determinar la secuencia completa del fragmento de DNA, en primer lugar se separa el DNA de doble cadena en sus cadenas sencillas y una de ellas se utiliza como molde de la secuenciación. Se utilizan cuatro didesoxirribonucleósidos trifosfato terminadores de cadena diferentes (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP, de nuevo mostrados en *rojo*) en cuatro reacciones de síntesis independientes, sobre el mismo molde de cadena sencilla de DNA (*gris*). Cada reacción produce copias acabadas en diferentes puntos de la secuencia. Los productos de estas cuatro reacciones se separan por electroforesis, en cuatro carriles paralelos de un gel de poliacrilamida (marcados en la figura como A, T, C y G). Los nuevos fragmentos sintetizados son detectados mediante una marca (radiactiva o fluorescente) que ha sido incorporada en el cebador, o bien en uno de los desoxirribonucleósidos trifosfato empleado para alargar la cadena de DNA. En cada carril, las bandas representan fragmentos que han terminado en un nucleótido dado (p. ej. A en el carril de la izquierda), pero en posiciones diferentes de la cadena de DNA. Leyendo en orden las bandas de los cuatro carriles, empezando en la parte inferior del gel, se determina la secuencia de DNA de la nueva cadena sintetizada. La secuencia final se muestra en la *flecha verde* a la derecha del gel. Esta secuencia es complementaria de la cadena molde (*gris*) de la molécula de doble cadena de DNA original e idéntica a la de la cadena 5' a 3' (*verde*).

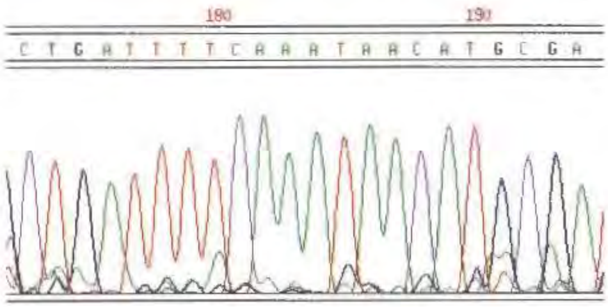


Figura 8–51 Secuenciación automática de DNA. En la figura se muestra una pequeña parte de la información obtenida tras una secuenciación automática de DNA, tal como aparece en la pantalla del ordenador. Cada pico coloreado representa un nucleótido de la secuencia de DNA; en la figura puede leerse un fragmento de la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 173 y 194, relativas al inicio de la secuencia. Los picos pequeños que sobresalen de la línea basal representan "ruido" de fondo y como son mucho más pequeños que los picos que se consideran señal, se ignoran. Este ejemplo en particular está extraído del proyecto internacional que determinó la secuencia nucleotídica completa del genoma de la planta *Arabidopsis*. (Cortesía de George Murphy.)

mRNA detectables (utilizando los cDNA correspondientes). Los mRNA (y los cDNA producidos a partir de ellos) carecen de intrones, de las secuencias reguladoras del DNA y del DNA separador "no esencial" que se encuentra entre los genes. Por tanto, la secuenciación de un gran número de cDNA es útil para obtener una gran colección (llamada base de datos) de las secuencias codificantes de un organismo. Estas secuencias se utilizan para distinguir los exones de los intrones en las largas secuencias de DNA cromosómico correspondientes a genes.

Se han secuenciado por completo los genomas de muchos organismos

Los genomas de muchos organismos han sido secuenciados por completo debido en gran parte a la automatización de los métodos de secuenciación de DNA; entre estos genomas se encuentran el de cloroplastos de plantas y el de mitocondrias de animales, muchas especies de bacterias y arqueobacterias y los de numerosos organismos utilizados en el laboratorio tales como varias especies de levaduras, un gusano nematodo, la mosca de la fruta *Drosophila*, la planta modelo *Arabidopsis*, el ratón, el perro, el chimpancé y, por último, también el genoma humano. Los investigadores han deducido también la secuencia completa de DNA de diversos patógenos humanos. Entre ellos se encuentran las bacterias causantes del cólera, la tuberculosis, la sífilis, la gonorrea, la enfermedad de Lyme y las úlceras de estómago, así como varios cientos de virus que incluyen el virus de la viruela y el de Epstein-Barr (que causa la mononucleosis infecciosa). El examen del genoma de estos patógenos aporta pistas sobre la causa de su virulencia y proporciona vías para la obtención de nuevos tratamientos más efectivos.

Haemophilus influenzae (una bacteria que en niños causa infecciones de oído y meningitis) fue el primer organismo del que se tuvo la secuencia genómica completa –1,8 mi-

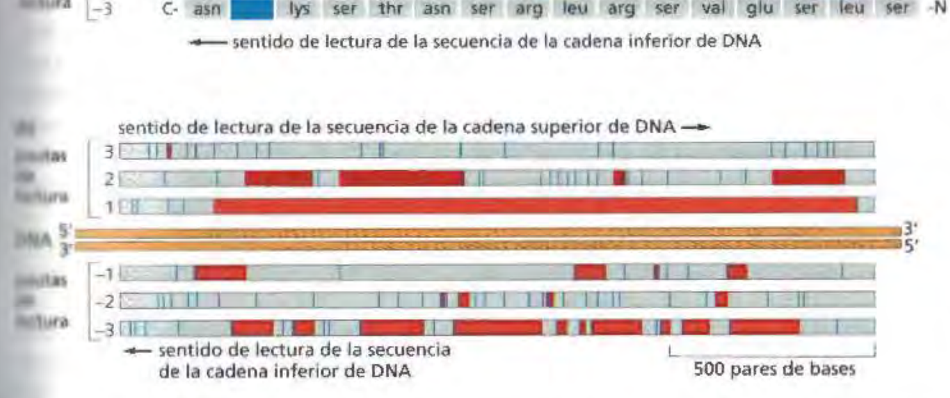


Figura 8–52 Localizando las regiones que codifican proteína en una secuencia de DNA. (A) En principio, cualquier región de la secuencia de DNA puede codificar seis secuencias de aminoácido diferentes, ya que cada una de las tres pautas de lectura de cada hebra se puede utilizar para codificar un polipéptido. La secuencia de nucleótidos siempre se lee en sentido 5' a 3', y codifica un polipéptido desde su extremo amino (N) a su extremo carboxilo (C) terminal. En una secuencia aleatoria de nucleótidos, se encuentra en promedio una secuencia de paro para la síntesis de proteína cada 20 aminoácidos. En el ejemplo presentado, de 48 pares de bases, cada una de esas señales (*codones de paro*) se han coloreado en *azul*; nótese que la pauta de lectura 2 es la única que no contiene ninguna señal de paro. (B) Búsqueda en una secuencia de DNA, con una longitud de 1700 pares de bases, de una posible secuencia codificante de proteína. La información se representa como en (A), con cada señal de parada de la síntesis proteica indicada con una *línea azul*. Además, se representan con *barras rojas* todas las regiones localizadas entre posibles señales de inicio y final de la síntesis proteica (véase p. 381). Sólo la pauta de lectura 1 codifica una proteína, cuya longitud es de 475 aminoácidos.

llones de pares de nucleótidos– mediante el *método de secuenciación de la "perdigonada"*, uno de los más utilizados en la actualidad. En el método de la perdigonada, las secuencias largas de DNA se cortan de forma aleatoria para generar fragmentos de menor tamaño. Cada fragmento es secuenciado y un ordenador se encarga de ordenar estos fragmentos, basándose en el solapamiento de secuencias, obteniendo la secuencia de cromosomas o de genomas completos. El método de la perdigonada suele ser la técnica de elección en la secuenciación de genomas de pequeño tamaño. Aunque las secuencias genómicas largas y con mayor número de repeticiones son más difíciles de ensamblar, el método de la perdigonada –en combinación con el análisis de grandes fragmentos de DNA clonados en BAC– también ha desempeñado un importante papel en su secuenciación.

Con la aparición en la literatura científica de nuevas secuencias a un ritmo cada vez mayor, la comparación de las secuencias completas de los genomas de diferentes organismos permite trazar las relaciones evolutivas entre organismos o genes, y también descubrir genes y predecir sus funciones (mencionadas en los Capítulos 3 y 4). A menudo, la asignación de las funciones a los genes implica la comparación de sus secuencias con las de organismos modelo que han sido bien caracterizadas en el laboratorio, tales como la bacteria *E. coli*, las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pombe*, el nematodo *C. elegans* y la mosca de la fruta *Drosophila* (como se describió en el Capítulo 1).

Aunque los organismos cuyo genoma ha sido secuenciado comparten numerosas rutas bioquímicas y presentan numerosas proteínas homólogas en secuencia o estructura, se desconocen las funciones de un gran número de las proteínas identificadas recientemente. Dependiendo del organismo, entre el 15 y el 40% de las proteínas codificadas por los genomas secuenciados no se parecen a ninguna otra proteína de las que ya se han estudiado bioquímicamente. La observación anterior conlleva una de las limitaciones del campo emergente de la genómica: aunque el análisis comparativo de los genomas proporciona una gran cantidad de información sobre las relaciones entre organismos o entre genes a menudo no proporciona información inmediata sobre cómo actúan estos genes, o sobre las funciones que desempeñan en la fisiología del organismo. Por ejemplo, la comparación de los genes de diversas bacterias termófilas no explica por qué estas bacterias crecen a temperaturas que exceden los 70 °C. El estudio del genoma de la bacteria *Deinococcus radiodurans*, una bacteria increíblemente radiorresistente, tampoco puede explicar cómo este organismo puede sobrevivir a una dosis de radiación que podría hacer añicos un cristal. Por tanto, la determinación del funcionamiento de los genes, y las proteínas que producen, en el contexto de los organismos vivos requiere un mayor número de estudios bioquímicos y genéticos, tales como los que describiremos en otras secciones de este capítulo.

Resumen

La clonación de DNA permite seleccionar y copiar cualquier parte determinada de una secuencia de RNA o de DNA, entre millones de otras secuencias de la célula, y producirla en cantidades ilimitadas en forma pura. Después de cortar el DNA cromosómico con nucleasas de restricción, las secuencias de DNA pueden ser amplificadas y los fragmentos resultantes se pueden insertar en el cromosoma de un elemento genético autorreplicativo, como por ejemplo un virus o un plásmido. Habitualmente se utilizan vectores plasmídicos; la biblioteca de DNA genómico resultante se mantiene en millones de bacterias, cada una de las cuales transporta un fragmento diferente del DNA clonado. Las bacterias de esta biblioteca, a las que se les permite proliferar, producen grandes cantidades de un único fragmento de DNA clonado de esta biblioteca. Alternativamente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite realizar la clonación de DNA de forma directa utilizando una DNA polimerasa termoestable purificada, siempre que se conozca la secuencia de DNA de interés.

Estos mismos métodos se utilizan para obtener clones de DNA cuya secuencia se corresponde con la de moléculas de RNA, aunque en estos casos primero se debe generar una molécula de DNA, llamada cDNA, desde la secuencia de mRNA. A diferencia de los clones genómicos, los clones de cDNA carecen de intrones, lo que los convierte en los clones de elección cuando se desea analizar la proteína derivada de un gen determinado.

Las reacciones de hibridación de ácidos nucleicos permiten detectar de forma sensible un gen o cualquier otra secuencia de nucleótidos elegida. Bajo condiciones astringentes de hibridación (una combinación de disolvente y de temperatura, en la que incluso la doble hélice de DNA es poco estable), se consigue que dos cadenas puedan aparearse formando una hélice "híbrida" sólo si sus secuencias de nucleótidos son casi complementarias. La gran especificidad de esta reacción de hibridación permite marcar químicamente o con isótopos radiactivos casi cualquier secuencia de

nucleótidos de cadena sencilla, que puede utilizarse como sonda para encontrar su cadena complementaria entre millones de secuencias diferentes de DNA o de RNA de una célula o de un extracto celular. Las sondas de este tipo se utilizan por lo general para detectar secuencias de genes concretos, tanto para facilitar su purificación y caracterización, como para localizarlos en células, tejidos u organismos.

La secuencia de nucleótidos de los fragmentos de DNA purificados se determina de forma rápida y sencilla utilizando técnicas altamente automatizadas basadas en el método dideoxi de secuenciación de DNA. Esta técnica ha permitido determinar las secuencias de DNA completas de los genomas de numerosos organismos. La comparación de la secuencia genómica de diferentes organismos permite trazar las relaciones evolutivas entre organismos y genes, y se ha mostrado valiosa en el descubrimiento de nuevos genes y en la predicción de sus funciones.

En conjunto, estas técnicas de análisis y manipulación del DNA han hecho posible identificar, purificar y secuenciar genes de cualquier organismo de interés. Tecnologías semejantes a las anteriores hacen posible que los científicos puedan producir las proteínas de estos genes en las grandes cantidades necesarias para el análisis detallado de su estructura y de su función, así como para su utilización con finalidad médica.

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y LA FUNCIÓN DE LOS GENES

En última instancia, el objetivo es determinar cómo funcionan, en el organismo intacto, los genes y las proteínas que codifican. Aunque pueda parecer poco intuitivo, muchas veces la forma más directa de determinar el papel de un gen consiste en observar qué sucede en el organismo cuando dicho gen no está presente. El estudio de organismos mutantes que han incorporado cambios o deleciones en sus secuencias de nucleótidos es una práctica clásica en biología y fundamenta la base de la genética. Dado que las mutaciones pueden interrumpir procesos celulares, a menudo los mutantes resultan la clave para entender la función génica. En una aproximación de **genética** clásica, se empieza buscando mutantes de aspecto interesante o inusual: por ejemplo, moscas de la fruta con los ojos blancos o con las alas rizadas. Trabajando en sentido inverso desde el **fenotipo** –la apariencia o comportamiento del individuo– se determina el **genotipo** del organismo, es decir, la forma concreta del gen responsable de dicha característica (**Panel 8–1**).

En la actualidad, con el acceso a numerosas secuencias de genomas, la indagación de la función de un gen empieza desde una secuencia de DNA. En este caso el reto consiste en averiguar la función a partir de la secuencia. Como se explicó anteriormente en este capítulo, una de las aproximaciones consiste en buscar en las bases de datos proteínas bien caracterizadas cuya secuencia de aminoácidos sea similar a la de la proteína codificada por el nuevo gen, y utilizar alguno de los métodos descritos en la sección anterior para estudiar con más detalle la función de ese gen. Ahora bien, para determinar de forma directa la función de un gen en una célula o en un organismo, la aproximación más eficiente implica el estudio tanto de mutantes que carezcan del gen, como de aquellos que expresen una versión alterada del mismo. Frecuentemente la determinación de los procesos celulares que se han visto interrumpidos o alterados en estos mutantes proporcionará nueva información sobre el papel biológico del gen.

En esta sección se describen varias aproximaciones a la determinación de la función de los genes, tanto si se empieza desde una secuencia de DNA, como de un organismo con un fenotipo interesante. Empezaremos con la aproximación clásica que utiliza la genética para el estudio de los genes y de su función. Estos estudios se inician con la exploración genética para encontrar mutantes de interés y proceder a la identificación del gen o genes responsables del fenotipo observado. Revisaremos el conjunto de técnicas agrupadas bajo la denominación de *genética inversa*, en las que a partir de un gen o una secuencia génica se intenta determinar su función. A menudo esta aproximación requiere un trabajo inteligente de conjeturas, buscando secuencias homólogas y determinando dónde y cuándo se expresa un gen, así como la generación de organismos mutantes y la caracterización de su fenotipo.

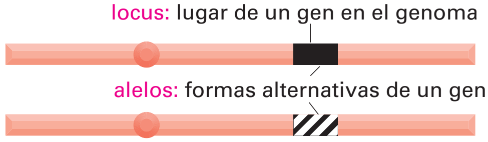
La aproximación clásica empieza con la mutagénesis aleatoria

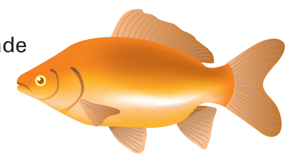
Antes de la incorporación de la tecnología de clonación de genes, la mayoría de genes se identificaban estudiando los procesos que se alteraban cuando el gen estaba mutado. La

GENES Y FENOTIPOS

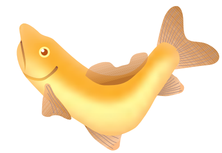
Gen: unidad funcional de la herencia, que normalmente se corresponde con un segmento de DNA que codifica una sola proteína.

Genoma: conjunto de genes de un organismo.





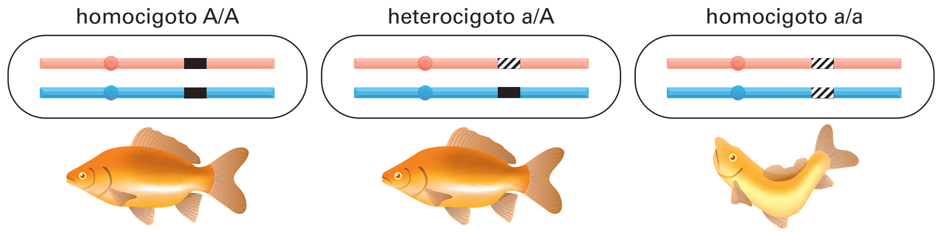
Fenotipo salvaje: fenotipo normal que se da de forma natural



Fenotipo mutante: aquel que difiere del salvaje debido a un cambio genético (una mutación)

GENOTIPO: conjunto específico de alelos que conforman el genoma de un individuo

FENOTIPO: manifestación externa observable de un genotipo concreto

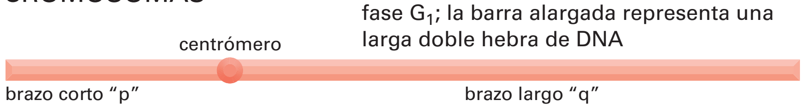


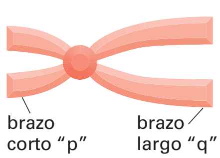
el alelo A es dominante (con respecto al alelo a); el alelo a es recesivo (con respecto a A)

En el ejemplo superior, el fenotipo del heterocigoto es el mismo que el de uno de los dos homocigotos; cuando es diferente de ambos, se dice que los dos alelos son codominantes.

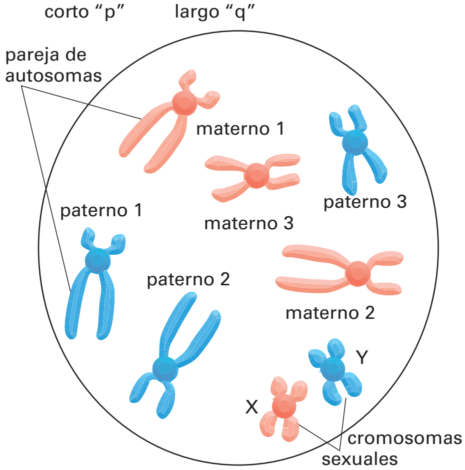
CROMOSOMAS

un cromosoma al inicio del ciclo celular, en fase G_1; la barra alargada representa una larga doble hebra de DNA



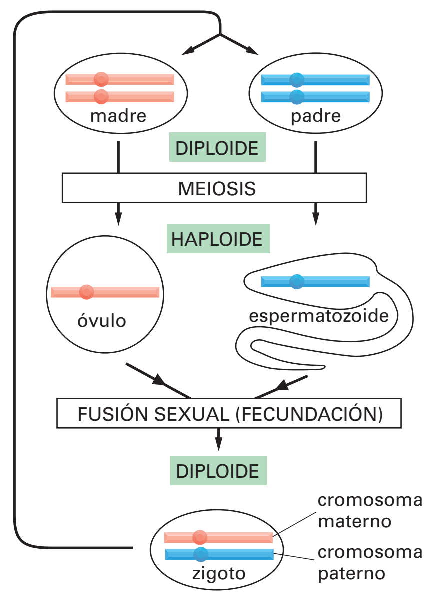


un cromosoma al final del ciclo celular, en metafase; se encuentra duplicado y condensado, y consiste en dos cromátidas hermanas idénticas (cada una de las cuales contiene una doble hélice de DNA) unidas en el centrómero.



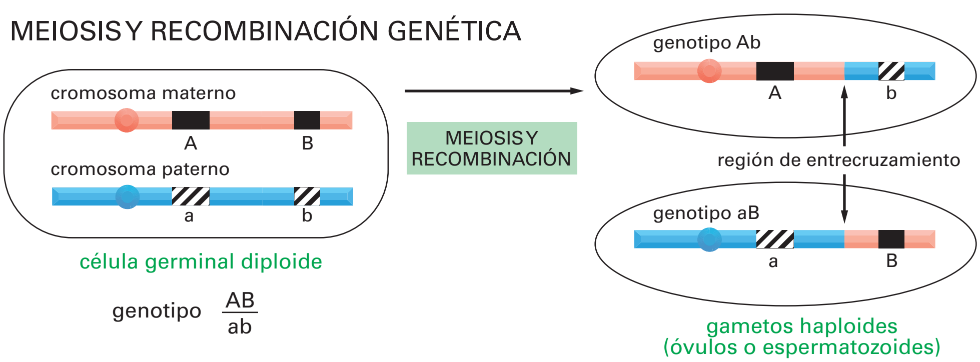
Conjunto diploide normal de cromosomas, tal como se observan en el huso metafásico. Se han preparado rompiendo la célula en metafase y tiñendo los cromosomas dispersos. En el ejemplo esquemático mostrado, se observan tres pares de autosomas (cromosomas heredados simétricamente de ambos progenitores, con independencia del sexo) y dos cromosomas sexuales: un cromosoma X de la madre y un cromosoma Y del padre. El número y tipo de los cromosomas sexuales, y su papel en la determinación del sexo, varían de una especie a otra, tal y como sucede con el número de parejas de autosomas.

EL CICLO HAPLO-DIPLOIDE DE LA REPRODUCCIÓN SEXUAL



Para mayor simplicidad, el ciclo se muestra sólo para un cromosoma/una pareja de cromosomas.

MEIOSIS Y RECOMBINACIÓN GENÉTICA

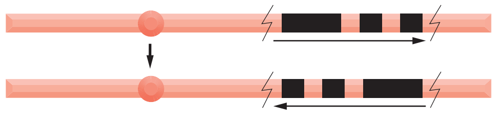


Cuanto mayor sea la distancia entre dos loci de un mismo cromosoma, mayor es la probabilidad de su separación por un entrecruzamiento producido en un lugar situado entre ambos. Si dos genes quedan redistribuidos de este modo en un porcentaje x de gametos, se dice que se encuentran separados en el cromosoma por una distancia genética de mapa de x unidades de mapa (o x centimorgans).

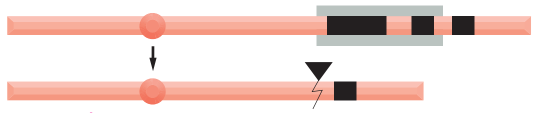
TIPOS DE MUTACIONES



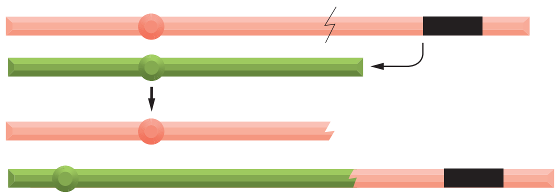
MUTACIÓN PUNTUAL: afecta a un lugar del genoma que corresponde a un par de nucleótidos o a una parte muy pequeña de un gen



INVERSIÓN: invierte un segmento de un cromosoma



DELECIÓN: elimina un segmento del cromosoma



TRANSLOCACIÓN: rompe un segmento de un cromosoma y lo une a otro

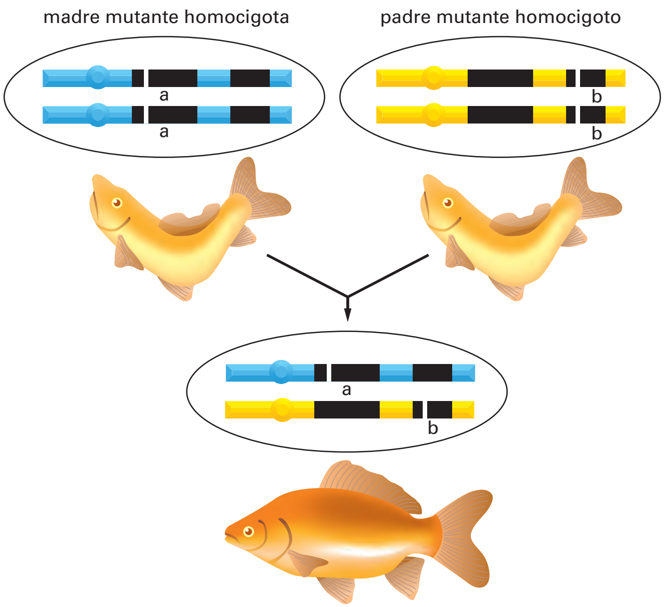
mutación letal: provoca que el organismo en desarrollo muera de forma prematura
mutación condicional: produce su efecto fenotípico sólo bajo determinadas condiciones, llamadas condiciones *restrictivas*. Bajo otras condiciones –condiciones *permisivas*– el efecto no se observa. En el caso de una mutación *sensible al grado de temperatura*, generalmente la condición restrictiva es una elevación de la temperatura, mientras que la condición permisiva es la temperatura baja.
mutación con pérdida de función: disminuye o suprime la actividad de un gen. Este es el tipo de mutación más frecuente. Las mutaciones con pérdida de función suelen ser *recesivas* –el organismo puede funcionar con normalidad mientras retenga al menos una copia normal del gen alterado.
mutación nula: mutación con pérdida de función en la que se suprime por completo la función del gen.
mutación con ganancia de función: incrementa la actividad del gen, o lo hace activo bajo circunstancias inapropiadas; normalmente estas mutaciones son *dominantes*.
mutación dominante negativa: mutación con papel dominante que bloquea la actividad génica, provocando un fenotipo de pérdida de función incluso en presencia de una copia normal del gen. Este fenómeno sucede cuando el producto del gen mutante interfiere con la función del producto génico normal.
mutación supresora: suprime el efecto fenotípico de otra mutación, de manera que aparentemente el doble mutante es normal. Una mutación supresora *intragénica* estará localizada en el gen afectado por la primera mutación; una mutación supresora *extragénica* estará localizada en un segundo gen –a menudo, en uno cuyo producto interacciona directamente con el producto del primer gen.

¿DOS GENES O UNO?

Dadas dos mutaciones que dan lugar a un mismo fenotipo, ¿cómo podremos saber cuándo ambas mutaciones están situadas en un mismo gen? Si las mutaciones son recesivas (como sucede habitualmente), la respuesta puede encontrarse con una prueba de complementación.

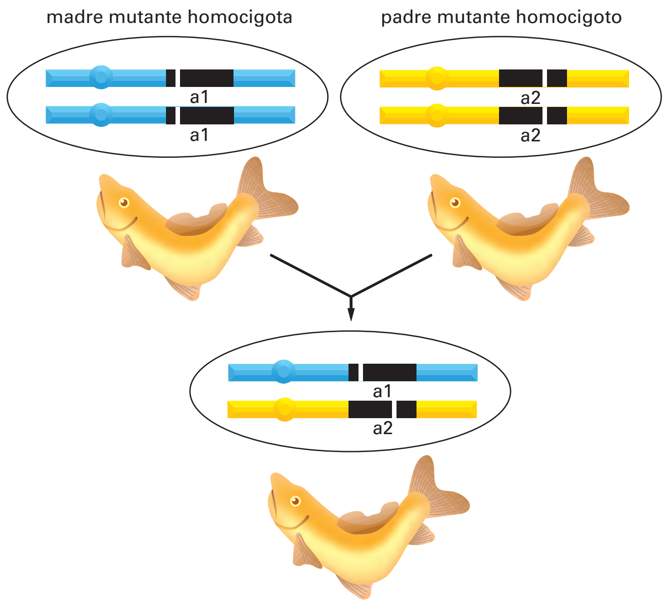
En el tipo más sencillo de prueba de complementación, un individuo que es homocigoto para una mutación se cruza con un individuo que es homocigoto para la otra. El fenotipo de la descendencia responde a la pregunta.

COMPLEMENTACIÓN: MUTACIONES EN DOS GENES DIFERENTES



descendencia híbrida que muestra un fenotipo normal: existe una copia normal de cada gen

NO COMPLEMENTACIÓN: DOS MUTACIONES INDEPENDIENTES EN EL MISMO GEN



descendencia híbrida que muestra un fenotipo mutante: no existen copias normales del gen

aproximación genética clásica, que consiste en la identificación de los genes responsables de los fenotipos mutantes, puede realizarse con facilidad en organismos que se reproducen rápidamente y que son sensibles a manipulación genética, tales como bacterias, levaduras, gusanos nematodos y la mosca de la fruta. Aunque es posible encontrar mutantes espontáneos examinando poblaciones enormes, de miles o decenas de miles de organismos individuales, el proceso de obtención de mutantes individuales se ve facilitado en gran medida generando mutaciones con agentes químicos o radiaciones que dañan el DNA. Tratando a los organismos con tales agentes mutagénicos, se puede generar de forma rápida un gran número de mutantes individuales entre los que podremos buscar los que presenten un defecto particular que nos interese, como veremos a continuación.

Una aproximación alternativa a la mutagénesis química o por radiación es la denominada *mutagénesis insercional*. Este método se basa en el hecho de que un DNA exógeno insertado de forma aleatoria en el genoma puede producir mutaciones si el fragmento insertado interrumpe un gen o sus secuencias reguladoras. El DNA insertado, cuya secuencia se conoce, puede utilizarse como marca molecular que facilita la posterior identificación y clonación del gen interrumpido (**Figura 8–53**). La utilización del elemento genético transponible P para inactivar genes ha revolucionado el estudio de la función génica en la mosca *Drosophila*. Los elementos transponibles (véase Tabla 5–3, p. 318) también se han utilizado para generar mutaciones en bacterias, levaduras, ratones y la planta *Arabidopsis*.



Figura 8–53 Mutante insercional en *Antirrhinum* (boca de dragón). Una mutación de un solo gen, que codifica una proteína reguladora, provoca que se desarrollen brotes foliares en lugar de flores. La mutación permite a las células adoptar un carácter que podría ser apropiado en otra parte de la planta normal. La planta mutante aparece a la *izquierda* de la imagen y la planta normal a la *derecha*. (Cortesía de Enrico Coen y Rosemary Carpenter.)

Los estudios genéticos clásicos mencionados son adecuados para diseccionar los procesos biológicos en organismos experimentales, pero ¿cómo podemos estudiar la función de los genes en los humanos? A diferencia de los organismos genéticamente accesibles que hemos indicado, los humanos no se reproducen con rapidez y no pueden tratarse de forma intencionada con mutágenos. Además, cualquier humano con una deficiencia grave en un proceso esencial, tal como la replicación del DNA, moriría mucho antes del nacimiento.

Existen dos formas principales por las que podemos estudiar los genes en los humanos. En primer lugar, dado que los genes y sus funciones han sido altamente conservadas a lo largo de la evolución, el estudio de organismos modelo menos complejos revela información crítica sobre genes y procesos similares en humanos. Los correspondientes genes humanos pueden ser estudiados en células humanas en cultivo. En segundo lugar, muchas mutaciones que no son letales, por ejemplo, deficiencias lisosomales específicas de tejido o de receptores de la superficie celular, han aparecido de forma espontánea en la población humana. El análisis de los fenotipos de los individuos afectados, junto a los estudios de sus células en cultivo, ha proporcionado numerosas aportaciones a la comprensión del funcionamiento de las células humanas. Aunque dichas mutaciones sean poco frecuentes, se reconocen de forma eficiente gracias a una propiedad única de los humanos: los individuos con mutaciones atraen la atención al buscar atención médica especializada.

Las exploraciones genéticas identifican mutantes con anormalidades específicas

Una vez que se ha obtenido una colección de mutantes en un organismo modelo como la levadura o la mosca de la fruta, deberemos examinar miles de individuos hasta encontrar el fenotipo alterado de interés. Este tipo de búsqueda se denomina **exploración genética** y cuanto mayor sea un genoma, menos probable será que se produzca una mutación específica en ese gen. Por tanto, cuanto más complejo sea el organismo, mayor número de mutantes deberán ser analizados. El genotipo examinado puede ser sencillo o complejo. Los genotipos sencillos son más fáciles de analizar. Podemos explorar muchos organismos rápidamente: por ejemplo, una mutación que impida crecer a un organismo en ausencia de un nutriente o de un aminoácido concreto.

Los fenotipos de mayor complejidad, como por ejemplo las mutaciones que causan déficit de aprendizaje o de comportamiento, requieren exámenes mucho más elaborados (**Figura 8–54**). Ahora bien, incluso las exploraciones genéticas utilizadas para descifrar sistemas fisiológicos complejos, deberían ser lo más sencillas posible en cuanto a diseño y también deberían permitir el examen de forma simultánea de un gran número de mutantes. Un ejemplo de estudio elegante de exploración genética lo tenemos en el diseño utilizado para buscar genes implicados en el procesamiento visual del pez cebra. La base del estudio es el cambio en el comportamiento de los peces en respuesta a una señal. Los peces de fenotipo salvaje tienden a nadar en la dirección de una señal cuando la perciben, mientras que los mutantes con defectos en el procesado de su sistema visual nadan en direcciones aleatorias



Figura 8–54 Los estudios genéticos permiten encontrar mutaciones que afectan al comportamiento específico de un animal. (A) *C. elegans* de fenotipo salvaje alimentándose en grupo. Los gusanos migran hasta que encuentran a sus vecinos y entonces empiezan a alimentarse de bacterias. (B) Los animales mutantes se alimentan solos. (Cortesía de Cornelia Bargmann, *Cell* 94: cubierta, 1998. Con la autorización de Elsevier.)

en respuesta a la misma señal, mostrando un comportamiento fácilmente detectable. Uno de los mutantes descubiertos en esta exploración genética, denominado *lakritz*, presenta una ausencia del 80% de las células ganglionares de la retina, que ayudan a transportar las señales visuales desde el ojo al cerebro. Puesto que la organización celular de la retina del pez cebra es similar a la que se da en todos los vertebrados, el estudio de estos mutantes también debería proporcionar información sobre el procesamiento visual en humanos.

A menudo, los defectos en los genes necesarios para procesos celulares fundamentales son letales, como los que están implicados en la síntesis y procesamiento del RNA o en el control del ciclo celular, por lo que la función de estos genes se estudia en individuos con **mutaciones condicionales**. Los individuos mutantes funcionan con normalidad mientras las condiciones permisivas prevalezcan, pero demuestran una función génica anormal cuando se someten a condiciones no permisivas (restrictivas). En organismos con *mutaciones que son sensibles a la temperatura*, por ejemplo, la deficiencia puede ser fácilmente activada o inactivada de forma experimental simplemente manipulando la temperatura. Una célula que contenga una mutación sensible a la temperatura en un gen esencial para la viabilidad, morirá en condiciones no permisivas pero podrá crecer a temperatura normal o permisiva (**Figura 8–55**). En este tipo de mutantes, el gen sensible a la temperatura por lo general contiene una mutación puntual que provoca un cambio sutil en la proteína que codifica.

El tratamiento de poblaciones de bacterias con un agente mutagénico y el posterior examen de aquellas células que detenían su síntesis de DNA al ser calentadas de 30 °C a 42 °C, permitió identificar numerosos mutantes sensibles a la temperatura en los genes de las proteínas necesarias para la replicación del DNA. Estos mutantes fueron utilizados posteriormente para identificar y caracterizar cada una de las proteínas implicadas en la replicación del DNA (como se explicó en el Capítulo 5). De igual manera, el examen de mutantes sensibles a la temperatura también condujo a la identificación de numerosas proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular así como muchas proteínas implicadas en el tráfico de proteínas a través de la vía de secreción en levaduras (véase Panel 13–1). Exploraciones genéticas semejantes a ésta demostraron la función de enzimas implicadas en las principales rutas metabólicas de bacterias y levaduras (como se expuso en el Capítulo 2), e identificaron numerosos productos génicos responsables del desarrollo ordenado del embrión de *Drosophila* (como se describirá en el Capítulo 22).



Figura 8–55 Estudios diseñados para encontrar mutantes sensibles a la temperatura en bacterias o en levaduras. Las células mutadas se cultivan sobre placa a temperatura permisiva. Las células se dividen y forman colonias que se transfieren a dos placas de Petri idénticas. Una de las placas se incuba a temperatura permisiva y la otra a temperatura no permisiva. Las células que contienen una mutación, que les hace sensibles a la temperatura en un gen esencial para la proliferación, pueden dividirse a temperatura normal (permisiva) pero no a temperatura elevada (no permisiva).



Figura 8–56 Las mutaciones génicas pueden afectar al producto proteico de diferentes maneras. En este ejemplo, la proteína salvaje tiene una función específica que se señala con *marcas rojas*. Se muestran las mutaciones que eliminan, incrementan o generan que la función sea sensible a altas temperaturas. La proteína mutante condicional que es sensible a la temperatura tiene una sustitución en un aminoácido (*rojo*) que impide su correcto plegado a 37 °C pero que lo permite a 25 °C. Tales mutaciones condicionales son especialmente útiles para el estudio de genes esenciales; el organismo puede crecer bajo condiciones permisivas y a continuación ser trasladado a condiciones no permisivas para el estudio de la función.

Las mutaciones pueden causar la pérdida o la ganancia de una función proteica

Las mutaciones se clasifican generalmente en "pérdida de función" o "ganancia de función". Una mutación de pérdida de función genera un producto génico que no funciona o que funciona muy poco, lo cual permite identificar la función normal del gen. Una mutación de ganancia de función genera un producto génico que trabaja demasiado, funciona a destiempo o de forma deslocalizada, o que actúa de una manera nueva (**Figura 8–56**).

Un importante paso en el inicio del análisis genético de cualquier célula u organismo mutante es la determinación de si la mutación causa una pérdida o una ganancia de la función. Un análisis estándar es la determinación de si la mutación es *dominante* o *recesiva*. Una mutación dominante es aquella que causa el fenotipo mutante incluso en presencia de una única copia del gen salvaje. Una mutación recesiva es aquella que no es capaz de causar el fenotipo mutante en presencia de una única copia del gen salvaje. Aunque se han descrito casos en los que una mutación que provoca una pérdida de función es dominante o una ganancia de función es recesiva, en la gran mayoría de los casos, las mutaciones recesivas generan una pérdida de función y las dominantes una ganancia. Simplemente cruzando un mutante y un individuo salvaje para obtener células u organismos diploides, la progenie del cruce será heterozigota para la mutación. Si el fenotipo mutante no se observa, se puede concluir que la mutación es recesiva y es muy probable que sea una mutación que genere una pérdida de función.

Una prueba de complementación indica si dos mutaciones se encuentran en un mismo gen o en genes diferentes

Una exploración genética a gran escala puede conducir a la obtención de diferentes mutaciones que muestren el mismo fenotipo. Estas deficiencias pueden encontrarse en genes diferentes que actúan en el mismo proceso o pueden representar mutaciones diferentes localizadas en un mismo gen. Los **alelos** son las formas alternativas de un gen. La diferencia más común entre los alelos es una sustitución de un simple par de nucleótidos, aunque diferentes alelos también pueden presentar deleciones, sustituciones y duplicaciones. ¿Cómo podemos afirmar si dos mutaciones que producen el mismo fenotipo se encuentran en un mismo gen o en genes diferentes? Si las mutaciones son recesivas y suponen, por ejemplo, la pérdida de función de un gen determinado, puede utilizarse una **prueba de complementación** para determinar si la mutación se encuentra en el mismo gen o en genes diferentes. Para realizar una prueba de complementación en un organismo diploide, se cruza un individuo homozigoto para una de las mutaciones, el cual presenta dos alelos idénticos del gen mutado en cuestión, con un individuo homocigoto para la otra mutación. Si las dos mutaciones se encuentran en el mismo gen, la descendencia presentará el fenotipo mutante, ya que carecerá de la copia normal del gen en cuestión (véase Panel 8–1). Si por el contrario las dos mutaciones se encuentran en genes diferentes, la descendencia resultante mostrará un fenotipo normal puesto que tendrá una copia normal (y una mutante) de cada uno de los genes; por tanto, las mutaciones se complementan entre sí y restablecen el fenotipo normal. Las pruebas de complementación en mutantes identificados mediante exploración genética han revelado, por ejemplo, que la levadura necesita 5 genes para digerir el azúcar galactosa, que *E. coli* necesita 20 genes para poder construir un flagelo funcional, que existen 48 genes implicados en el ensamblaje de las partículas víricas del bacteriófago T4 y que cientos de genes diferentes se encuentran implicados en el desarrollo de un gusano nematodo adulto desde el huevo fecundado.

Los genes pueden ser ordenados en vías mediante un análisis epistásico

Una vez identificados los genes implicados en un determinado proceso biológico, a menudo el paso siguiente consiste en determinar el orden en el que actúan los genes. El orden de los genes es quizás la explicación más fácil de las vías metabólicas donde, por ejemplo, una enzima A es necesaria para producir el sustrato para la enzima B. En este caso, podemos decir que el gen que codifica la enzima A actúa antes (corriente arriba) que el gen que codifica la enzima B en la vía. De forma similar, cuando una proteína regula la actividad de otra proteína, podemos decir que el primer gen actúa antes que el segundo. En muchos casos, la ordenación génica se puede determinar mediante un análisis genético sin el conocimiento del mecanismo de acción de los productos génicos involucrados.

Supongamos que tenemos un proceso biosintético que consiste en una secuencia de pasos de forma que la realización del paso B está condicionado por el paso A precedente; y supongamos que el *gen A* se requiere para el paso A y que el *gen B* es necesario para el paso B. Una mutación nula (una mutación que anula la función) del gen *A* parará el proceso en el paso A, sea o no funcional el gen *B*, mientras que una mutación nula en el gen *B* causará una parada en el paso B sólo en el caso en el que el gen *A* sea activo. En tal caso, se dice que el gen *A* es *epistásico* al gen *B*. Así, comparando los fenotipos de las diferentes combinaciones de mutaciones, se puede descubrir el orden en el que actúan los genes. Este tipo de análisis se denomina **análisis epistásico**. Por ejemplo, la vía de secreción de proteínas en levadura se ha analizado de esta manera. Diferentes mutaciones en esta vía provocan que las proteínas se acumulen de forma aberrante en el retículo endoplasmático (ER: *endoplasmic reticulum*) o en el complejo de Golgi. Cuando se modifica una célula de levadura de modo que contenga una mutación que bloquee tanto el procesamiento en el ER como en el complejo de Golgi, las proteínas se acumulan en el ER. Esto indica que las proteínas deben pasar a través del ER antes de ser enviadas al Golgi para su posterior secreción (**Figura 8–57**). En sentido estricto, un análisis epistásico sólo puede proporcionar información sobre la ordenación génica en una vía cuando ambas mutaciones generan alelos nulos. Cuando las mutaciones retienen parcialmente su función, sus interacciones epistásicas son difíciles de interpretar.

A veces un doble mutante mostrará un fenotipo nuevo o más grave que cualquiera de los mutantes individuales por separado. Este tipo de interacción genética se denomina fenotipo *sintético*, y si el fenotipo conduce a la muerte del organismo, pasa a denominarse *letalidad sintética*. En la mayoría de los casos, un fenotipo sintético indica que los dos genes actúan en dos vías diferentes y paralelas, y que ambas son capaces de mediar el mismo proceso celular. Así, cuando ambas vías se bloquean en el doble mutante, todo el proceso se afecta observándose el fenotipo sintético.

Los genes que contienen mutaciones se pueden clonar

El paso siguiente a la obtención de mutantes consiste en identificar el gen o genes responsables del fenotipo alterado. Si el fenotipo se realizó mediante mutagénesis insercional, la localización del gen interrumpido es bastante sencilla. Los fragmentos de DNA que contienen la inserción –que podría ser, por ejemplo, un transposón o un retrovirus– son purificados y amplificados por PCR, determinándose la secuencia de nucleótidos del DNA que flanquea la secuencia insertada. Esta secuencia se utiliza para buscar pautas abiertas de lectura en una base de datos de DNA.

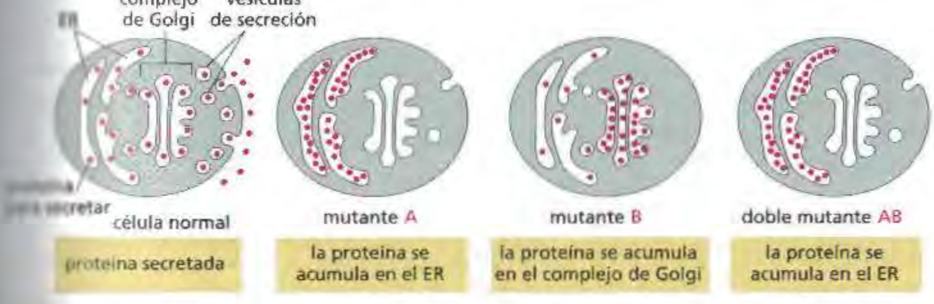


Figura 8–57 Utilización de la genética para determinar el orden en el que actúan los genes. En las células normales, las proteínas secretadas son cargadas en vesículas, que se fusionan con la membrana plasmática y secretan su contenido al medio extracelular. Dos mutantes, A y B no secretan proteínas. En el mutante A para la secreción, las proteínas se acumulan en el retículo endoplasmático (ER). En un mutante B diferente, las proteínas se acumulan en el Golgi. En el doble mutante AB, las proteínas se acumulan en el ER; este hecho indica que el gen defectuoso del mutante A actúa antes en la vía de secreción que el gen defectuoso del mutante B.

Sin embargo, si para generar las mutaciones se utilizó un agente químico que provoca daños en el DNA, a menudo la identificación del gen inactivado es mucho más laboriosa, aunque puede llevarse a cabo mediante varias aproximaciones diferentes. En una de ellas, el primer paso consiste en determinar experimentalmente el lugar del genoma en el que se localiza el gen. Para localizar un gen nuevo, primero se determina su localización cromosómica calculando la distancia en el genoma del gen respecto a otros genes ya conocidos. Habitualmente la estimación de la distancia entre loci genéticos se realiza por *análisis de ligamiento*, una técnica basada en el hecho de que los genes que se encuentran próximos en un cromosoma tienden a heredarse juntos. Sin embargo, incluso los genes que se encuentran muy cerca, se pueden separar durante la meiosis debido a la recombinación. Cuanto mayor sea la distancia entre dos loci genéticos, mayor será la probabilidad de que se separen debido a un entrecruzamiento (véase Panel 8–1). Calculando la frecuencia de recombinación entre dos genes se puede determinar la distancia aproximada entre ambos. Si se conoce la posición de un gen en el genoma, se puede estimar la del segundo gen.

Puesto que los genes no siempre se encuentran localizados lo bastante cerca entre sí como para poder precisar su posición, generalmente los análisis de ligamiento requieren marcadores físicos situados a lo largo del genoma para poder estimar la localización de un determinado gen. Estos marcadores suelen ser cortos fragmentos nucleotídicos, de secuencia y localización conocidas, que pueden encontrarse al menos en dos formas alélicas. Los marcadores más sencillos son los *polimorfismos de un solo nucleótido* (*SNP: single-nucleotide polymorphisms*). Son secuencias cortas que difieren en un par nucleótidos entre individuos de una población. Los SNP se pueden detectar mediante técnicas de hibridación. Se han encontrado muchos marcadores físicos de este tipo, distribuidos a lo largo de todo el cromosoma, para un gran número de organismos. Si la distribución de estos marcadores es suficientemente densa, se puede limitar la posición potencial de un gen en una región cromosómica que sólo contenga unas cuantas secuencias génicas, mediante un análisis del ligamiento que compruebe la herencia simultánea de uno o más SNP con el fenotipo mutante. Estas pocas secuencias génicas son consideradas potenciales candidatos y se puede analizar de forma directa su estructura y su función para determinar qué gen es el responsable del fenotipo mutante original.

La genética humana presenta problemas y oportunidades especiales

Aunque la experimentación genética en humanos se considera poco ética y está penada legalmente, los humanos padecen de una gran variedad de trastornos genéticos. El análisis de ligamiento descrito, también puede utilizarse para identificar genes responsables de algunas enfermedades hereditarias. Estos estudios requieren que las muestras de DNA procedan de un gran número de familias afectadas por una misma enfermedad. Las muestras son examinadas para determinar la presencia de marcadores físicos, como los SNP, que parezcan estar íntimamente ligados al gen de la enfermedad y que sean heredados siempre por los individuos que manifiesten la enfermedad, pero no por sus parientes sanos. El gen responsable de la enfermedad se localiza como se ha descrito en el párrafo anterior (**Figura 8–58**). Por ejemplo, de esta forma se descubrieron los genes de la fibrosis quística o los de la corea de Huntington.

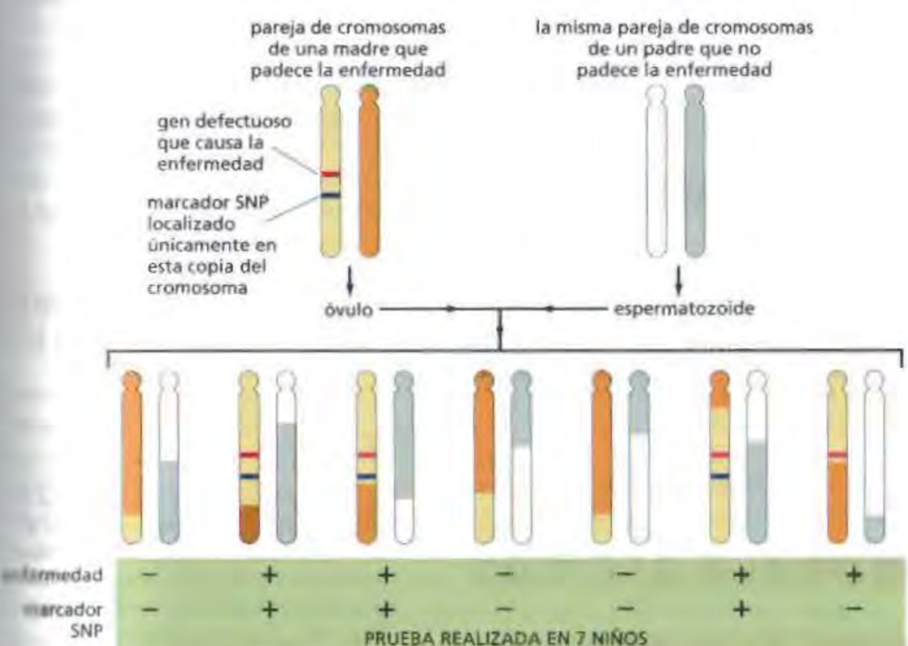
Los genes humanos se heredan en bloques haplotípicos que pueden facilitar la búsqueda de mutaciones que causen enfermedades

Ahora que conocemos la secuencia completa del genoma humano, podemos estudiar la genética humana de una manera que era imposible sólo hace unos cuantos años. Por ejemplo, se puede empezar a identificar aquellas diferencias en el DNA que distinguen un individuo de otro. Dos seres humanos no tienen el mismo genoma (con excepción de los gemelos idénticos). Cada uno de nosotros presenta una serie de polimorfismos –diferencias en la secuencia de nucleótidos– que nos hace únicos. Estos polimorfismos pueden ser usados como marcadores para la construcción de mapas genéticos y para la realización de análisis genéticos que permitan identificar polimorfismos particulares con enfermedades específicas o con cierta predisposición a una enfermedad.

El problema es que dos individuos normalmente difieren en alrededor de 0,1% de su secuencia de nucleótidos (1 nucleótido de cada 1000). Esto se traduce en la presencia de unos 3 millones de diferencias entre una persona y otra. Teóricamente, se necesitaría buscar entre todos estos 3 millones de polimorfismos para identificar uno o dos que fueran responsables de una enfermedad hereditaria en particular o su predisposición a padecerla. Para reducir el número de polimorfismos que hay que examinar, los investigadores sacan partido del reciente descubrimiento de que los genes humanos tienden a heredarse en bloques.

La especie humana es relativamente joven y parece que descendemos de una población pequeña que habitó en África hace unos 10.000 años. Debido a que sólo nos separan de esa antigua población unos centenares de generaciones, grandes segmentos de cromosomas humanos han pasado de padres a hijos de forma inalterada por sucesos de recombinación ocurridos durante la meiosis. De hecho, se pueden observar ciertos grupos de alelos (incluyendo los SNP) que son heredados en grandes bloques en los cromosomas. Estos segmentos cromosómicos ancestrales –juegos de alelos heredados en bloques con muy poco reordenamiento genético a través del paso de las generaciones– se denominan **bloques haplotípicos**. Como los genes, los SNP y otros marcadores genéticos, que existen en diferentes formas alélicas, los bloques haplotípicos también se presentan en un número limitado de variedades que son comunes en la población humana, cada una de las cuales representa una combinación alélica transmitida a partir de un ancestro común.

En la actualidad, los científicos están construyendo un mapa del genoma humano, basado en estos bloques haplotípicos, que se denomina **mapa haplotípico** (**hapmap**: ***haplotype map***). Los genetistas esperan que el mapa haplotípico humano facilite la búsqueda de genes responsables o susceptibles de causar enfermedades. En lugar de buscar a través de los muchos millones de SNP en la población humana, será suficiente buscar un grupo más pequeño de SNP seleccionados para identificar el bloque haplotípico que parezca heredarse con la enfermedad. Estas búsquedas aún requieren muestras de DNA de gran cantidad de individuos y los SNP se evalúan con técnicas robóticas. Si un bloque haplotípico es más común entre los individuos que padecen una enfermedad que en los sanos, la mutación asociada a este trastorno es posible que se localice en el mismo segmento de DNA (**Figura 8–59**). Los investigadores pueden situarse en una región específica del bloque para buscar el gen determinado asociado a la patología. En principio esta aproximación permite el análisis genético de esas enfermedades comunes en las que la susceptibilidad está generada por varios genes.



CONCLUSIÓN: el gen causante de la enfermedad se hereda conjuntamente con el marcador SNP de la madre portadora en el 75% de la descendencia que presenta la enfermedad. Si se observa la misma correlación en otras familias ya estudiadas, se podría afirmar que el gen causante de la enfermedad se encuentra en este cromosoma, localizado cerca del SNP. Nótese que un SNP que estuviese en el mismo cromosoma pero alejado del gen, o bien localizado en un cromosoma diferente que el del gen de interés, sólo sería heredado conjuntamente un 50% de las veces.

Figura 8–58 Análisis genético de ligamiento utilizando marcadores físicos en el DNA para encontrar un gen humano. En este ejemplo, se estudia la herencia conjunta de un fenotipo humano específico (en este caso concreto, una enfermedad hereditaria), con un marcador SNP. Si los individuos que presentan la enfermedad heredan casi siempre un SNP concreto, será probable que el gen responsable de la enfermedad y el SNP estén muy cercanos en el cromosoma, como se muestra aquí. Para comprobar que un determinado ligamiento es estadísticamente significativo, es posible que sea necesario examinar cientos de individuos. Obsérvese que el ligamiento no será absoluto a no ser que el SNP esté localizado en el propio gen. Por tanto, el SNP quedará algunas veces desligado del gen de la enfermedad debido al entrecruzamiento meyótico durante la formación del óvulo o del espermatozoide: esto es precisamente lo que ha sucedido en el caso de la pareja de cromosomas situados a la derecha. Cuando se trabaja con un genoma secuenciado, este proceso se repetiría con los SNP situados a cada lado del SNP inicial, hasta encontrar un 100% de herencia conjunta.

Obsérvese que tanto el óvulo como el espermatozoide sólo contribuirán con un cromosoma de cada par a la descendencia.

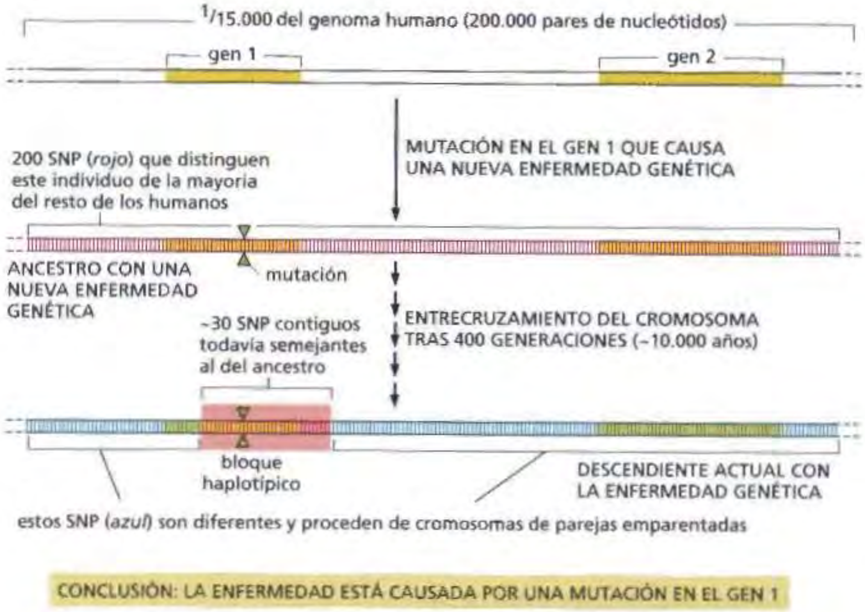


Figura 8-59 El seguimiento de la herencia de los SNP con un bloque haplotípico revela la localización de un gen causante de una enfermedad. Un ancestro que adquiere una mutación en el gen 1 causante de una enfermedad pasará la mutación a sus descendientes. Parte de este gen está incluido en un bloque haplotípico (*sombreado en rojo*) – un grupo de variaciones (unos 30 SNP) que se han heredado de su ancestro en un fragmento continuo. En las 400 generaciones que separan el ancestro del descendiente actual que padece la enfermedad, los SNP localizados en la región que se muestra del ancestro de más de 200.000 pares de nucleótidos han sido mezclados por recombinación meiótica en el genoma del descendiente (*azul*). La superposición de amarillo y rojo se ve de color *naranja*, y la de amarillo y azul se ve de color *verde*. Los 30 SNP del bloque haplotípico se han heredado como un grupo, ya que no se han separado aún por sucesos de entrecruzamiento. Para localizar un gen que causa una enfermedad hereditaria, los patrones de SNP tienen que ser analizados en varias personas que padecen la enfermedad. Un individuo con la enfermedad retendrá el patrón ancestral de los SNP localizado en el bloque haplotípico tal como se muestra, indicando que la mutación que causa la enfermedad está situada dentro del bloque haplotípico en el gen 1. La elegancia de usar mapas haplotípicos para este tipo de análisis por asociación es que sólo necesita ser examinada una pequeña fracción del total de SNP: se debería poder localizar los genes después de la búsqueda de solamente un 10% de los 3 millones de SNP útiles que están presentes en el genoma humano.

Una explicación detallada de los bloques haplotípicos puede determinar incluso si un alelo en particular ha sido favorecido por una selección natural. Como norma general, cuando un nuevo alelo de un gen no confiere ninguna ventaja selectiva al individuo, tardará mucho tiempo en hacerse común en la población. Cuanto más común y, por lo tanto, más antiguo es un alelo, más pequeño debería ser el bloque haplotípico que lo rodea. Esto es así ya que tendría muchas probabilidades de estar separado de sus variaciones cercanas por sucesos de recombinación que ocurren en la meiosis generación tras generación.

Un nuevo alelo puede extenderse rápidamente por una población siempre que confiera una gran ventaja al organismo. Por ejemplo, se pueden seleccionar mutaciones o variaciones que hagan que un organismo sea más resistente a una infección, ya que los organismos que presentan esta variación tienen más probabilidades de sobrevivir y pasar la mutación a su descendencia. Trabajando con mapas haplotípicos de genes individuales se ha comprobado que esta selección positiva se ha detectado en dos genes humanos que confieren resistencia

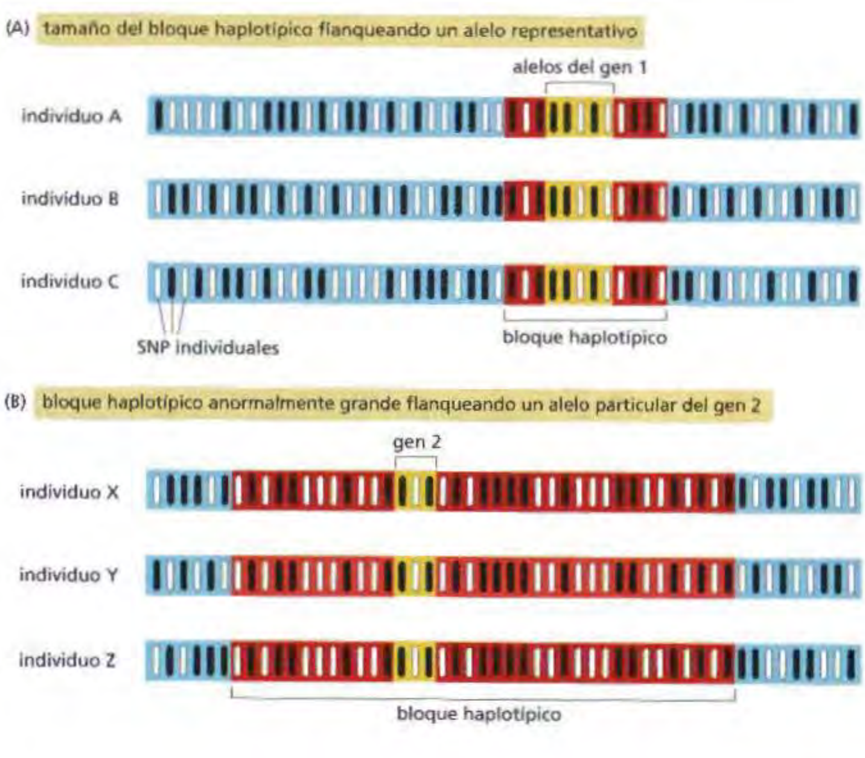


Figura 8-60 Identificación de alelos que se han seleccionado en humanos durante la historia reciente, ya que estaban incluidos en bloques haplotípicos anormalmente grandes. Los SNP están indicados en este diagrama por barras verticales, que se colorean en *blanco* y *negro* de acuerdo con su secuencia de DNA. Los bloques haplotípicos se sombrean en *rojo*, los genes en *amarillo* y el resto del cromosoma en *azul*. Los datos sugieren que este alelo del gen 2 se expresa de forma reciente en humanos.

a la malaria. Los alelos que confieren resistencia están extendidos en la población, pero se encuentran incluidos en bloques haplotípicos inusualmente grandes, lo que sugiere que su importancia aumentó de forma reciente en el genoma humano (**Figura 8–60**).

Al revelarnos las vías por las cuales evolucionaron los humanos, el mapa haplotípico proporcionará una nueva ventana sobre nuestro pasado y facilitará el descubrimiento de los genes que nos hacen susceptibles o resistentes a una enfermedad. El mapa también puede proporcionar una guía básica de nuestro futuro individual.

Múltiples genes influencian los rasgos complejos

Un pianista puede tener un tío que toca el violín. En otra familia, los padres y sus hijos puede que sean todos obesos. En una tercera familia, la abuela puede ser alcohólica y su nieto puede padecer una drogadicción. ¿Hasta qué punto estas características (habilidad musical, obesidad y adicción) se heredan genéticamente? Esta es una pregunta difícil de responder. Algunos rasgos o enfermedades se asocian a ciertas familias, pero sólo aparecen en algunos parientes o incluso lo hacen siguiendo un patrón difícil de detectar.

Las características que no siguen patrones simples de herencia (a veces denominados mendelianos), pero que tienen componentes heredados genéticamente, son denominados **rasgos complejos**. Estos caracteres son a menudo **poligénicos**, es decir, que están influenciados por varios genes, cada uno de los cuales contribuye al fenotipo en cuestión. El efecto de esos genes es aditivo, lo que significa que juntos producen una variabilidad continua de características en la población. Individualmente, los genes que contribuyen a un rasgo poligénico son distribuidos a la descendencia siguiendo patrones sencillos, sin embargo, dado que todos influencian el fenotipo, el patrón de los rasgos heredados por la descendencia es a menudo muy complejo.

Un ejemplo sencillo de rasgo poligénico es el color de los ojos, determinado por enzimas que controlan la distribución y la producción del pigmento melanina. Cuanta más melanina se produce, más oscuro es el color de los ojos. Debido a que numerosos genes contribuyen a la formación de la melanina, el color de los ojos en los humanos presenta una extensa gama de tonalidades, desde el gris más pálido al castaño más oscuro.

Aunque las enfermedades basadas en mutaciones de genes individuales (p. ej., la anemia falciforme y la hemofilia) fueron unos de los primeros fenotipos humanos heredados identificados, sólo una pequeña fracción de los rasgos humanos está gobernada por genes individuales. Los fenotipos humanos más obvios (desde la altura, el peso, el color de los ojos y del pelo hasta la inteligencia, el temperamento, la sociabilidad y el humor) son generados por la interacción de muchos genes. Muchos genes conllevan una predisposición a las enfermedades humanas más comunes: diabetes, cardiopatías, presión sanguínea elevada, alergias, asma y varias enfermedades mentales como la depresión severa y la esquizofrenia. Los científicos están explorando nuevas estrategias, que incluyen el uso de los mapas haplotípicos mencionados anteriormente, para entender las relaciones complejas entre los genes que actúan juntos determinando la mayoría de nuestros rasgos más "humanos".

La genética inversa empieza con un gen conocido y determina qué proceso celular necesita su función

Como hemos visto, la genética clásica empieza con un fenotipo mutante (o en el caso de los humanos, una serie de características) e identifica las mutaciones (y consecuentemente sus genes) responsables. La tecnología del DNA recombinante, en combinación con la secuenciación genómica, han hecho posible una aproximación genética diferente. En vez de empezar con un organismo mutante y usarlo para identificar un gen y su proteína, se parte de un gen determinado sobre el que se realizan las mutaciones, generando células u organismos en los que se estudiará la función del gen. Esta nueva aproximación invierte el sentido tradicional del análisis genético (del gen a los mutantes, y no al revés), por lo que habitualmente se le denomina **genética inversa**.

La genética inversa parte de un gen clonado, de una proteína aislada de una célula y que presente propiedades interesantes, o simplemente de una secuencia genómica. Si el punto de partida es una proteína, se identifica el gen que la codifica y en caso necesario, se determina su secuencia de nucleótidos. Posteriormente puede alterarse *in vitro* la secuencia génica para generar una versión mutante de la misma. El gen mutante, junto a una región re-

guladora apropiada, se transfiere a una célula donde puede integrarse a un cromosoma y pasar a formar parte de la dotación permanente del genoma celular. Todos los descendientes de la célula modificada tendrán ahora el gen mutado.

Si la célula original utilizada para la transferencia del gen es un óvulo fecundado, se podrá obtener un organismo completo que contenga el gen mutado, a no ser que la mutación sea letal para el organismo. En alguno de estos organismos, el gen mutado se incorporará a las células germinales –una *mutación de línea germinal*– permitiendo que el gen alterado pase a su progenie.



Figura 8–61 **Expresión ectópica incorrecta de Wnt, una proteína de señalización que afecta al desarrollo del eje corporal en el embrión temprano de *Xenopus*.** En este experimento, el mRNA que codifica Wnt fue inyectado en el blastómero vegetativo ventral, lo que indujo un segundo eje corporal (se describe en el Capítulo 22). (De S. Sokol et al., *Cell* 67:741-752, 1992. Con la autorización de Elsevier.)

Los genes se modifican de diferentes maneras

Los organismos mutantes que carecen de un determinado gen pueden revelar rápidamente la función de la proteína que este codifica. Por esta razón, un gen *knockout* –en el que las dos copias del gen han sido inactivadas o eliminadas en un organismo diploide– es un modelo particularmente útil de mutación. Sin embargo, existen muchos más tipos de alteraciones genéticas al alcance del investigador. Por ejemplo, alterando la región reguladora de un gen, antes de su reintegración en el genoma, se puede generar un organismo mutante en el que el producto génico se exprese en cantidades demasiado altas, en el tejido equivocado o en un momento equivocado del desarrollo (**Figura 8–61**). Situando el gen bajo el control de un *promotor inducible*, el gen se puede activar o inhibir a voluntad y observar sus efectos. Los promotores inducibles que funcionan de forma específica en un tejido se utilizan para seguir los efectos del bloqueo del gen (o de su activación) en ese tejido. Por último, en aquellos organismos en los que resulta más sencillo añadir un gen alterado al genoma que reemplazar con este gen los genes endógenos, se utilizan a menudo las mutaciones de *dominancia negativa*. La estrategia de los dominantes negativos aprovecha el hecho de que la mayoría de proteínas actúan como partes de unos grandes complejos proteicos. La inclusión de un solo componente no funcional puede inactivar todo el complejo. Por lo tanto, diseñando un gen que produzca grandes cantidades de una proteína mutante inactiva, pero con capacidad de unión al complejo, es posible producir una célula en la que todos los complejos estén inactivados, a pesar de la presencia de la proteína normal (**Figura 8–62**).

Como se ha tratado en la exposición anterior sobre genética clásica, si una proteína es necesaria para la supervivencia de una célula (u organismo), un mutante de dominancia negativa será inviable e impedirá el análisis de la función de la proteína. Para evitar este problema, en la genética inversa se puede acoplar el gen mutante a un promotor inducible para provocar la carencia del producto génico a voluntad, por ejemplo, en respuesta a un incremento de la temperatura o a la presencia de una molécula señalizadora determinada.

En el estudio de la acción de un gen y de la proteína que codifica, no siempre deseamos realizar cambios drásticos, tales como llenar las células con enormes cantidades de proteínas hiperactivas o eliminar por completo el producto de un gen. A veces es más útil realizar pequeños cambios en la estructura de la proteína, de modo que podamos empezar a vislumbrar qué porciones de la misma son importantes para su función. Por ejemplo, se puede estudiar la actividad de una enzima cambiando un solo aminoácido de su centro activo. Para alterar los genes de esta forma sutil se requieren técnicas especiales. Por lo general el primer paso consiste en la síntesis química de una molécula corta de DNA que contenga la porción alterada de la secuencia de nucleótidos del gen de interés. Este oligonucleótido de DNA sintético se hibrida con un plásmido de cadena sencilla que contenga la secuencia de



Figura 8–62 **Efecto dominante negativo de una proteína.** En el ejemplo, se modifica un gen para que produzca una proteína mutante que impida que las copias normales de la misma proteína realicen su función. En este caso, la proteína normal tiene que formar un complejo de varias subunidades para ser activo, y la proteína mutante bloquea la función, pues al unirse al complejo lo hace inactivo. De esta forma una sola copia de un gen mutante localizado en cualquier parte del genoma puede inactivar los productos normales producidos por otras copias génicas.

DNA que se quiere alterar, utilizando condiciones que permitan la unión de cadenas que no son exactamente complementarias entre sí. El oligonucleótido sintético servirá de cebador para la síntesis de DNA por parte de la polimerasa del DNA, generando una doble hélice de DNA que incorpora la secuencia alterada en una de sus dos cadenas. Después de una transfección, se obtienen plásmidos que contienen la secuencia génica modificada por completo. El DNA apropiado se inserta en un vector de expresión, de modo que la proteína diseñada pueda ser producida en el tipo celular apropiado para el estudio detallado de su función. Al cambiar de esta manera los aminoácidos que hemos seleccionado de una proteína –una técnica que se conoce como **mutagénesis dirigida**– podemos determinar con precisión qué partes de la cadena polipeptídica son importantes para procesos como el plegamiento de la proteína, la interacción con otras proteínas o la catálisis enzimática (Figura 8–63).

Los genes modificados se pueden insertar en la línea germinal de muchos organismos

Los genes modificados se introducen en las células de diferentes maneras. El DNA puede microinyectarse en las células de mamífero con una micropipeta de vidrio o puede ser introducido utilizando un virus modificado capaz de transportar genes foráneos. Frecuentemente los genes se introducen en las células vegetales mediante una técnica denominada bombardeo de partículas: las muestras de DNA se disponen sobre minúsculas cuentas de oro y son literalmente disparadas sobre la pared vegetal con una pistola adaptada especial-

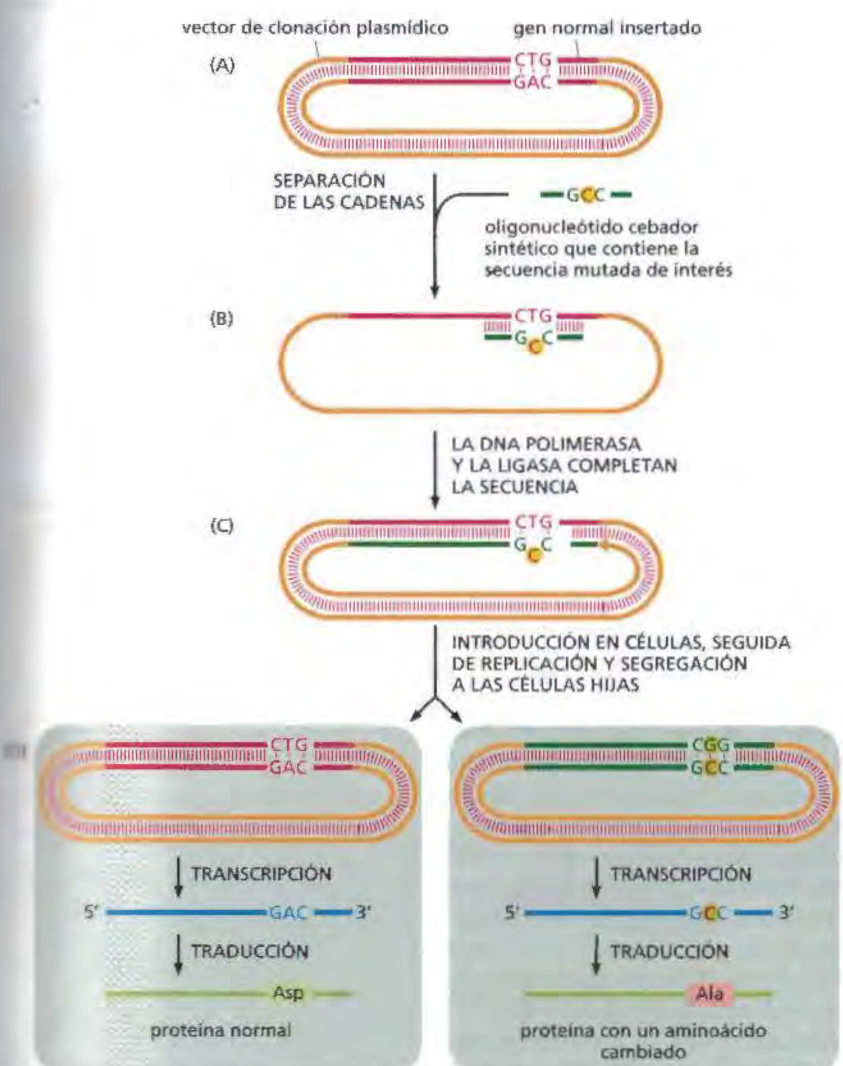


Figura 8–63 Utilización de un cebador oligonucleótido sintético para modificar la región codificante de un gen por mutagénesis dirigida. (A) Un plásmido recombinante que contiene el inserto génico, se separa en sus dos cadenas de DNA. Un cebador oligonucleótido sintético, que corresponde a parte de la secuencia del gen pero que contiene un nucleótido alterado en un punto predeterminado, se añade a la cadena sencilla de DNA bajo condiciones que permiten una hibridación imperfecta del DNA (véase Figura 8-36). (B) El cebador se hibrida con el DNA, quedando un par de nucleótidos desapareados. (C) El plásmido recombinante se convierte a DNA de doble cadena mediante una reacción de síntesis *in vitro* de DNA que parte del cebador, y que concluye con la unión del plásmido por parte de la DNA ligasa. (D) El DNA de doble cadena se introduce en células, donde será replicado. La replicación de una de las cadenas del molde produce una molécula normal de DNA, mientras que la replicación de la otra cadena (la que contiene el cebador) produce una molécula de DNA que lleva la mutación deseada. Sólo la mitad de las células de la progenie tendrán un plásmido con el gen mutado. Sin embargo, las células que contengan este gen podrán ser identificadas, separadas del resto y cultivadas para producir una población pura en la que todas las células contengan el gen mutante. En este ejemplo se muestra sólo una de las múltiples aplicaciones experimentales de esta técnica. Con un oligonucleótido de secuencia apropiada, se puede realizar más de una sustitución de aminoácido cada vez, o se puede añadir o eliminar uno o más aminoácidos. Aunque no se muestra en la figura, también es posible generar una mutación dirigida utilizando los oligonucleótidos apropiados y la técnica de PCR (en vez de utilizar la replicación del plásmido) para amplificar el gen mutado.

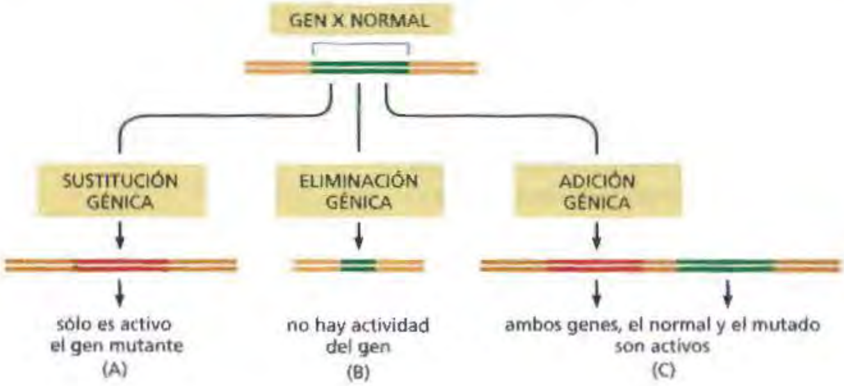


Figura 8–64 Sustitución, eliminación y adición de genes. Un gen normal puede ser alterado de diferentes formas en un organismo modificado genéticamente. (A) El gen normal (*verde*) puede ser sustituido por una copia mutada del gen (*rojo*). La modificación anterior proporciona información sobre la actividad del gen mutante sin interferencia por parte del gen normal y, por tanto, hace posible determinar los pequeños y sutiles efectos de las mutaciones. (B) El gen normal puede ser inactivado por completo, por ejemplo realizando en él una gran deleción. (C) El gen mutante también puede simplemente añadirse al genoma. En algunos organismos esta es la manipulación genética más sencilla de realizar. Esta aproximación puede proporcionar información útil cuando la función del gen mutante introducido anula a la del gen normal, ya que actúa como una mutación con dominancia negativa (véase Figura 8-62).

mente. La *electroporación* es el método de elección utilizado para introducir DNA en bacterias y en algunas otras células; en esta técnica, un pulso eléctrico corto provoca que la membrana se vuelva transitoriamente permeable y permite así que el DNA exógeno pase hasta el citoplasma.

A diferencia de los eucariotas superiores (que son pluricelulares y diploides), las bacterias, las levaduras y el hongo filamentoso *Dictyostelium*, generalmente, son células individuales haploides. En estos organismos, una molécula de DNA introducida de forma artificial, que contenga un gen mutante, puede sustituir con una frecuencia relativamente elevada a la copia única del gen normal mediante recombinación homóloga, facilitando la obtención de células en las que el gen mutante ha sustituido al gen normal (**Figura 8–64**A). De esta forma es posible generar células que carezcan de una proteína específica o que produzcan una forma alterada de ésta. La posibilidad de realizar sustituciones génicas en eucariotas inferiores, unido a la potencia del análisis génico estándar en estos organismos haploides, son las razones que explican en gran parte por qué los estudios sobre estos organismos han sido tan importantes para desentrañar los procesos comunes a todos los eucariotas.

Los animales pueden ser alterados genéticamente

Las adiciones o sustituciones génicas son posibles, pero más difíciles de realizar en animales y plantas. Los animales y las plantas genéticamente modificados por inserción génica, deleción o sustitución se denominan **organismos transgénicos** y cualquier gen modificado o foráneo que sea añadido se llama **transgén**. La exposición se centrará en los ratones transgénicos, ya que se han conseguido enormes progresos en esta área. Si en una célula de ratón se introduce una molécula de DNA que contenga un gen mutado de ratón, por lo general esta molécula se insertará al azar en los cromosomas, pero una vez de cada mil reemplazará a una de las dos copias del gen normal mediante recombinación homóloga. Aprovechando estos fenómenos infrecuentes de "direccionamiento génico" es posible alterar o inactivar cualquier gen en una célula de ratón mediante sustitución directa del gen. En aquellos casos en los que el gen de interés queda inactivado o delecionado, el animal resultante se denomina **ratón nulo** (***knockout***)

La técnica funciona del siguiente modo: en primer lugar, el fragmento de DNA que contiene el gen mutado deseado (o un fragmento de DNA diseñado para interrumpir el gen diana) se inserta en un vector y se introduce en células madre embrionarias en cultivo ES (véase Figura 8–5), que son capaces de producir células de diferentes tipos de tejido. Tras un periodo de proliferación celular, se aíslan las escasas colonias de células en las que se ha producido una sustitución génica. De entre ellas se identifican las colonias correctas mediante PCR o transferencia de tipo Southern: contendrán secuencias de DNA recombinante en las que el fragmento insertado ha reemplazado todo o parte de una de las copias del gen normal. En la segunda etapa, se recogen las células ES de la colonia identificada una a una con una micropipeta y se inyectan en un embrión temprano de ratón. Las células ES transfectadas colaboran con las células del embrión huésped formando un ratón de apariencia normal; un gran número de tejidos de estos animales quiméricos, incluyendo las células de la línea germinal en los casos favorables, proceden de las células ES transfectadas (**Figura 8–65**).

Los animales con el transgén en su línea germinal se cruzan para obtener machos y hembras heterozigotos para la sustitución génica (es decir, tienen una copia normal y una

copia mutante del gen). Cuando se cruzan estos dos ratones, una cuarta parte de su descendencia será homozigota para el gen modificado. El estudio de estos homozigotos permite examinar la función del gen modificado –o los efectos de la eliminación de la actividad del gen– en ausencia de su correspondiente gen normal.

La posibilidad de producir ratones transgénicos que carezcan de un gen normal conocido ha supuesto un gran avance y en la actualidad esta técnica se está utilizando para diseccionar las funciones de un gran número de genes de mamífero (**Figura 8–66**). Para producir mutantes condicionales se pueden utilizar técnicas relacionadas con la anterior, de las que el gen seleccionado se encuentra alterado en un tejido determinado y en un momento concreto del desarrollo. Esta estrategia aprovecha un sistema de recombinación específica para escindir –y por tanto inactivar– el gen diana en un lugar o en un momento concreto. Entre los diferentes sistemas de recombinación, el más habitual –denominado **Cre/lox**– está siendo ampliamente utilizado para generar sustituciones génicas en ratones y en plantas (véase Figura 5–79). En este caso concreto, el gen diana de las células ES se susti-

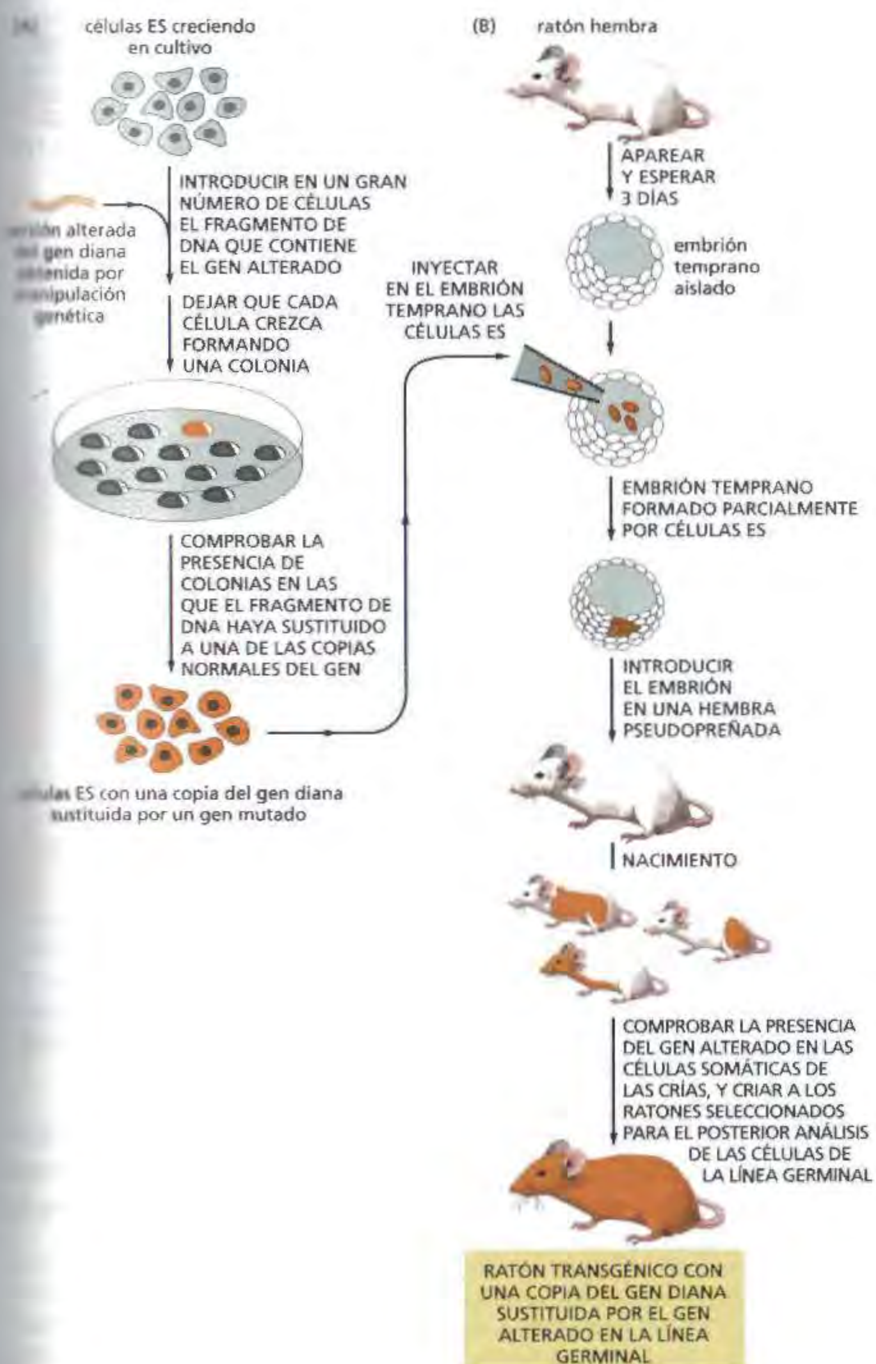


Figura 8–65 Resumen de los diversos procedimientos utilizados para realizar sustituciones génicas en ratón. En primer lugar (A), se introduce una versión alterada del gen en células madre embrionarias (ES). Aunque de forma poco frecuente, algunas células ES presentarán la sustitución de uno de sus genes por el gen alterado, debido a un proceso de recombinación homóloga. A pesar de que generalmente el procedimiento es laborioso, estas células pueden ser identificadas y cultivadas, obteniéndose una descendencia en la que cada célula portará, en una de las dos copias del gen normal, una versión alterada del mismo. En el siguiente paso del procedimiento (B), las células ES alteradas se inyectan en un embrión temprano de ratón y son incorporadas al embrión en crecimiento. El ratón resultante contendrá algunas células somáticas (indicadas de color *naranja*) que llevarán el gen alterado. Algunos de estos ratones también presentarán células de la línea germinal con el gen alterado; al cruzarlos con un ratón normal, parte de la progenie de estos ratones contendrá la versión alterada del gen en todas sus células. Si se cruzan dos de estos ratones (no mostrado en la figura), parte de la progenie contendrá en todas sus células dos copias del gen alterado (una en cada cromosoma).

Si la alteración original del gen inactiva por completo su función, los ratones resultantes se conocen como ratones *knockout*. Cuando en estos ratones se inactivan genes que actúan durante el proceso de desarrollo, los individuos suelen morir antes de llegar a la madurez y presentan defectos característicos. Estos defectos se pueden analizar cuidadosamente para descifrar la función normal del gen ausente.



Figura 8–66 Ratón transgénico modificado para expresar un DNA helicasa mutante y que presenta envejecimiento prematuro. La helicasa, codificada por el gen *Xpd*, está involucrada en los procesos de transcripción y reparación del DNA. Comparado con el ratón salvaje de la misma edad (A), un ratón transgénico que exprese la versión defectuosa de *Xpd* (B) presenta muchos síntomas de envejecimiento prematuro, incluyendo osteoporosis, adelgazamiento extremo, decoloración capilar, infertilidad y reducción de la esperanza de vida. La mutación *Xpd* utilizada en este ejemplo bloquea la actividad de la helicasa y mimetiza una mutación que en humanos causa tricotiodistrofia, una enfermedad que se caracteriza por presentar el pelo quebradizo, anormalidades esqueléticas y una reducción de la esperanza de vida. Estos resultados indican que una acumulación de daños en el DNA puede contribuir al proceso del envejecimiento en humanos y ratones. (De J. De Boer et al., *Science* 296:1276-1279, 2002. Con la autorización de AAAS.)

tuye por una versión completamente funcional del gen que se encuentra flanqueado por un par de secuencias cortas de DNA, llamadas *sitios lox*, que son reconocidas por la proteína *recombinasa Cre*. Los ratones transgénicos resultantes son fenotípicamente normales y se cruzan con ratones transgénicos que expresan el gen de la recombinasa Cre bajo el control de un promotor inducible. En aquellas células o tejidos determinados en los que Cre se encuentre activada, esta proteína catalizará la recombinación entre las secuencias lox, escindiendo el gen diana y eliminando su actividad. Para generar mutantes condicionales en *Drosophila* se utilizan sistemas de recombinación similares a éste (véase Figura 22–49).

Las plantas transgénicas son importantes tanto para la biología celular como para la agricultura

Cuando una planta sufre un daño, a menudo puede autorepararlo mediante un proceso por el cual algunas células diferenciadas se "desdiferencian", proliferan y se rediferencian en otros tipos celulares. En algunos casos, las células desdiferenciadas pueden llegar a formar un meristemo apical, capaz de generar una planta completamente nueva, incluyendo los gametos. Esta notable plasticidad de las células vegetales se puede utilizar para generar plantas transgénicas a partir de células cultivadas.

Cuando se cultiva un trozo de tejido de una planta en un medio estéril que contiene nutrientes y factores de crecimiento adecuados, muchas de las células son estimuladas a crecer indefinidamente de una forma desorganizada, produciendo una masa de células relativamente indiferenciadas denominada *callo*. Si se manipulan de forma adecuadalos nutrientes y los factores reguladores del crecimiento, es posible inducir la formación de meristemos apicales y radiculares en el callo, pudiendo en muchas especies, regenerar la planta completa.

Los cultivos de callos se pueden disociar también mecánicamente en células aisladas, que crecerán y se dividirán como un cultivo en suspensión. En un gran número de plantas –entre las que se incluyen el tabaco, la petunia, la zanahoria, la patata y *Arabidopsis*– se puede hacer crecer una sola célula de este tipo de cultivo hasta formar un pequeño grupo de células (un clon), a partir del cual se puede regenerar una planta completa. Este tipo de célula se considera **pluripotente**, ya que es capaz de generar todas las partes del organismo. Del mismo modo que se puede obtener un ratón transgénico por manipulación genética de células embrionarias en cultivo, pueden obtenerse plantas transgénicas a partir de cultivos de células vegetales pluripotentes transfectadas con DNA (**Figura 8–67**).

La capacidad de producir plantas transgénicas ha acelerado el progreso en muchas áreas de la biología celular vegetal. Por ejemplo, ha desempeñado un papel importante en el aislamiento de receptores para los reguladores del crecimiento y en el análisis de los mecanismos de morfogénesis y de expresión génica en plantas. Ha abierto nuevas posibilidades en la agricultura que pueden beneficiar tanto al agricultor como al consumidor. Por ejemplo, ha hecho posible modificar el contenido de lípidos, almidón y proteínas de reserva almacenadas en las semillas, aumentar la resistencia de las plantas a plagas y a virus y generar plantas modificadas que toleran hábitats extremos como marismas o suelos encharcados.

Muchos de los avances realizados en la comprensión del desarrollo animal proceden de estudios sobre la mosca del vinagre *Drosophila* y del gusano nematodo *C. elegans*, en los que es fácil de abordar un análisis genético completo y la manipulación experimental no resulta demasiado complicada. Los progresos en la biología del desarrollo de las plantas han sido comparativamente mucho más lentos. La mayor parte de las plantas que han demostrado ser adecuadas para el análisis genético –tales como el maíz y el tomate–, tienen ciclos vitales largos y genomas enormes, lo que hace que el estudio genético, tanto clásico como molecu-

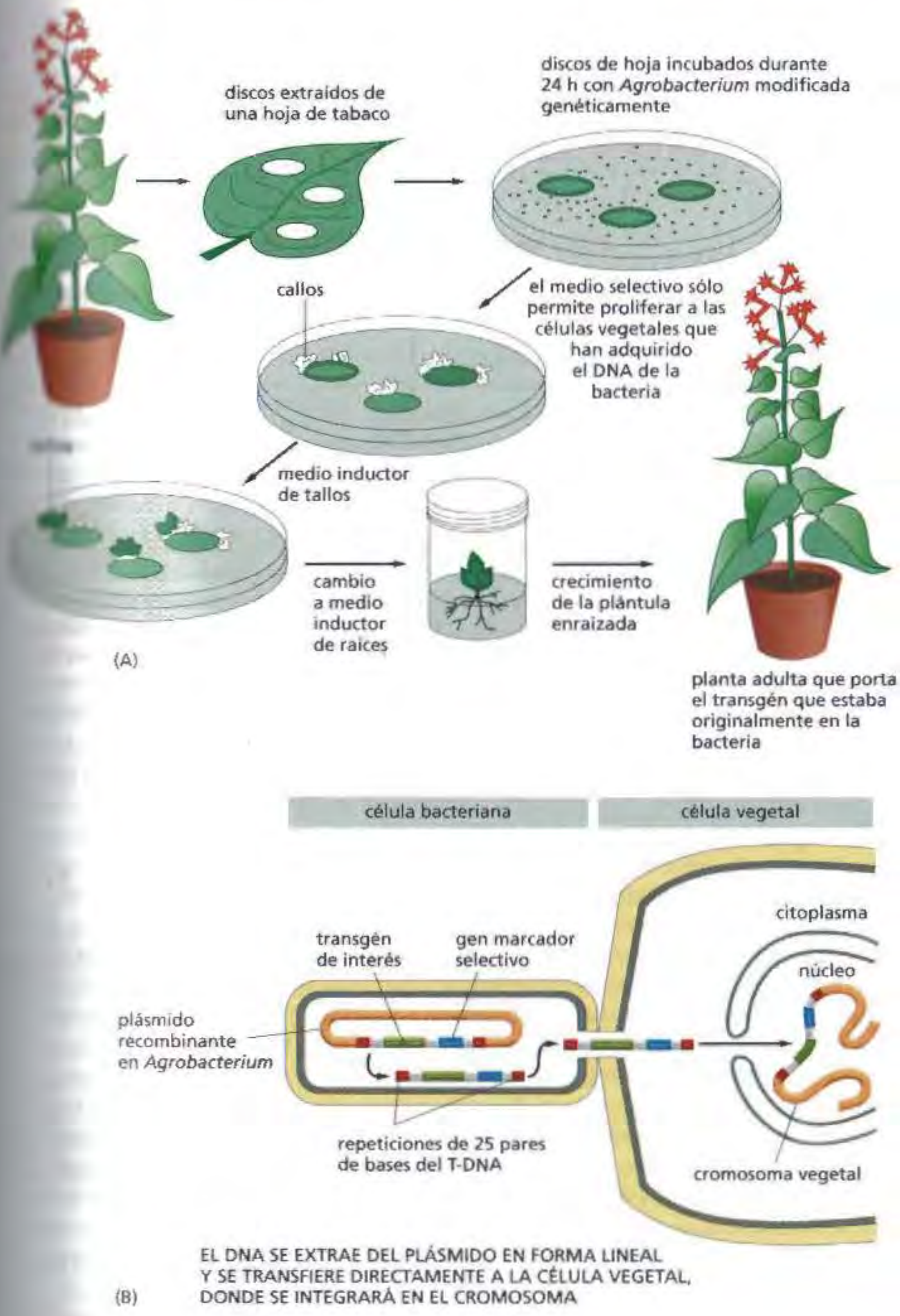


Figura 8–67 Procedimiento utilizado para obtener una planta transgénica.
(A) Esquema del proceso. Se corta un disco de una hoja y se cultiva en presencia de *Agrobacterium* portadora de un plásmido que contiene tanto un marcador selectivo como el transgén deseado. Las células heridas de la periferia del disco secretan sustancias que atraen a *Agrobacterium*, que inyecta el DNA en estas células. Sólo sobreviven, proliferan y forman un callo las células que expresan el marcador selectivo, es decir, aquellas que han recibido el DNA adecuado. Manipulando los factores de crecimiento que recibe el callo, se puede inducir la formación de tallos, que enraizarán y se desarrollarán dando lugar a una planta adulta portadora del transgén.
(B) Preparación del plásmido recombinante y su transferencia a la célula de la planta. Un plásmido de *Agrobacterium* portador de la secuencia T-DNA, se modifica para incluir entre los 25 pares de bases repetidos del T-DNA un marcador selectivo (como, p. ej., el gen de resistencia a kanamicina) y el transgén deseado. Cuando *Agrobacterium* reconoce a una célula vegetal, es capaz de pasar de forma eficiente la cadena de DNA que transporta estas secuencias, utilizando los mecanismos que transfieren la secuencia T-DNA del plásmido.

se requiera mucho tiempo. Por ello se ha dedicado especial atención a una planta pequeña de crecimiento rápido (*Arabidopsis thaliana)* que tiene grandes ventajas como "planta modelo" (véase Figuras 1–46 y 22–112). El genoma relativamente pequeño de *Arabidopsis* fue el primer genoma vegetal secuenciado de forma completa; en la actualidad, el avance de la investigación de este organismo rivaliza con la de los modelos animales.

Las grandes colecciones de animales nulos *(knockouts)* marcados proporcionan una herramienta para el análisis de la función de cada uno de los genes de un organismo

Se están realizando grandes esfuerzos de colaboración con el objetivo de generar extensas bibliotecas de mutaciones en diferentes organismos modelo, incluyendo *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *Drosophila*, *Arabidopsis* y el ratón. En cualquier caso, la finalidad es producir una colección de cepas mutantes en las que cada gen del organismo haya sido eliminado siste-

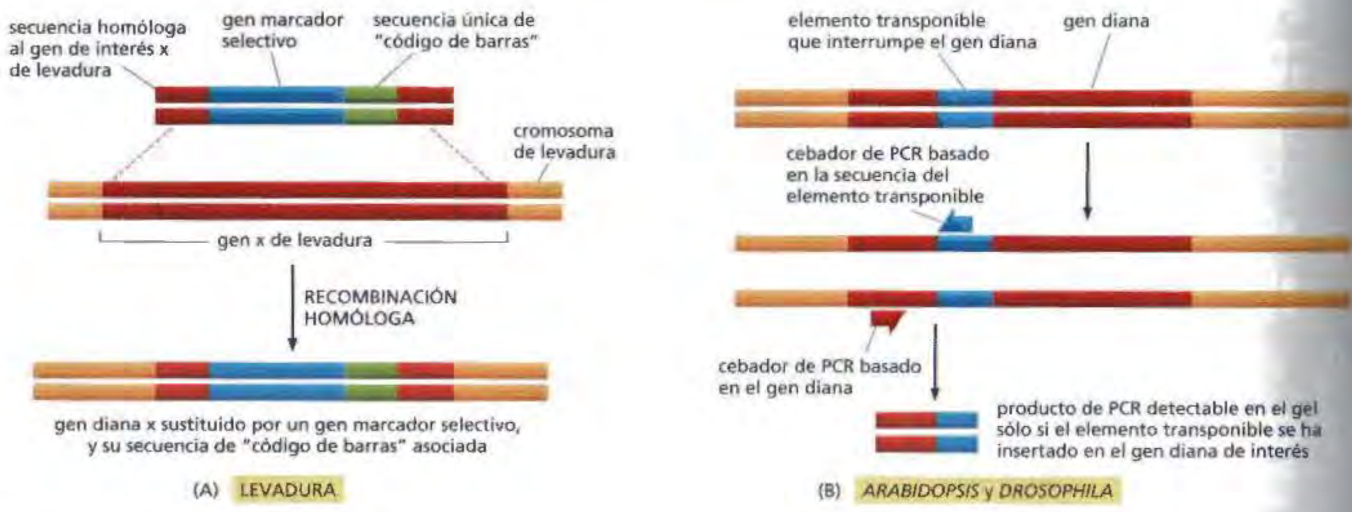


Figura 8–68 Preparación de colecciones de organismos mutantes. (A) El casete de deleción utilizado en levaduras contiene secuencias homólogas a los extremos del gen diana x (en *rojo*), un gen marcador selectivo (en *azul*) y una secuencia característica de "código de barras" de aproximadamente 20 pares de bases de longitud (en *verde*). Este DNA se introduce en la levadura, donde sustituye al gen diana por recombinación homóloga. Mediante el uso de una colección de casetes, cada uno específico para un gen, se puede construir una biblioteca de mutantes de levadura que contenga un mutante para cada gen. (B) Un procedimiento parecido puede utilizarse para preparar organismos *knockout* marcados en *Drosophila* y en *Arabidopsis*. Los mutantes se generan en este caso mediante la inserción accidental de un elemento transponible en el gen diana. Para comprobar la interrupción del gen de interés, se puede recoger el DNA total del organismo y analizarlo utilizando cebadores de PCR que se unan al elemento transponible y al gen diana. Sólo se detectará un producto de PCR en el gel, si el elemento transponible se ha insertado en el gen diana (véase Figura 8-45).

máticamente o alterado de forma que pueda ser interrumpido bajo determinadas condiciones. Las colecciones de este tipo proporcionarán una herramienta valiosa para la investigación de la función génica a escala genómica. En algunos casos, cada uno de los mutantes de una colección presentará una marca molecular diferente –una secuencia única de DNA diseñada para permitir una identificación rápida y rutinaria del gen alterado.

En *S. cerevisiae*, la tarea de generar un conjunto de 6000 mutantes en los que cada uno de ellos carece sólo de un gen, se ve facilitada en parte por la elevada frecuencia del proceso de recombinación homóloga en esta especie. En primer lugar, para cada uno de los genes se prepara un "casete de deleción". Este casete consiste en una molécula especial de DNA que contiene 50 nucleótidos cuya secuencia es idéntica a la de cada extremo del gen diana, situadas flanqueando un marcador selectivo. En esta molécula de DNA se incluye además una marca que consiste en una secuencia de "código de barras" especial, que facilita la rápida identificación posterior de cada una de las cepas mutantes resultantes (**Figura 8–68**). A continuación se puede hacer crecer una mezcla de estos mutantes bajo diferentes condiciones selectivas –tales como la privación nutricional, los cambios en la temperatura o la presencia de diferentes fármacos–, que permiten identificar con rapidez las células que sobreviven gracias a sus marcas moleculares características. Estudiando el comportamiento de cada uno de los mutantes, podremos empezar a valorar qué genes son esenciales, útiles o irrelevantes para el crecimiento bajo diferentes condiciones.

El reto que supone la información obtenida del estudio de dichos mutantes estriba en deducir el papel biológico o la actividad de un gen basándose en un fenotipo mutante. Algunas deficiencias apuntan directamente a la función del gen salvaje, como por ejemplo la incapacidad de la célula para vivir sin histidina. Sin embargo, a veces las relaciones no resultarán tan obvias: ¿qué indicaría una sensibilidad repentina a la temperatura respecto al papel que tiene un determinado gen en la célula de levadura? Estos problemas son aún mayores en organismos de mayor complejidad que la levadura. Por ejemplo, la pérdida de la funcionalidad de un gen en el ratón puede afectar a diversos tipos de tejido en diferentes momentos del desarrollo, mientras que la pérdida de otros genes no parece tener ningún efecto claro. A menudo la apropiada caracterización de los ratones mutantes requiere un examen detallado, que debe ir acompañado de un amplio conocimiento de la anatomía, la histología, la patología, la fisiología y el complejo comportamiento del ratón.

Sin embargo, los conocimientos generados por el análisis de las bibliotecas de mutantes son cuantiosos. Por ejemplo, los estudios de una extensa colección de mutantes de *Mycoplasma genitalium* –el organismo con el genoma conocido de menor tamaño– han identifi-

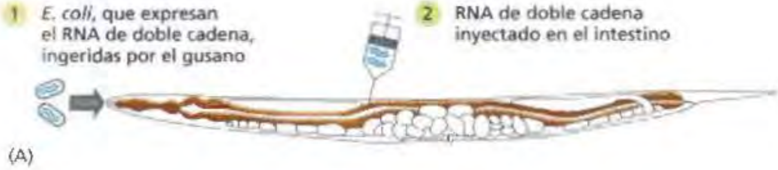
sólo el mínimo complemento de genes esenciales para la vida celular. El análisis del conjunto de mutantes sugiere que aproximadamente las tres cuartas partes de los 480 genes codificantes de *M. genitalium* son necesarios para el crecimiento bajo condiciones de laboratorio. Se desconoce la función de cerca de 100 de estos genes esenciales, lo que sugiere que todavía faltan por descubrir un sorprendente número de mecanismos moleculares básicos que subyacen a la vida de las células.

El RNA de interferencia es una manera sencilla y rápida de estudiar la función génica

Aunque eliminar un gen de un organismo y estudiar sus consecuencias es quizás la aproximación más potente para entender la función de un gen, recientemente se ha descubierto una manera más fácil de inactivar genes. El denominado **RNA de interferencia** (abreviadamente RNAi) aprovecha un mecanismo natural que utilizan numerosas plantas, animales, hongos y protozoos para protegerse contra virus y elementos cambiantes (véase la Figura 7-115). Mediante esta técnica se introduce una molécula de RNA de doble cadena dentro de una célula u organismo y la secuencia de esta molécula reconoce una parte del gen que se quiere inactivar. Una vez se procesa el RNA, se hibrida con el mRNA producido por el gen diana y conduce a su degradación. A continuación la célula usa los pequeños fragmentos de este RNA degradado para producir más RNA de doble cadena, los cuales dirigen la eliminación continua del RNA diana. Debido a que estos fragmentos cortos de RNA pueden transmitirse a la población, el RNAi puede causar cambios en la expresión génica que se pueden heredar. Sin embargo, como se ha descrito en el Capítulo 7, existe un segundo mecanismo por el cual el RNAi puede inactivar genes de una manera estable. Los fragmentos de RNA que se producen por degradación en el citoplasma pueden entrar en el núcleo e interaccionar directamente con el gen diana, dirigiendo su empaquetamiento a una forma de cromatina reprimida transcripcionalmente. Este modo dual de controlar la expresión génica hace que los RNAi sean unas herramientas muy efectivas para la inactivación génica.

El RNAi es utilizado con frecuencia para inactivar genes en *Drosophila* y en líneas celulares de mamífero en cultivo. De hecho, en cuestión de varios meses, juegos de 15.000 moléculas de RNAi de *Drosophila* (una por cada gen) han permitido analizar el papel de cada gen de la mosca en cualquier proceso que pueda ser controlado utilizando células en cultivo. En breve será posible realizar el mismo tipo de análisis con los 25.000 genes de ratón o de los humanos. La técnica RNAi ha sido muy utilizada para estudiar la función génica en el nematodo *C. elegans*. Resulta relativamente sencillo introducir RNA de doble cadena en gusanos: el RNA puede ser inyectado de forma directa en el intestino del animal o se puede alimentar al gusano con *E. coli* que exprese el RNA del gen diana (**Figura 8-69**). El RNA se distribuye por todo el cuerpo del gusano e inhibe la expresión del gen diana en diferentes tipos de tejido. Dado que se ha secuenciado el genoma completo de *C. elegans*, la técnica de RNAi está siendo de gran utilidad en la asignación de funciones de la dotación génica completa de este gusano.

Más recientemente, una técnica relacionada con ésta ha sido también aplicada al ratón. En este caso, el RNAi no se inyecta ni se le da de comer al ratón. Por el contrario, se uti-



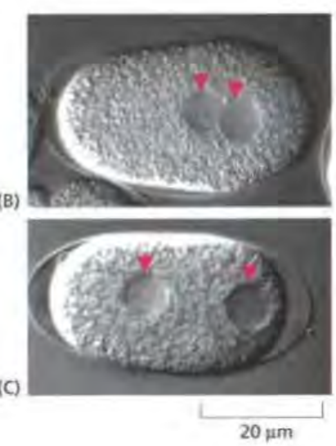


Figura 8-69 Mutaciones negativas dominantes generadas por RNA de interferencia. (A) El RNA de doble cadena (dsRNA: ***double-stranded* RNA**) puede ser introducido en *C. elegans* (1) alimentando a los gusanos con *E. coli* que expresen el dsRNA, o bien (2) inyectando directamente el dsRNA en el intestino. (B) Embriones de gusano de fenotipo salvaje poco tiempo después de que el huevo ha sido fecundado. Los pronúcleos del óvulo y del espermatozoide (marcas *rojas*) migran juntos a la parte media posterior del embrión. (C) Embrión de gusano en el que se ha inactivado, mediante RNA de interferencia, un gen que está implicado en la división celular. Los dos pronúcleos no migran. (B y C, de P. Gönczy et al., *Nature* 408:331-336, 2000. Con la autorización de Macmillan Magazines Ltd.)

lizan técnicas de DNA recombinante para generar animales transgénicos que expresan RNAi bajo el control de promotores inducibles. A menudo, este RNA diseñado especialmente puede doblarse sobre sí mismo y, a través del apareamiento de bases, producir una región de doble cadena. Dependiendo del promotor inducible utilizado, el RNAi puede producirse únicamente en un tejido específico o en un único momento durante el desarrollo, permitiendo que las funciones de los genes dianas puedan ser analizadas en detalle.

El RNAi ha hecho que la genética inversa sea simple y eficiente en muchos organismos, aunque presenta varias limitaciones potenciales en comparación con los organismos verdaderamente deficientes en su genética. Por razones desconocidas, los RNAi no inactivan todos los genes. Además, en organismos enteros, ciertos tejidos pueden ser resistentes a la acción de los RNAi (p. ej. las neuronas de los nematodos). Otro problema es el hecho de que muchos organismos tienen grandes familias génicas, cuyos miembros presentan homologías en sus secuencias. En estos casos, los RNAi a veces producen efectos no deseados de inactivación en genes relacionados además de en el gen diana. Una estrategia para evitar estos problemas es el uso de varias moléculas de RNA pequeñas que reconozcan diferentes regiones de un mismo gen. En última instancia, los resultados de cualquier experimento de RNAi deben ser contemplados como una fuerte evidencia, pero no necesariamente como una prueba de una función génica correcta.

Los genes marcadores y la hibridación *in situ* revelan dónde y cuándo se expresa un gen

A menudo, el estudio del lugar y del momento en el que un gen determinado se expresa en la célula o en el organismo proporciona pistas importantes sobre la función de este gen. La determinación del patrón y del momento de expresión de un gen puede realizarse reemplazando la porción codificante del gen estudiado por un gen marcador. En la mayoría de los casos, la expresión del gen marcador se estudia siguiendo la fluorescencia o la actividad enzimática de su producto proteico (véase Figuras 9–26 y 9–27).

Como se describió en detalle en el Capítulo 7, la expresión génica está controlada por secuencias de DNA reguladoras, situadas en sentido 5' o 3' de la región codificante. Estas secuencias reguladoras, que determinan exactamente cuándo y dónde se expresa un gen, pue-

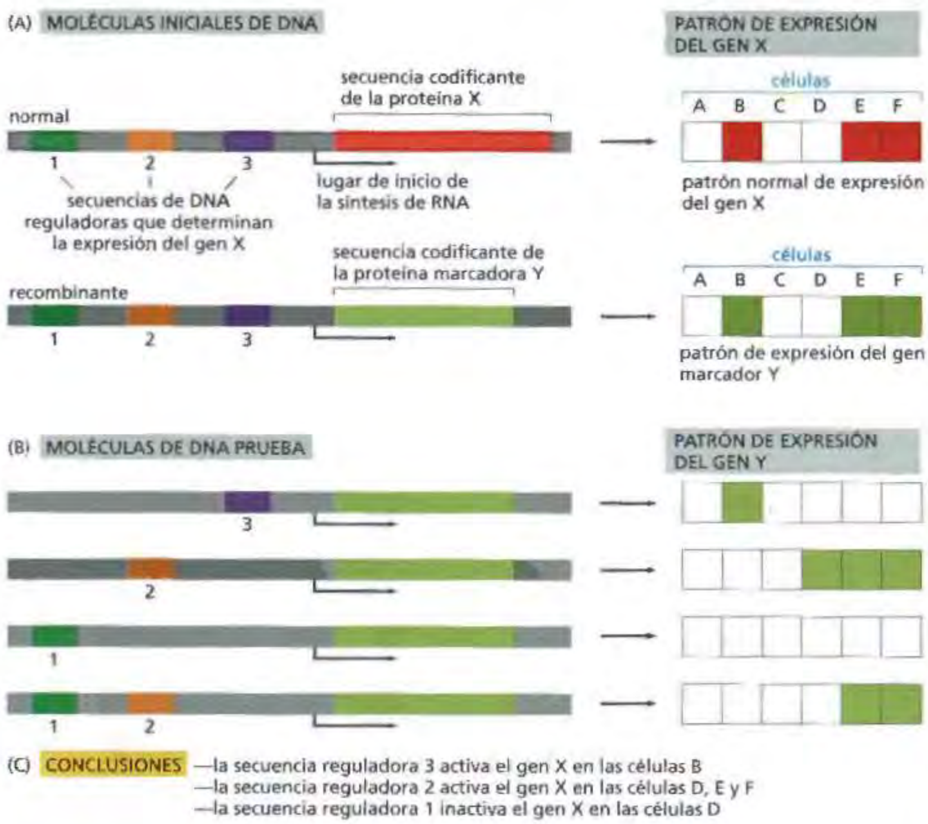


Figura 8–70 Utilización de una proteína marcadora para determinar el patrón de expresión de un gen. (A) En este ejemplo, la secuencia codificante de la proteína X se reemplaza por la secuencia codificante de la proteína marcadora Y. El patrón de expresión de X y de Y es el mismo. (B) Para producir moléculas de DNA que codifiquen el gen marcador Y se añaden diferentes combinaciones de fragmentos de DNA que contienen secuencias candidatas a ser reguladoras. Después de ser transfectadas en una colección de células de mamífero, se mide la capacidad de expresión de las moléculas recombinantes; los resultados se muestran en (C).

En los estudios realizados en células eucariotas, se suelen utilizar dos genes marcadores: la enzima β-galactosidasa (*β-gal*) (véase Figura 7-55B) y la proteína verde fluorescente (GFP) (véase Figura 9–26). La Figura 7–55B muestra un ejemplo en el que se utiliza el gen del receptor de *β-gal* para estudiar la actividad de la secuencia reguladora del gen *Eve* en un embrión de *Drosophila*.

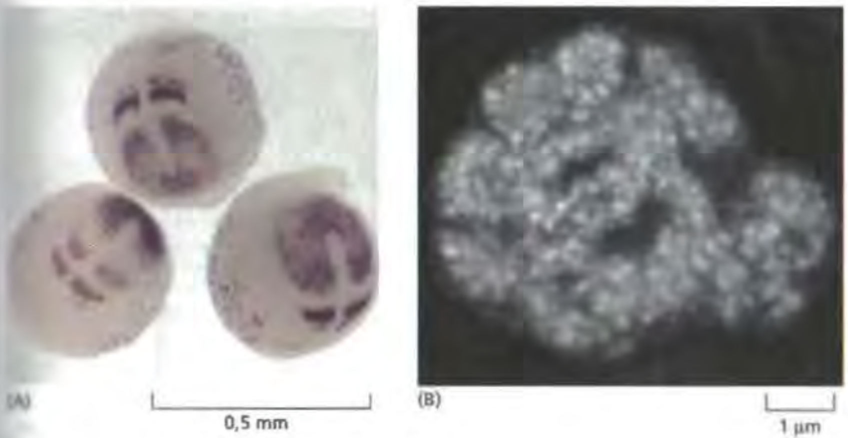


Figura 8–71 Hibridación *in situ* para la localización de RNA en los tejidos. (A) Patrón de expresión de mRNA de *DeltaC* en el embrión temprano del pez cebra. Este gen codifica un ligando de la vía de señalización de Notch (descrito en el Capítulo 15); el patrón mostrado refleja su papel en el desarrollo de los somitos –los futuros segmentos vertebrales del tronco y de la cola. (B) La localización *in situ* de alta resolución de RNA muestra los lugares del interior del nucleolo de una célula de guisante en los que se sintetiza el RNA ribosomal. Las estructuras con forma de salchicha, de 0,5-1 µm de diámetro, corresponden a los bucles del DNA cromosómico que contienen genes que codifican el rRNA. Cada pequeño punto de color blanco representa la transcripción de un gen de rRNA. (A, cortesía de Yun-Jin Jiang; B, cortesía de Peter Shaw.)

den ser fácilmente estudiadas colocando un gen marcador bajo su control e introduciendo estas moléculas de DNA recombinante en las células (**Figura 8–70**).

También es posible la observación temporal y del sitio en el que se expresa el producto génico del mRNA. Aunque esta estrategia, a menudo proporciona la misma información general que la del gen marcador descrita, hay situaciones en las que proporciona información adicional, como por ejemplo cuando un gen se transcribe pero su mRNA no se traduce de inmediato, o cuando el producto génico final es RNA y no una proteína. Este procedimiento, denominado **hibridación *in situ***, se basa en los principios de hibridación de los ácidos nucleicos que se han descrito. Por lo general, los tejidos son fijados suavemente hasta que su RNA es retenido y expuesto, de manera que puede ser hibridado y marcado con una sonda de DNA o de RNA complementaria. De esta forma, se pueden observar los patrones de expresión génica diferencial en los tejidos y determinar la localización de determinados RNA en las células (**Figura 8–71**). Por ejemplo, en embriones de *Drosophila* estos patrones han proporcionado nuevos datos acerca del mecanismo que genera diferencias entre las células situadas en diferentes posiciones durante el desarrollo (se describe en el Capítulo 22).

Utilizando aproximaciones similares, también es posible visualizar secuencias específicas de DNA en las células. En este caso, las preparaciones de tejido, células e incluso cromosomas son expuestas de forma breve a pH elevados para disgregar los pares de nucleótidos y se añaden las sondas de ácidos nucleicos, permitiendo que se hibriden con el DNA celular y entonces son visualizadas (véase Figura 8–35).

La expresión de genes individuales se puede medir utilizando RT-PCR cuantitativa

Aunque los genes marcadores y la hibridación *in situ* revelan patrones de expresión génica, a menudo es interesante cuantificar esta expresión mediante la medida directa de los niveles de mRNA en las células. Aunque los análisis de tipo northern (véase Figura 8–38) se pueden adaptar a esta propuesta, existe un método mucho más preciso, basado en los principios de la PCR (**Figura 8–72**). Esta metodología, denominada **RT-PCR cuantitativa** (*reverse transcription-polymerase chain reaction*), empieza con toda la población de moléculas de mRNA que se han purificado a partir de un tejido o de células en cultivo. Es importante que el DNA no esté presente en la preparación; puede ser eliminado por purificación o mediante degradación enzimática. Con la transcriptasa reversa se añaden dos cebadores de DNA que reconocen específicamente el gen de interés, la DNA polimerasa, y los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato necesarios para la síntesis. En el primer ciclo de la síntesis se produce la transcripción reversa del mRNA a DNA utilizando uno de los cebadores. A continuación, una serie de ciclos de calentamiento y enfriamiento permiten la amplificación de la cadena de DNA por PCR convencional (véase Figura 8–45). La parte cuantitativa de este método se basa en una relación directa entre la tasa de producción del producto de PCR y la concentración del mRNA de interés. Añadiendo colorantes químicos a la reacción de PCR, que sólo emiten fluorescencia cuando se unen a la doble cadena de DNA, se utiliza una sencilla medida de fluorescencia para seguir el proceso de la reacción y deducir de una

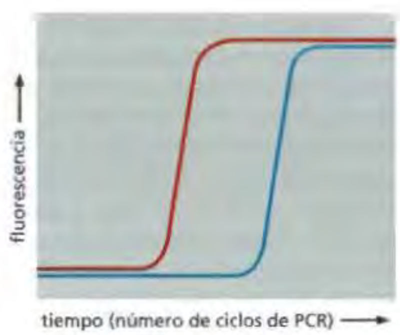


Figura 8–72 Los niveles de RNA se pueden medir utilizando RT-PCR cuantitativa. La fluorescencia medida se genera por un compuesto fluorescente únicamente cuando se une al DNA de doble cadena producido en la reacción de RT-PCR (véase Figura 8-46B). La muestra roja tiene una concentración más alta de mRNA que la muestra azul, ya que requiere menos ciclos de PCR para alcanzar la misma concentración semimáxima de DNA de doble cadena. Basándose en esta diferencia, se puede determinar de una manera precisa las cantidades relativas de mRNA en las dos muestras.

Figura 8–73 Utilización de microchips de DNA para estudiar la expresión simultánea de miles de genes. Para preparar un microchip, los fragmentos de DNA –cada uno de ellos correspondiente a un gen– se disponen sobre una lámina con la ayuda de un robot. También existen microchips ya preparados comercialmente. En este ejemplo, el mRNA se obtiene de dos muestras celulares diferentes, con el objetivo de comparar directamente sus niveles relativos de expresión génica. Por ejemplo, las dos muestras podrían proceder de una población celular que ha sido tratada con una hormona mientras que a las células control no se les ha realizado el tratamiento. Entonces, estas muestras se convierten a cDNA y se marcan: una de ellas con un fluorocromo rojo y la otra con un fluorocromo verde. Se mezclan las muestras y se deja que hibriden con el microchip. Tras la incubación, se lava el microchip y se determina la fluorescencia. En el fragmento mostrado, correspondiente a un microchip de DNA representativo de la expresión de 110 genes de levadura, los puntos *rojos* indican que el gen en la muestra 1 se expresa a niveles mayores que el correspondiente gen en la muestra 2; los puntos *verdes* indican que la expresión del gen en la muestra 2 es superior que en la muestra 1. Los puntos *amarillos* muestran genes que se expresan al mismo nivel en ambas muestras. Los puntos oscuros indican que en ambas muestras existe poca o nula expresión del gen cuyo fragmento está localizado en esa posición en el microchip. (Microchip cortesía de J.L. DeRisi et al., *Science* 278:680-686, 1997. Con la autorización de AAAS.)



manera precisa la concentración inicial del mRNA que es amplificado (véase Figura 8–72). Aunque parece complicada, esta técnica de RT-PCR cuantitativa (a veces llamada *PCR a tiempo real*) es relativamente rápida y sencilla de realizar en el laboratorio y ha desplazado al análisis de tipo Northern como el método de elección para cuantificar los niveles de mRNA de cualquier gen dado.

Los microchips de DNA permiten estudiar simultáneamente la expresión de miles de genes

Hasta el momento hemos descrito técnicas que se pueden utilizar para examinar la expresión de un solo gen (o pocos genes) a la vez. Los **microchips de DNA**, desarrollados en la década de 1990, han revolucionado el análisis de la expresión génica al estudiar productos de RNA de miles de genes a la vez. Al poder analizar de forma simultánea la expresión de tantos genes, actualmente podemos empezar a identificar y estudiar los patrones de expresión génica que subyacen a la fisiología celular: podemos ver qué genes se encuentran activados (o inhibidos) durante el crecimiento o la diferenciación celular, o cuales responden a hormonas o a toxinas.

Los microchips de DNA no son más que portaobjetos de microscopía recubiertos con un gran número de fragmentos de DNA, cada uno de los cuales contiene una secuencia de nucleótidos que actúa como sonda para un gen concreto. Los microchips más densos contienen decenas de miles de estos fragmentos en un área inferior al tamaño de un sello de correos, y permiten desarrollar en paralelo miles de reacciones de hibridación (**Figura 8–73**). Algunos microchips se preparan a partir de fragmentos de DNA grandes que han sido obtenidos mediante PCR; un robot se encarga de disponer el DNA sobre los portaobjetos. Otros contienen oligonucleótidos cortos que se sintetizan sobre la superficie de la lámina de vidrio con técnicas similares a las utilizadas para grabar los circuitos de los chips de los ordenadores. En cualquier caso, puesto que se conoce la secuencia y la posición exactas de cada sonda en el microchip, cualquier fragmento de nucleótidos que se hibride con una de las sondas podrá ser identificado como el producto de un gen concreto simplemente detectando la posición del microchip en la que se encuentra.

Para estudiar la expresión de un gen utilizando un microchip de DNA, primero se extrae el mRNA de las células bajo estudio y se transforma en cDNA (véase Figura 8–43). El cDNA se marca con un producto fluorescente, el microchip se incuba con esta muestra de cDNA marcado y tiene lugar la reacción de hibridación (véase Figura 8–73). El microchip se lava para eliminar el cDNA que no se ha unido y se identifican las posiciones del microchip a las que se han unido los fragmentos de DNA marcado utilizando un microscopio equipado con un escáner láser automatizado. Las posiciones detectadas por el escáner en el microchip se corresponden con el gen concreto dispuesto al inicio en esa posición.

Habitualmente el DNA fluorescente de las muestras experimentales (marcado, p. ej., con un pigmento rojo fluorescente) se mezcla con una muestra de fragmentos de cDNA de

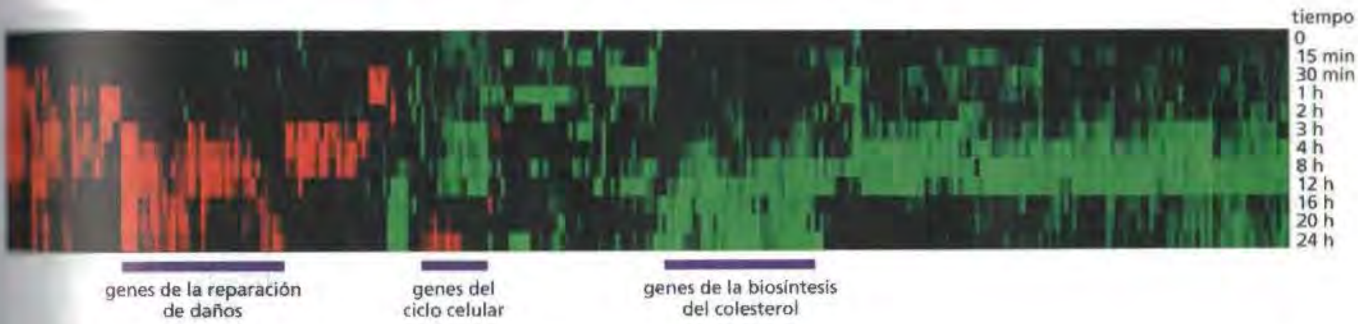


Figura 8–74 Utilización del análisis de grupos en la identificación de conjuntos de genes regulados de forma coordinada. Los genes que pertenecen a un mismo grupo pueden estar implicados en procesos o vías de señalización comunes. Para realizar un análisis de grupos, se obtienen datos de microchips de DNA de muestras de células expuestas a varias condiciones diferentes y se agrupan aquellos genes que muestran cambios coordinados en sus patrones de expresión. En este experimento se privó de suero durante 48 horas a fibroblastos humanos en cultivo; el suero fue añadido de nuevo a los cultivos a tiempo 0, y se recolectaron las células a diferentes tiempos para su análisis con microchips de DNA. De los 8600 genes analizados en el microchip de DNA, poco más de 300 mostraron una variación del triple o mayor en su patrón de expresión en respuesta a la reintroducción del suero. En la figura, el color *rojo* indica un incremento y el color *verde* una disminución de la expresión génica. Sobre la base de los resultados de numerosos análisis con microchips, los 8600 genes se han agrupado en función de patrones de expresión similares. Los resultados de estos análisis muestran que los genes implicados en la reparación de daños se ven activados en respuesta al suero, mientras que los implicados en la regulación de la progresión en el ciclo celular o en la biosíntesis del colesterol tienden a ser desactivados. (De M.B. Eisen et al., *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 95:14863-14868, 1998. Con la autorización de National Academy of Sciences.)

referencia marcados con un pigmento fluorescente de otro color (p. ej., de color verde). Por tanto, si la cantidad de RNA expresada por un gen determinado de las células de interés se encuentra incrementada respecto a la de la muestra de referencia, la mancha resultante es roja. Por el contrario, si la expresión del gen es menor en relación a la muestra de referencia, la mancha resultante será verde. Si no existe variación con respecto a la muestra de referencia, la mancha es amarilla. La utilización de este tipo de referencia interna permite tabular los patrones de expresión de los genes con gran precisión.

Hasta ahora los microchips de DNA se han utilizado para estudiar casi todo: desde los cambios en la expresión génica responsables de la maduración de las fresas, hasta las "firmas" de expresión génica de diferentes tipos de células cancerígenas humanas (véase Figura 1–3); desde los cambios que ocurren durante el ciclo celular hasta los acontecidos por cambios de temperatura. De hecho, dado que los microchips permiten estudiar simultáneamente una gran cantidad de genes, es posible detectar cambios sutiles en una célula, cambios que pueden no manifestarse en su apariencia o comportamiento externos.

Los estudios de la expresión conjunta de genes también proporcionan información útil para la predicción de la función de un gen. Ya hemos comentado de qué forma la identificación de dianas de interacción de una proteína puede proporcionar pistas sobre la función de esa proteína. Un principio similar a éste es aplicable a los genes: la información sobre la función de un gen puede deducirse identificando genes que comparten su patrón de expresión. Utilizando una técnica denominada *análisis de grupos*, se pueden identificar conjuntos de genes regulados de forma coordinada. Los genes que son activados o desactivados a la vez, bajo diferentes circunstancias, podrían trabajar de forma concertada en la célula: podrían codificar proteínas que forman parte de la misma maquinaria proteica, o proteínas implicadas en una actividad coordinada compleja como la replicación del DNA o la maduración del mRNA. La caracterización de un gen, cuya función es desconocida, mediante agrupación con genes conocidos con los que comparte su comportamiento transcripcional, se denomina a veces "culpabilidad por complicidad". Los análisis de grupos se han utilizado para analizar los patrones de expresión de genes subyacentes a numerosos procesos biológicos de interés, incluyendo la curación de heridas en humanos (**Figura 8–74**).

Además de analizar el nivel de mRNA correspondiente a cada gen en el genoma, los microchips de DNA tienen muchas más aplicaciones. Por ejemplo, se pueden utilizar para seguir la progresión de la replicación del DNA en una célula (véase Figura 5–32) y, cuando se combina con la inmunoprecipitación, permiten localizar la posición que ocupa una proteína reguladora de un gen en el genoma (véase Figura 7–32). Los microchips también se utilizan para identificar rápidamente los microbios causantes de una enfermedad mediante la hibridación del DNA de tejidos infectados a un chip que contenga secuencias de DNA genómicas de una gran colección de patógenos.

El análisis de la expresión génica de una célula revela el "ruido biológico"

Los métodos descritos para el estudio de los mRNA proporcionan un valor medio de los niveles de expresión de cada mRNA en una gran población celular. Utilizando como marcador una proteína fluorescente, cuya expresión está controlada por un promotor de interés, también es posible medir de una forma precisa los niveles de expresión de una célula individual. Estas nuevas aproximaciones han revelado un preocupante nivel de variabilidad, que a menudo se denomina *ruido biológico*, entre las células individuales y una población homogé-

nea. Estos estudios también han revelado la presencia de distintas subpoblaciones celulares cuya existencia quedaría enmascarada si únicamente se hubieran considerado los valores medios de la población entera. Por ejemplo, una distribución bimodal de los niveles de expresión indicaría que las células pueden existir en dos estados distintos (**Figura 8–75**), con un valor medio del nivel de expresión en la población situado entre ellos. El comportamiento de las células individuales tiene implicaciones importantes para el conocimiento de la biología, ya que revela que algunas células están cambiando de un estado a otro de manera constante y rápida.

Actualmente existen dos metodologías que permiten analizar la expresión génica en células individuales. En la aproximación por la imagen, las células vivas se montan en un portaobjetos y se visualizan con un microscopio fluorescente. Este método tiene la ventaja de que se puede seguir una célula concreta durante un tiempo dado, permitiendo medir los cambios temporales de expresión. La segunda aproximación, la citometría de flujo, trabaja haciendo pasar una corriente de células en suspensión a través de un iluminador y midiendo la fluorescencia de las células individuales mientras pasan a través del detector (véase Figura 8–2). Aunque presenta la ventaja de que se pueden medir con precisión los niveles de expresión de un número elevado de células, la citometría de flujo no permite seguir una célula concreta en función del tiempo. Por lo tanto, esta aproximación es complementaria a la metodología por la imagen.



Figura 8–75 Diferentes niveles de expresión génica en células individuales de una población de la bacteria *E. coli*. En este experimento, se han introducido en todas las bacterias, dos genes marcadores diferentes (la fluorescencia de uno es *verde* y la del otro *roja*) controlados por una copia del mismo promotor. Cuando son iluminadas, mientras que algunas células expresan solamente una copia génica y, por lo tanto, aparecen en *rojo* o *verde*, otras expresan ambos genes y aparecen en *amarillo*. Este experimento también revela niveles variables de fluorescencia lo que indica niveles también variables de expresión génica en una población aparentemente uniforme de células. (De M.B. Elowitz, A.J. Levine, E.O. Siggia y P.S. Swain, *Science* 297:1183-1186, 2002. Con la autorización de AAAS.)

Resumen

La genética y la ingeniería genética proporcionan potentes herramientas para el estudio de la función génica tanto en células como en organismos. En la aproximación genética clásica, la mutagénesis aleatoria se combina con el examen de identificación de mutantes deficientes en un determinado proceso biológico. Estos mutantes se utilizan para localizar y estudiar los genes responsables de dicho proceso.

La función génica también puede estudiarse mediante técnicas de genética inversa. Los métodos de ingeniería de DNA permiten alterar cualquier gen y reinsertarlo en el cromosoma de una célula, de modo que se convierta en una parte permanente del genoma. Cuando la célula utilizada para esta transferencia génica es un óvulo fecundado (en animales) o una célula vegetal pluripotente en cultivo, se pueden producir organismos transgénicos que expresen el gen mutante y lo pasen a su descendencia. La capacidad de modificar células y organismos, de formas muy específicas, es especialmente importante para la biología celular, ya que permite comprender el efecto sobre la célula o sobre el organismo de un cambio diseñado en una sola proteína o molécula de RNA.

Muchos de estos métodos están siendo ampliados para investigar la función génica a escala genómica. La generación de bibliotecas de mutantes, en los que cada gen del organismo ha sido delecionado o interrumpido de forma sistemática, proporcionará una valiosa herramienta para la exploración del papel de cada uno de los genes en la elaborada cooperación molecular que da lugar a la vida. Tecnologías tales como los microchips de DNA pueden examinar simultáneamente la expresión de miles de genes y proporcionar instantáneas panorámicas detalladas de los patrones dinámicos de expresión génica que subyacen a procesos celulares complejos.

PROBLEMAS

¿Qué afirmaciones son ciertas? Explicar por qué sí o por qué no

8–1 Debido a que un anticuerpo monoclonal reconoce una zona antigénica específica (epítopo), sólo se une a la proteína específica contra la que fue generado.

8–2 Dado el inexorable progreso de la tecnología, parece inevitable que la sensibilidad en la detección de moléculas vaya más allá del nivel yoctomolar (10^{-24} molar).

8–3 La resonancia de plasmón de superficie (SPR) mide las constantes de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) entre moléculas a tiempo real utilizando pequeñas cantidades de moléculas no marcadas, pero no proporciona información que permita determinar la constante de unión (K).

8–4 Si en cada ciclo de PCR se duplica la cantidad de DNA sintetizado en el ciclo anterior, entonces 10 ciclos amplificarán 10^3 veces, 20 ciclos 10^6 veces y 30 ciclos 10^9 veces.

Resolver los problemas siguientes

8–5 Un paso común en los aislamientos de células a partir de una muestra de tejido animal es el tratamiento con tripsina, colagenasa y EDTA. ¿Por qué se necesita este tratamiento y qué se consigue con cada componente? ¿Por qué este tratamiento no mata las células?

8–6 ¿Sería posible generar un anticuerpo contra un anticuerpo? Explicar la respuesta.

8–7 Distinguir entre la velocidad de sedimentación y el equilibrio de sedimentación. ¿Para qué se utiliza cada técnica? ¿Cuál es mejor para la separación de dos proteínas de tamaño diferente?

8–8 La tropomiosina, cuya masa es de 93 kDa, sedimenta a 2,6 S, mientras que la hemoglobina (65 kDa) sedimenta a 4,3 S. (El coeficiente de sedimentación S es una medida lineal de la tasa de sedimentación: ambos incrementan o descienden en paralelo.) La **Figura P8–1** muestra un modelo del esqueleto de carbonos alfa de estas dos proteínas. ¿Por qué la proteína más grande sedimenta más lentamente que la proteína pequeña? ¿Es posible proponer una analogía de la experiencia diaria que pueda ayudar a la resolución de este problema?

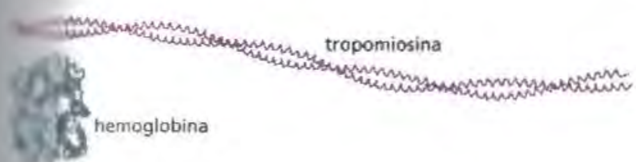


Figura P8–1 Modelos del esqueleto de carbonos alfa de la tropomiosina y de la hemoglobina (Problema 8–8).

8–9 En el clásico trabajo en el que se demostró la replicación semiconservativa del DNA, Meselson y Stahl mostraban que el DNA forma una banda cuando se somete a sedimentación en equilibrio. Los autores mezclaban al azar fragmentos de DNA de *E. coli* con una solución de CsCl hasta conseguir una densidad final de 1,71 g/mL. Tal como se muestra en la **Figura P8–2**, incrementando la duración de la centrifugación a 70.000 veces la gravedad, el DNA, que se encuentra inicialmente disperso por todo el tubo de centrifugadora, se va concentrando con el tiempo en una banda discreta a la mitad del tubo.

A. Describir qué ocurre con el tiempo y explicar por qué el DNA forma una banda discreta.



Figura P8–2 Fotografías de absorción ultravioleta que muestran diferentes estados de las bandas de DNA de *E. coli* (Problema 8–9). El DNA, que absorbe la luz ultravioleta, se muestra en las fotografías como *regiones oscuras*. La base del tubo de la centrifugadora quedaría a la *derecha* de la imagen. (De M. Meselson y F.W. Stahl, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 44:671-682, 1958. Con permiso de National Academy of Sciences.)

B. ¿Cual es la densidad de flotación del DNA? (La densidad de la solución a la que el DNA flota en el equilibrio define la densidad de flotación del DNA.)

C. Incluso si el DNA se centrifugara el doble de tiempo –o incluso más– la anchura de la banda seguiría siendo igual a la que se muestra en la parte inferior de la Figura P8–2. ¿Por qué la banda no se comprime más? Sugerir algunas posibles razones para explicar la anchura de la banda de DNA en el equilibrio.

8–10 La tecnología de hibridomas permite la generación de anticuerpos monoclonales contra casi cualquier proteína. ¿Entonces, por qué el uso de las proteínas marcadas con epítopos es una técnica habitual si el epítopo que actúa de marca puede interferir potencialmente con la función de la proteína?

8–11 En una célula, ¿cuántas copias de una proteína se necesitan para que sea detectada como una banda en un gel? Asumiendo que en un gel se pueden cargar 100 μg de extractos celulares y que por tinción de plata se pueden detectar 10 ng en una cada banda. La concentración proteica celular es de unos 200 mg/mL; una célula típica de mamífero tiene un volumen de 1000 μm^3 y una bacteria típica tiene un volumen de 1 μm^3. Dados estos parámetros, calcular el número de copias de una proteína de 120 kDa que haría falta que hubiera en una célula de mamífero y en una bacteria para dar lugar a una banda detectable. Se puede intentar una estima del orden de magnitud antes de realizar los cálculos.

8–12 Se quiere amplificar un DNA entre los dos fragmentos de secuencia que se muestran en la **Figura P8–3**. Escoger, de entre los que se muestran, el par de cebadores que permita esta amplificación por PCR.

DNA para amplificar

5'-GACCTGTGGAAGC ——————— CATACGGGATTGA-3'
3'-CTGGACACCTTCG ——————— GTATGCCCTAACT-5'

cebadores

(1) 5'-GACCTGTCCAAGC-3'	(5) 5'-CATACGGGATTGA-3'
(2) 5'-CTGGACACCTTCG-3'	(6) 5'-GTATGCCCTAACT-3'
(3) 5'-CGAAGGTGTCCAG-3'	(7) 5'-TGTTAGGGCATAC-3'
(4) 5'-GCTTCCACAGGTC-3'	(8) 5'-TCAATCCCGTATG-3'

Figura P8–3 Fragmentos de DNA a amplificar y los cebadores potenciales (Problema 8–12).

8–13 Usando DNA genómico, en la primera ronda de PCR los cebadores inician la síntesis que acaba únicamente cuando el ciclo finaliza (o cuando se encuentra una terminación del DNA al azar). En una amplificación normal de 20 o 30 ciclos, el único producto visible está definido por las terminaciones de los cebadores de DNA. ¿En qué ciclo se genera por primera vez un fragmento de doble cadena con el tamaño correcto?

8–14 Explicar las diferencias entre una mutación que genera ganancia de función y una mutación que presenta dominancia negativa. ¿Por qué estos dos tipos de mutaciones suelen ser dominantes?

8–15 Comentar la siguiente afirmación: "En la actualidad, no tendríamos ni idea de la importancia de la insulina como hormona reguladora si su ausencia no se asociara con la devastadora enfermedad de la diabetes. Las dramáticas consecuencias, debidas a su ausencia, centraron los esfuerzos iniciales en la identificación de la insulina y el estudio de su papel en la fisiología".

BIBLIOGRAFÍA

General

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE et al (eds) (2002) Short Protocols in Molecular Biology, 5.ª ed. New York: Wiley.

Brown TA (2002) Genomes 2, 2.ª ed. New York: Wiley-Liss.

Spector DL, Goldman RD & Leinwand LA (eds) (1998) *Cells: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Watson JD, Caudy AA, Myers RM & Witkowski JA (2007) Recombinant DNA: Genes and Genomes—A Short Course, 3.ª ed. New York: WH Freeman.

Aislamiento y crecimiento de células en cultivo

Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD et al (1996) Laser capture microdissection. *Science* 274:998–1001.

Ham RG (1965) Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. *Proc Natl Acad Sci USA* 53:288–293.

Harlow E & Lane D (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Herzenberg LA, Sweet RG & Herzenberg LA (1976) Fluorescence-activated cell sorting. *Sci Am* 234:108–116.

Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor thirty-five years later. *Science* 237:1154–1162.

Lerou PH & Daley GQ (2005) Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Rev* 19:321–31.

Milstein C (1980) Monoclonal antibodies. *Sci Am* 243:66–74.

Purificación de proteínas

de Duve C & Beaufay H (1981) A short history of tissue fractionation. *J Cell Biol* 91:293s–299s.

Krogan NJ, Cagney G, Yu H et al (2006) Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440:637–43.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.

Nirenberg MW & Matthaei JH (1961) The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* on naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci. USA* 47:1588–1602.

O'Farrell PH (1975) High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250:4007–4021.

Palade G (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189:347–358.

Scopes RK & Cantor CR (1994) Protein Purification: Principles and Practice, 3.ª ed. New York: Springer-Verlag.

Análisis de las proteínas

Branden C & Tooze J (1999) Introduction to Protein Structure, 2.ª ed. New York: Garland Science.

Fields S & Song O (1989) A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature* 340:245–246.

Giepmans BN, Adams SR et al (2006) The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* 312:217–24.

Kendrew JC (1961) The three-dimensional structure of a protein molecule. *Sci Am* 205:96–111.

Knight ZA & Shokat KM (2007) Chemical genetics: Where genetics and pharmacology meet. *Cell* 128:425–30.

Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B et al (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnol* 17:1030–1032.

Washburn MP, Wolters D & Yates JR (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnol* 19:242–7.

Wuthrich K (1989) Protein structure determination in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Science* 243:45–50.

Análisis y manipulación del DNA

Adams MD, Celniker SE, Holt RA et al (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185–2195.

Alwine JC, Kemp DJ & Stark GR (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diabenzyloxymethyl-paper a[illegible] hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5350–5354.

Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA et al (1997) The complete genome sequ[illegible] of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453–1474.

Cohen S, Chang A, Boyer H & Helling R (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3240–3244

International Human Genome Sequencing Consortium (2000) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860–921.

International Human Genome Sequencing Consortium (2006) The DNA sequence, annotation and analysis of human chromosome 3. *Natu[illegible]* 440:1194–1198.

Jackson D, Symons R & Berg P (1972) Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galacto[illegible] operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 69:2904–2909.

Maniatis T et al (1978) The isolation of structural genes from libraries of eukaryotic DNA. *Cell* 15:687–701.

Mullis KB (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci[illegible]* 262:56–61.

Nathans D & Smith HO (1975) Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of dna molecules. *Annu Rev Biochem* 44:273–93.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487–491.

Sambrook J, Russell D (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3.ª ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger F, Nicklen S & Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463–5467.

Smith M (1994) Nobel lecture. Synthetic DNA and biology. *Biosci Rep* 14:51–66.

Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503–517.

The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796–815.

The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282:2012–2018.

Venter JC, Adams MA, Myers EW et al (2000) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304–1351.

Estudio de la expresión y la función de los genes

Boone C, Bussey H & Andrews BJ (2007) Exploring genetic interactions and networks with yeast. *Nature Rev Genet* 8:437–449.

Botstein D, White RL, Skolnick M & Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314–331.

DeRisi JL, Iyer VR & Brown PO (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278:680–686.

International HapMap Consortium (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature* 437:1299–320.

Lockhart DJ & Winzeler EA (2000) Genomics, gene expression and DNA arr[illegible] *Nature* 405:827–836.

Mello CC & Conte D (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431:338–342.

Nusslein-Volhard C & Weischaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287:795–801.

Palmiter RD & Brinster RL (1985) Transgenic mice. *Cell* 41:343–345.

Rubin GM & Spradling AC (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218:348–353.

Sabeti PC, Schaffner SF, Fry B et al (2006) Positive natural selection in the human lineage. *Science* 312:1614–1620.

Weigel D & Glazebrook J (2001) *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

9

Observar las células

En este capítulo

ESTUDIAR LA ESTRUCTURA DE LAS CÉLULAS CON EL MICROSCOPIO ÓPTICO 579

OBSERVACIÓN DE CÉLULAS Y MOLÉCULAS CON EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO 604

Dado que las células son pequeñas y complejas, resulta difícil observar su estructura, descubrir su composición molecular y todavía más difícil dilucidar cómo funcionan sus componentes. Lo que podemos aprender sobre las células depende de las herramientas que tengamos a nuestra disposición para estudiarlas; de hecho, los mayores avances de la biología celular son con frecuencia fruto de la introducción de nuevas técnicas de estudio. Por consiguiente, para entender la biología celular contemporánea es necesario conocer estos métodos de estudio.

En este capítulo vamos a describir brevemente algunos de los principales métodos microscópicos utilizados para estudiar las células. Comprender la organización estructural de las células es un requisito previo esencial para aprender su funcionamiento. El punto de partida será la microscopía óptica, ya que la biología celular comenzó con el microscopio óptico y todavía es una herramienta esencial. En los últimos años, la microscopía óptica ha ganado importancia día a día, debido al desarrollo de métodos de marcaje específico, la observación de constituyentes celulares individuales y la reconstrucción de su arquitectura tridimensional. Una ventaja importante que ofrece la microscopía óptica es que la luz es relativamente poco destructiva. Así en células vivas y en organismos podemos "etiquetar" determinados componentes de la célula con sondas fluorescentes, como por ejemplo proteínas intrínsecamente fluorescentes, y observar sus desplazamientos, dinámicas e interacciones en las células vivas. La microscopía óptica tiene una resolución limitada debido a la longitud de onda de la luz visible. La utilización alternativa de un haz de electrones permite que el microscopio (electrónico) pueda resolver complejos macromoleculares de las células, a resolución casi atómica y en tres dimensiones.

A pesar de que tanto la microscopía óptica como la microscopía electrónica son métodos importantes, lo que resulta realmente interesante es lo que estos métodos han permitido descubrir. La idea es que este capítulo se utilice como referencia y se lea de forma conjunta con los últimos capítulos del libro, más que como una introducción a ellos.

ESTUDIAR LA ESTRUCTURA DE LAS CÉLULAS CON EL MICROSCOPIO ÓPTICO

Una célula animal convencional mide entre 10 y 20 μm de diámetro, es decir, unas cinco veces menos que la menor partícula visible a simple vista. Por ello, hasta que no se dispuso de buenos microscopios ópticos, a principios del siglo XIX, Schleiden y Schwann no propusieron que todos los tejidos vegetales y animales son agregados de células. Este descubrimiento en 1838, bautizado como **teoría celular**, marca el nacimiento formal de la biología celular.

Las células animales no sólo son diminutas, sino que también son incoloras y translúcidas; por ello, el descubrimiento de las principales características internas de las células dependió del desarrollo, a finales del siglo XIX, de diversos colorantes que proporcionaron el contraste suficiente para hacerlas visibles. A principios de la década de 1940, se desarrolló el microscopio electrónico, mucho más potente que el óptico. Sin embargo, antes de que su utilización permitiera el conocimiento detallado de las complejidades de la estructura interna de la célula, fue necesario el desarrollo de nuevas técnicas para la conservación y contrastado de las células. Por ahora la microscopía depende tanto de las técnicas para la preparación de las muestras como del rendimiento del propio microscopio. En las secciones posteriores se tratará tanto de los instrumentos como de la preparación de las muestras y empezaremos por el microscopio óptico.

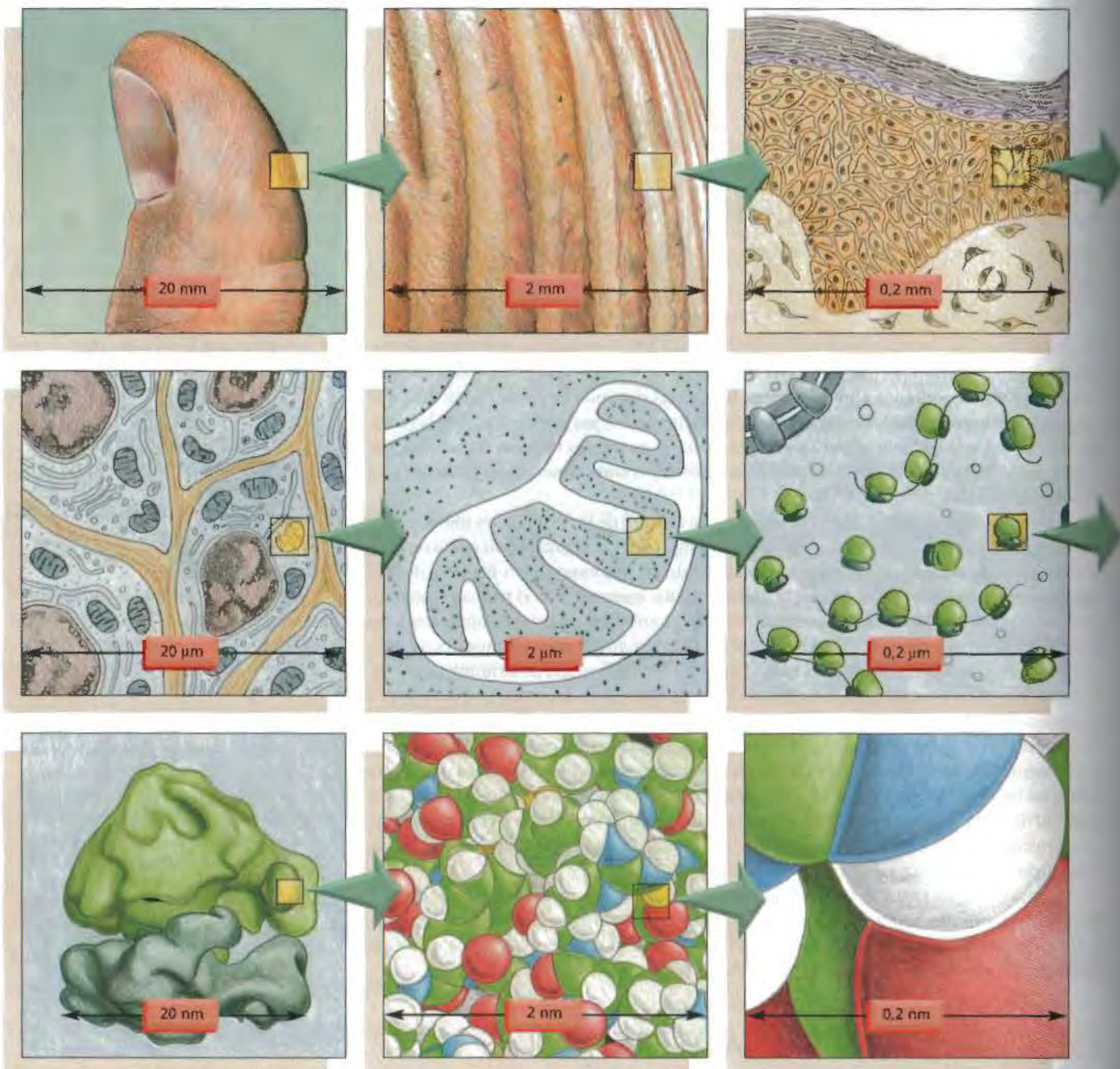


Figura 9–1 Visión a escala desde células vivas hasta los átomos. Cada esquema muestra una imagen aumentada 10 veces en una progresión imaginaria desde un dedo pulgar, a través de las células de la piel, hasta un ribosoma y un agregado de átomos que forman parte de una de las muchas proteínas del cuerpo. Los detalles atómicos de las macromoléculas, tal como se muestran en los dos últimos paneles, normalmente están más allá del poder de resolución del microscopio electrónico.

La **Figura 9–1** muestra una serie de imágenes que ilustran una progresión imaginaria desde un dedo pulgar hasta un conjunto de átomos. Cada imagen representa una zona de la imagen anterior diez veces aumentada. El ojo humano puede distinguir detalles de las dos primeras imágenes, la resolución del microscopio óptico llega hasta el cuarto panel y el microscopio electrónico hasta el séptimo o el octavo. La **Figura 9–2** muestra el tamaño de algunas estructuras celulares y subcelulares y el rango de medidas que se observa con cada tipo de microscopio.

El microscopio óptico puede resolver detalles situados a 0,2 µm de distancia

Una limitación fundamental de todos los microscopios es que un tipo de radiación determinada no puede utilizarse para examinar detalles estructurales mucho más pequeños que su propia longitud de onda. Este fenómeno supone una limitación fundamental para todos los

microscopios. Así pues, el límite máximo de resolución de un microscopio óptico está determinado por la longitud de onda de la luz visible, que abarca desde 0,4 µm (para el violeta) hasta 0,7 µm (para el rojo lejano). En la práctica, las bacterias y las mitocondrias, que tienen alrededor de 500 nm (0,5 µm) de diámetro, son las estructuras más pequeñas que podemos observar nítidamente con el **microscopio óptico**; los detalles más pequeños que estas dimensiones quedan borrosos por los efectos de la naturaleza casi ondulatoria de la luz. Para comprender por qué ocurre esto, debemos seguir lo que le sucede a un haz de ondas luminosas cuando atraviesa las lentes de un microscopio (**Figura 9–3**).

Dada su naturaleza ondulatoria, la luz no sigue exactamente la línea recta ideal de sus rayos que predice la óptica geométrica. Por el contrario, cuando las ondas luminosas viajan a través de un sistema óptico lo hacen por varias rutas ligeramente diferentes, de manera que interfieren entre ellas generando efectos *ópticos de difracción*. Si dos trenes de ondas que alcanzan el mismo punto por diferentes caminos están exactamente *en fase*, con coincidencia de las crestas y de los senos, se refuerzan el uno al otro aumentado la luminosidad. Por el contrario, si los trenes de ondas están *desfasados*, interfieren uno con otro anulándose total o parcialmente (**Figura 9–4**). La incidencia de la luz sobre un objeto altera las relaciones de fase de las ondas luminosas y produce complejos efectos de interferencia. A gran aumento la sombra de un borde recto, por ejemplo, iluminado con una luz de longitud de onda uniforme, aparece como un conjunto de líneas paralelas (**Figura 9–5**), mientras que la de una mancha circular aparece como un conjunto de anillos concéntricos. Por la misma razón, un punto observado a través del microscopio aparece como un disco borroso, mientras que dos objetos puntuales próximos entre sí ofrecen imágenes superpuestas y pueden llegar a confundirse en una sola imagen. La perfección de las lentes, por alta que sea, no puede superar esta limitación impuesta por la naturaleza ondulatoria de la luz.

La distancia límite a la que dos objetos pueden verse separados –conocida como **límite de resolución**– depende tanto de la longitud de onda de la luz como de la *apertura numérica* de las lentes del sistema utilizado. La apertura numérica es una medida de la profundidad del ocular del microscopio, escalada en función a su distancia del objeto; expresándolo gráficamente, cuanto más abre su ojo el microscopio mayor es su agudeza visual (**Figura 9–6**). En las mejores condiciones posibles, con luz violeta (longitud de onda = 0,4 µm) y una apertura numérica de 1,4, en teoría el microscopio óptico puede conseguir un límite de resolución de tan sólo 0,2 µm. Esta resolución ya fue alcanzada por los fabricantes de microscopios a finales del siglo XIX y con los microscopios contemporáneos producidos en serie pocas veces se alcanza. Aunque es posible *agrandar* una imagen tanto como se desee –por ejemplo pro-

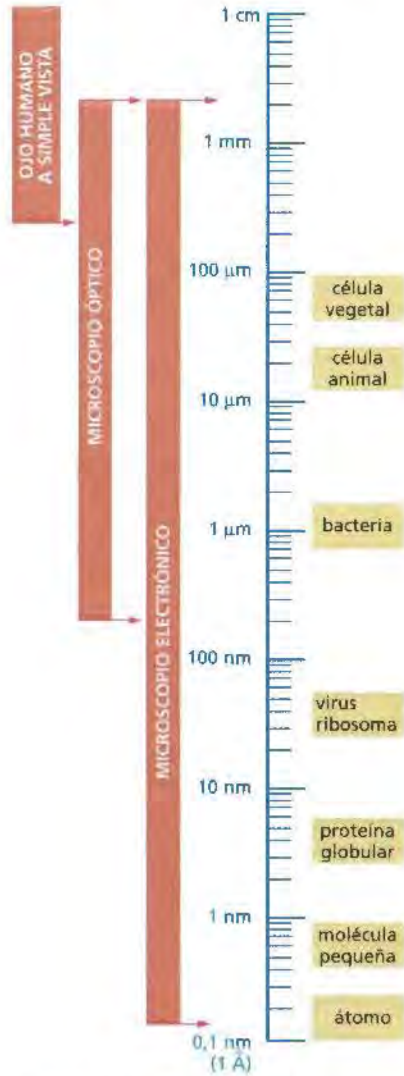


Figura 9–2 Poder de resolución. Tamaño de las células y de sus componentes, dibujados a escala logarítmica, indicando el rango de resolución del ojo humano y de los microscopios óptico y electrónico. Las siguientes unidades de longitud son las que se utilizan normalmente en microscopía: µm (micrómetro) = 10^{-6} m
nm (nanómetro) = 10^{-9} m
Å (unidad Ångström) = 10^{-10} m

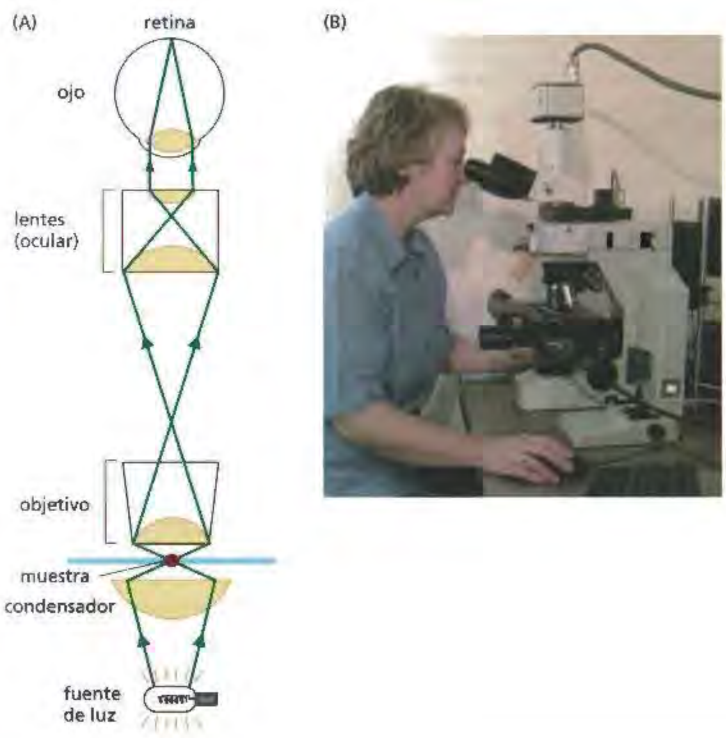


Figura 9–3 Microscopio óptico. (A) Esquema que muestra la trayectoria de la luz en un microscopio compuesto. La luz se enfoca sobre la muestra mediante lentes situadas en el condensador. Para formar una imagen de la muestra iluminada en nuestro ojo se deben combinar de forma adecuada las lentes del objetivo y las lentes del ocular. (B) Un moderno microscopio óptico para investigación. (B, cortesía de Andrew Davies.)

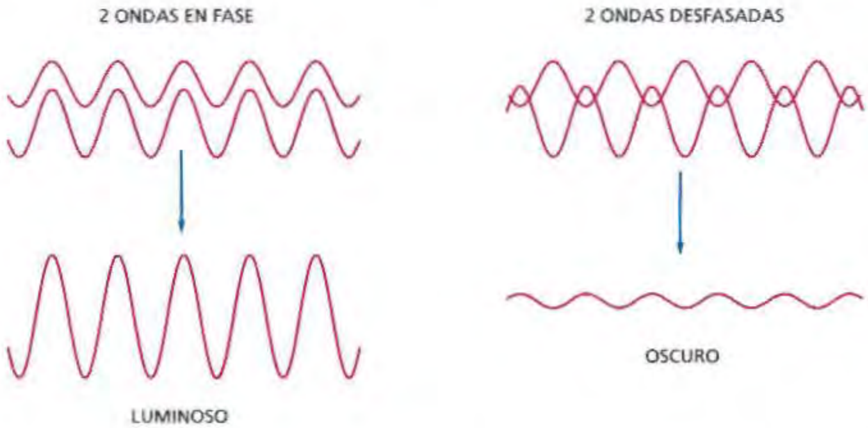


Figura 9–4 Interferencia entre ondas luminosas. Cuando dos ondas de luz se combinan en fase, la amplitud de la onda resultante es mayor y la luminosidad aumenta. Dos ondas de luz fuera de fase se anulan de forma parcial una a otra, produciendo una onda de menor amplitud y, por consiguiente, de menor intensidad luminosa.

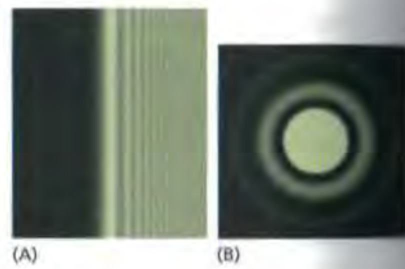


Figura 9–5 Imágenes del borde y del centro de un punto de luz. (A) Los efectos de interferencia, o aureola, vistos a gran aumento cuando la luz de una longitud de onda determinada pasa por el borde de un objeto sólido situado entre la fuente de luz y el observador. (B) La imagen del centro de la fuente de luz. La difracción la difunde formando un complejo patrón circular cuyo ancho depende de la apertura numérica del sistema óptico: a menor apertura, más difractada (más borrosa) queda la imagen. Dos fuentes de luz se pueden resolver cuando el centro de la imagen de una de ellas cae en el primer anillo negro de la imagen de la otra: esto define el límite de resolución.

yectándola sobre una pantalla– nunca resulta posible resolver al microscopio óptico dos objetos que estén separados menos de 0,2 µm: dichos objetos aparecerán como uno solo. Atención con la diferencia entre el concepto de *resolución* (expuesto hasta ahora) y el de *detección*. Nosotros podemos ver o detectar un objeto pequeño, de tamaño inferior al límite de resolución, si emite luz. Así, podemos ver un solo microtúbulo marcado con fluorescencia aunque sea diez veces más fino que el límite de resolución del microscopio óptico. Sin embargo, los efectos de la difracción harán que aparezca borroso y de un diámetro de al menos 0,2 µm (véase Figura 9–17). Podemos detectar o ver las estrellas en el cielo, debido a la luz que emiten aunque están muy por debajo de la resolución angular de nuestra vista. Todas aparecen como puntos de luz similares, que se diferencian únicamente en su color o en su intensidad de brillo. Utilizando el microscopio óptico y métodos de detección sensibles, podemos detectar y seguir el comportamiento incluso de una sola proteína fluorescente.

Más adelante se describirá cómo aprovechar la interferencia y la difracción para estudiar células vivas sin teñir.

LENTES



la lente del objetivo recoge un cono de luz, generando una imagen

la lente del condensador enfoca un cono de rayos luminosos en cada uno de los puntos de la muestra

RESOLUCIÓN: el poder de resolución de un microscopio depende de la amplitud del cono de iluminación y, por lo tanto, de las lentes objetivo y condensador. Se calcula con la fórmula

$$\text{resolución} = \frac{0{,}61\,\lambda}{n \text{ sen } \theta}$$

donde:

θ = mitad de la anchura angular del cono de rayos recogidos por la lente objetivo desde un punto típico de la muestra (la máxima anchura es de 180°, por lo que el valor de sen θ tiene un valor máximo de 1)

n = índice de refracción del medio (normalmente aire o aceite) que separa la muestra de las lentes objetivo y condensador

λ = longitud de onda de la luz utilizada (para luz blanca se utiliza por lo general el valor de 0,53 µm)

APERTURA NUMÉRICA: en la ecuación anterior, el valor n sen θ se denomina apertura numérica de las lentes (AN) y es una función de su capacidad de recoger la luz. Para lentes secas este valor no puede ser mayor de 1 pero para lentes de inmersión en aceite puede llegar a ser de 1,4. Cuanto mayor sea la apertura numérica mayor es la resolución y la brillantez de la imagen (la brillantez es importante en microscopía de fluorescencia). Sin embargo, esta ventaja se obtiene a expensas de distancias de trabajo muy cortas y de profundidades de campo muy pequeñas.

Figura 9–6 Apertura numérica. La trayectoria de los rayos de luz cuando atraviesan una muestra transparente en un microscopio ilustra el concepto de apertura numérica y su relación con el límite de resolución.

Las células vivas se pueden observar con nitidez con un microscopio de contraste de fases o de contraste de fases interferencial

La posibilidad de que algunos componentes de la célula puedan perderse o distorsionarse durante la preparación de las muestras no ha dejado de preocupar nunca a los especialistas en microscopía. La única solución a este problema consiste en examinar las células mientras están vivas, sin ningún tipo de fijación ni de congelación. Para este propósito son útiles los microscopios con sistemas ópticos especiales.

Cuando la luz pasa a través de una célula viva, la fase de la onda luminosa varía con relación al índice de refracción de la célula: la luz que pasa a través de una zona relativamente gruesa o densa de la célula, como por ejemplo el núcleo, se retrasa; como consecuencia de ello, la fase de la luz queda desplazada respecto a la de la luz que ha pasado a través de una región adyacente de citoplasma, más fina. El **microscopio de contraste de fases** y, de una forma más compleja, el **microscopio de contraste de fases interferencial** aprovechan los efectos de interferencia que se producen cuando se combinan estos dos grupos de ondas, generando de esta forma una imagen de la estructura celular (**Figura 9–7**). Ambos tipos de microscopios ópticos se utilizan para visualizar células vivas. <TCAA>

Una manera más sencilla de observar algunas de las características de una célula no teñida consiste en utilizar la luz dispersada por sus diversos componentes. En el **microscopio de campo oscuro**, los rayos luminosos del sistema de iluminación son dirigidos desde la parte lateral, por lo que sólo penetra en las lentes del microscopio la luz dispersada. Por consiguiente, la célula aparece como un objeto brillante sobre un fondo negro. Con un **microscopio de campo claro** convencional, la imagen se obtiene por la simple transmisión de la luz a través de las células en cultivo. La **Figura 9–8** compara imágenes de una misma célula obtenidas mediante cuatro tipos diferentes de microscopios ópticos.

Una de las grandes ventajas del microscopio de contraste de fases, del microscopio de contraste de fases interferencial y del microscopio de campo oscuro estriba en que los tres permiten observar las células en acción y estudiar los desplazamientos implicados en procesos como la mitosis o la migración celular. Puesto que muchos de estos desplazamientos son demasiado lentos para poder ser observados a tiempo real, resulta útil filmar películas o vídeos por el sistema de aceleración de movimiento. En este caso, la cámara toma fotografías sucesivas, separadas por breves intervalos de tiempo, de modo que cuando la película o el vídeo registrados se proyectan a la velocidad normal los acontecimientos aparecen muy acelerados.

Mediante técnicas digitales las imágenes pueden ser amplificadas y analizadas

Recientemente, los sistemas electrónicos, o digitales, de imágenes y la tecnología asociada de **procesamiento de imágenes** han tenido un impacto importante en la microscopía óptica. No sólo han permitido superar ciertas limitaciones prácticas de los microscopios (debidas a imperfecciones en el sistema óptico), sino que también han superado dos limitaciones fundamentales del ojo humano: el ojo no puede ver bien bajo una luz extremadamente débil y

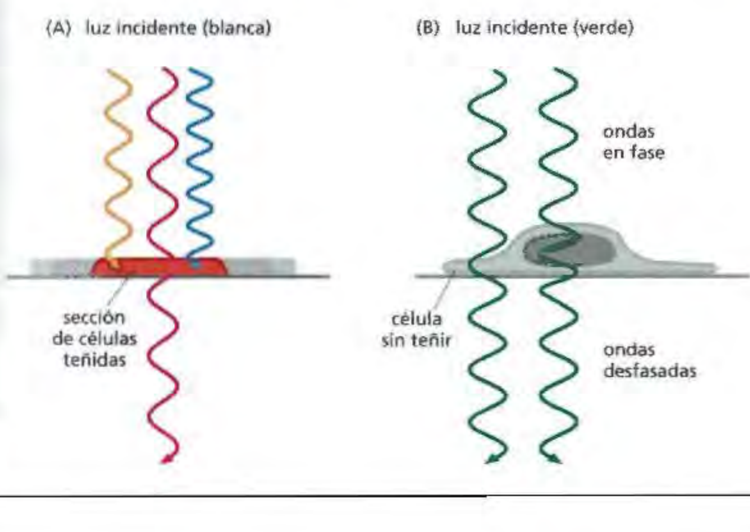


Figura 9–7 Dos sistemas que permiten incrementar el contraste en el microscopio óptico. (A) La zona teñida de la célula podrá absorber, dependiendo de la tinción, la luz de una longitud de onda determinada que pase a través de ella, pero permitirá el paso de otra longitud de onda. De esta forma se obtiene una imagen en color de la célula, visible mediante un microscopio óptico convencional. (B) La luz que pasa a través de la célula viva, no teñida, experimenta ligeros cambios de amplitud y, por consiguiente, muchos de sus detalles no se pueden observar directamente, aunque se amplifique en sumo grado la imagen. Sin embargo, se producen cambios de fase en las ondas luminosas cuando éstas pasan a través de partes gruesas o densas de la célula; estas alteraciones pueden hacerse visibles aprovechando efectos de interferencia mediante un microscopio de contraste de fases o de contraste de fases interferencial.

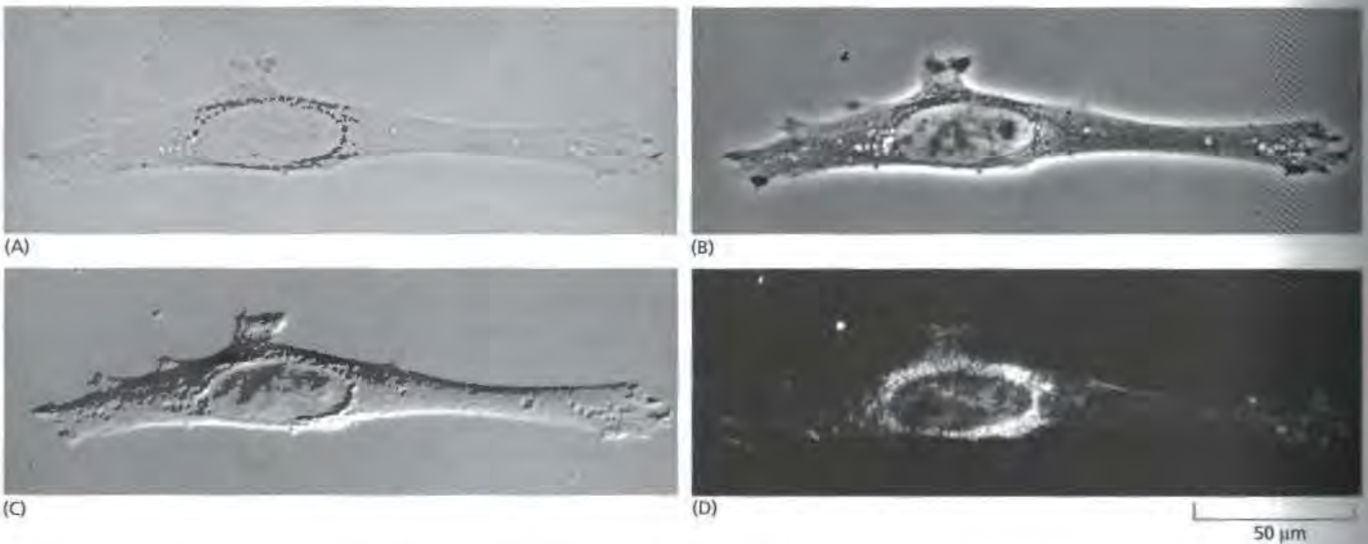


Figura 9–8 Cuatro tipos de microscopios ópticos. Cuatro imágenes del mismo fibroblasto en cultivo. Con los microscopios más modernos se pueden obtener todas estas imágenes cambiando algunos de los sistemas ópticos. (A) Microscopía de campo claro. (B) Microscopía de contraste de fases. (C) Microscopía de contraste de fases interferencial de Nomarski. (D) Microscopía de campo oscuro.

no puede percibir pequeñas diferencias de intensidad de luz sobre un fondo brillante. Para incrementar nuestra capacidad de observación de células a bajas intensidades de luz se adapta a un microscopio una cámara digital sensible. Estas cámaras contienen un dispositivo de cargas interconectadas (CCD: *charge coupled device*) similar al de las cámaras digitales convencionales. A menudo estas cámaras se enfrían para reducir el ruido de la imagen. De este modo, es posible observar células durante largos periodos de tiempo y con muy baja intensidad de luz, evitando los efectos dañinos de la luz intensa prolongada (y el calor que ésta produce). Estas cámaras de baja intensidad luminosa son en especial importantes para visualizar moléculas fluorescentes en las células vivas, como se explicará más adelante.

Dado que las imágenes producidas por CCD son electrónicas, pueden ser digitalizadas, introducidas en un ordenador y procesadas para extraer la información latente. Este procesamiento de la imagen hace posible la compensación de los fallos ópticos de los microscopios, pudiendo alcanzar el límite teórico de resolución del microscopio óptico. Por otra parte, mediante el procesamiento digital de imágenes puede incrementarse el contraste y superar las limitaciones del ojo en la detección de pequeñas diferencias de intensidad de la luz. A pesar de que este procesamiento también incrementa los efectos aleatorios de las irregularidades del sistema óptico, estos defectos pueden eliminarse restando digitalmente una imagen de un área blanca del campo de observación. Este procedimiento permite visualizar pequeños objetos transparentes que antes eran imposibles de distinguir del fondo.

El elevado contraste alcanzable con la microscopía de interferencia asistida por ordenador hace posible la visualización de pequeños objetos como microtúbulos (**Figura 9–9**), que tienen un diámetro de 0,025 µm, menor de una décima parte de la longitud de onda de la luz. Los microtúbulos también se pueden ver con un microscopio de fluorescencia si han sido marcados con fluorocromos (véase la Figura 9–15). En ambos casos, sin embargo, los inevitables efectos de difracción dan una imagen altamente borrosa, de forma que estos microtúbulos aparecen con un diámetro de al menos 0,2 µm y es imposible distinguir un microtúbulo individual de un haz de muchos microtúbulos.

Para ser observados al microscopio, los tejidos intactos son fijados y seccionados

Dado que la mayoría de muestras de tejidos son demasiado gruesas para poder ser examinadas de forma directa a gran resolución, deben ser cortadas en láminas muy finas y transparentes, llamadas *secciones*. Para inmovilizar, matar y preservar las células en el interior de

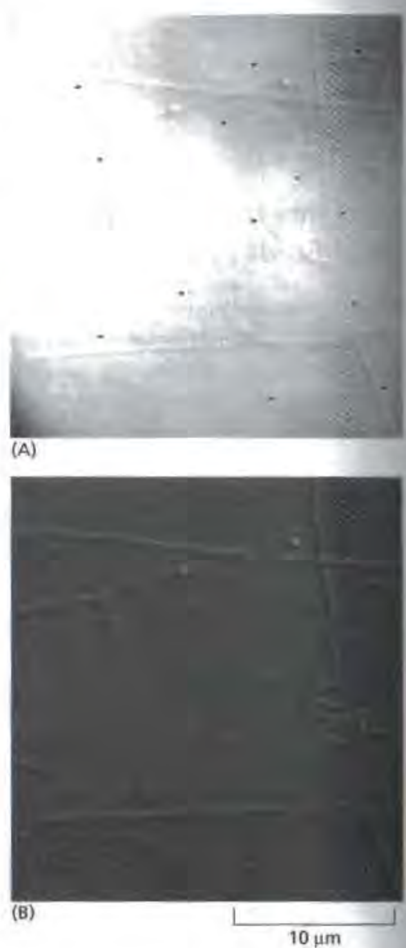


Figura 9–9 Procesamiento de imágenes. (A) Microtúbulos no teñidos en una imagen sin procesamiento digital, visualizados con microscopía de contraste de fases interferencial. (B) La imagen ha sido procesada, eliminando digitalmente el exceso de brillo del fondo e incrementando digitalmente el contraste. El resultado es una imagen más fácil de interpretar. Obsérvese que los microtúbulos son dinámicos y algunos han cambiado su medida o su posición entre una imagen y la otra. (Por cortesía de Viki Allan.)

los tejidos, deben ser tratadas con un *fijador*. Entre los fijadores más habituales se encuentran el formaldehído y el glutaraldehído, los cuales forman enlaces covalentes con los grupos libres de los aminoácidos de las proteínas, uniéndolos entre sí y, por tanto, estabilizándolos e inmovilizándolos en su posición.

Por lo general, los tejidos son muy blandos y frágiles, incluso después de la fijación, de forma que antes de la obtención de los cortes, es necesario incluirlos en un medio de soporte. Los medios más utilizados son ceras o resinas. En estado líquido, estos medios penetran y rodean todo el tejido; entonces, pueden ser endurecidos (por enfriamiento o por polimerización) para que formen un bloque sólido que pueda ser cortado fácilmente con un micrótomo. Se trata de un aparato dotado de una cuchilla que actúa como un "cortafiambres" (**Figura 9–10**). Las secciones (típicamente de 1-10 μm de grosor) se colocan, a continuación, sobre la superficie de un portaobjetos.



Figura 9–10 Obtención de secciones de un tejido. La ilustración muestra cómo se corta con un micrótomo un tejido previamente incluido, como paso previo para su observación al microscopio óptico.

Muy pocas cosas del contenido de la mayoría de las células (las cuales tienen un 70% de agua) impiden el paso de los rayos de luz. Por eso, la mayoría de las células en su estado natural, aunque hayan sido fijadas y seccionadas, son prácticamente invisibles para un microscopio óptico normal. Existen tres aproximaciones principales para trabajar con secciones finas de tejidos que permiten observar las propias células o determinados componentes.

En primer lugar, y tradicionalmente, las secciones pueden ser teñidas con colorantes orgánicos que tengan alguna afinidad específica por algún componente subcelular. Por ejemplo, el colorante *hematoxilina* tiene afinidad por moléculas cargadas negativamente, por lo que revela la distribución del DNA, el RNA y las proteínas ácidas de una célula (**Figura 9–11**). Sin embargo, las bases químicas de la especificidad de la mayoría de colorantes son desconocidas.

En segundo lugar, los tejidos seccionados se pueden utilizar para visualizar patrones específicos de expresión diferencial de genes. La hibridación *in situ* (ya se ha descrito antes, en la p. 573) revela la distribución celular y la abundancia de determinadas moléculas de RNA en material seccionado o en pequeños organismos completos u órganos (**Figura 9–12**). Una tercera aproximación, muy sensible, aplicable de forma general para localizar proteínas de interés, se basa en la utilización de sondas y marcadores fluorescentes, como se explica a continuación.

Mediante la microscopía de fluorescencia se pueden localizar moléculas determinadas en las células

Las moléculas fluorescentes absorben la luz de una determinada longitud de onda y emiten luz de otra longitud de onda más larga. Si iluminamos un componente de este tipo con luz

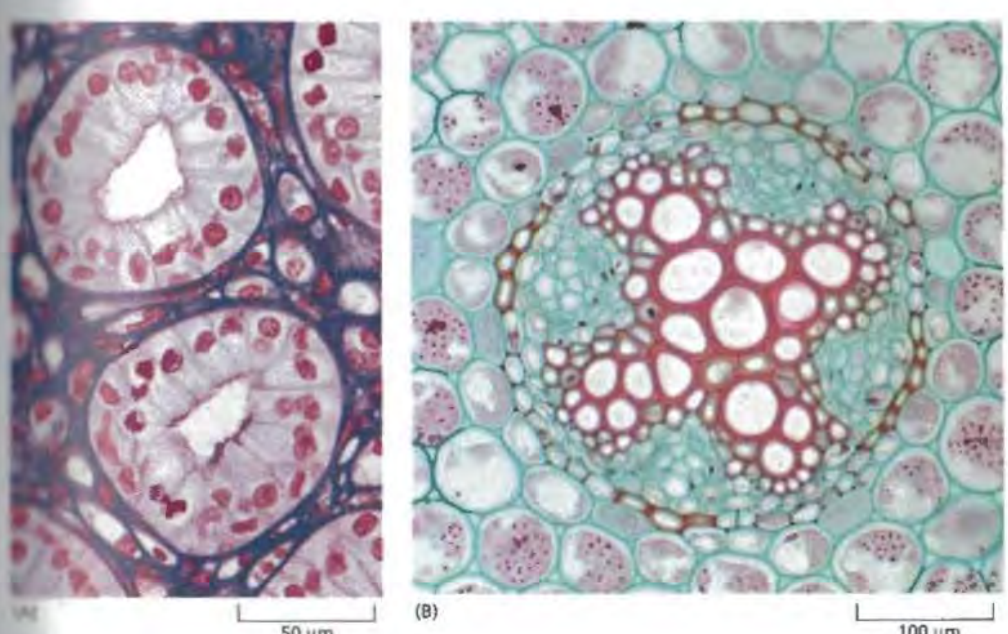


Figura 9–11 Tinción de componentes celulares. (A) Esta sección de células de los conductos colectores urinarios del riñón, se ha teñido con una combinación de colorantes, hematoxilina y eosina, que se utilizan habitualmente en histología. Cada conducto está formado por células íntimamente unidas (con el núcleo teñido de *rojo*) que forman un anillo. El anillo está rodeado de matriz extracelular (lámina basal) teñida de *púrpura*. (B) Esta sección de una raíz de planta joven está teñida con dos colorantes, safranina y verde brillante. El verde brillante tiñe la celulosa de la pared celular mientras que la safranina tiñe la pared celular lignificada del xilema de un rojo brillante. (A, de P.R. Wheater et al., Functional Histology, 2.ª ed. Londres: Churchill Livingstone, 1987; B, cortesía de Stephen Grace.)

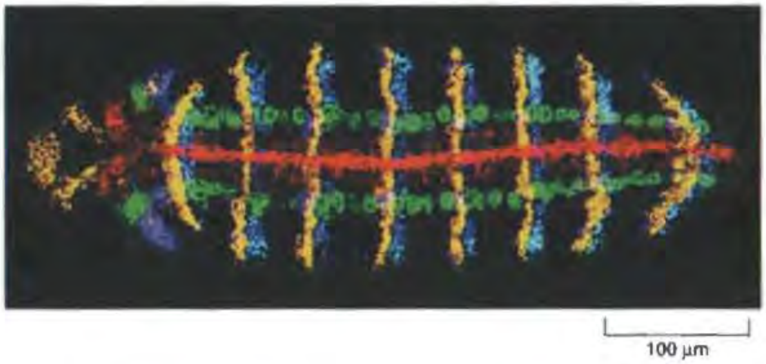


Figura 9–12 Hibridación de RNA *in situ*. Como se explica en el capítulo 8 (véase la Figura 8–71), es posible visualizar la distribución de los diferentes RNA en los tejidos, utilizando la técnica de hibridación *in situ*. En este caso, se observa el patrón de transcripción de cinco genes diferentes, relacionados con el desarrollo temprano del embrión de mosca, en un único embrión. Cada sonda de RNA ha sido marcada con una fluorescencia diferente, bien directa o indirectamente; el resultado son imágenes falsamente coloreadas, que combinadas permiten ver con más claridad cada uno de los transcritos individuales. Los genes, cuyo patrón de expresión se muestra, son *sin alas (wingless, amarillo), engrailed (azul), gastrulación corta (rojo), neuroblastos intermedios defectuosos (verde)* y *homeobox específico de músculo (púrpura)*. (De D. Kosman et al., *Science* 305:846, 2004. Con la autorización de AAAS.)

de la longitud de onda que absorbe y lo visualizamos a través de un filtro que sólo permita pasar la luz de longitud de onda igual a la de la luz emitida, el componente aparecerá brillante sobre un fondo oscuro. Dado que el fondo es oscuro, se puede detectar cualquier señal del colorante por pequeña que ésta sea. El mismo número de moléculas de un colorante ordinario observado de forma convencional sería prácticamente invisible porque daría un matiz apenas visible a la luz que atraviesa esa parte de la muestra.

Los colorantes fluorescentes utilizados para la tinción celular son visualizados con la ayuda del denominado **microscopio de fluorescencia**. Este microscopio es similar al microscopio óptico convencional, a excepción de que la luz incidente, procedente de una potente fuente, atraviesa dos series de filtros –uno para interceptar la luz antes de que llegue a la muestra y otro para filtrar la luz que se obtiene a partir de la muestra. El primer filtro se selecciona de manera que sólo permita el paso de las longitudes de onda que excitan al colorante fluorescente concreto que se ha utilizado, mientras que el segundo filtro bloquea esta luz y sólo permite el paso de las longitudes de onda que emite el colorante una vez excitado (**Figura 9–13**).

La microscopía de fluorescencia se utiliza por lo general para detectar específicamente proteínas u otras moléculas en células y tejidos. Una técnica muy utilizada y potente consiste en acoplar de forma covalente un colorante fluorescente a moléculas de un anticuerpo, el cual se puede utilizar entonces como un reactivo muy específico y versátil que se une de forma selectiva a las macromoléculas que reconoce en las células o en la matriz extracelular. Hay dos colorantes fluorescentes que se han utilizado con frecuencia para con este propósito: la *fluoresceína*, que cuando es excitada por luz azul emite una fluorescencia de color verde intenso, y la *rodamina*, que cuando es excitada con una luz verde-amarilla emite una fluorescencia de color rojo intenso (**Figura 9–14**). Acoplando una molécula a la fluoresceína y otra a la rodamina, se puede comparar la distribución de diferentes moléculas en la misma célula; ambas moléculas son detectadas separadamente en el microscopio cambiando las

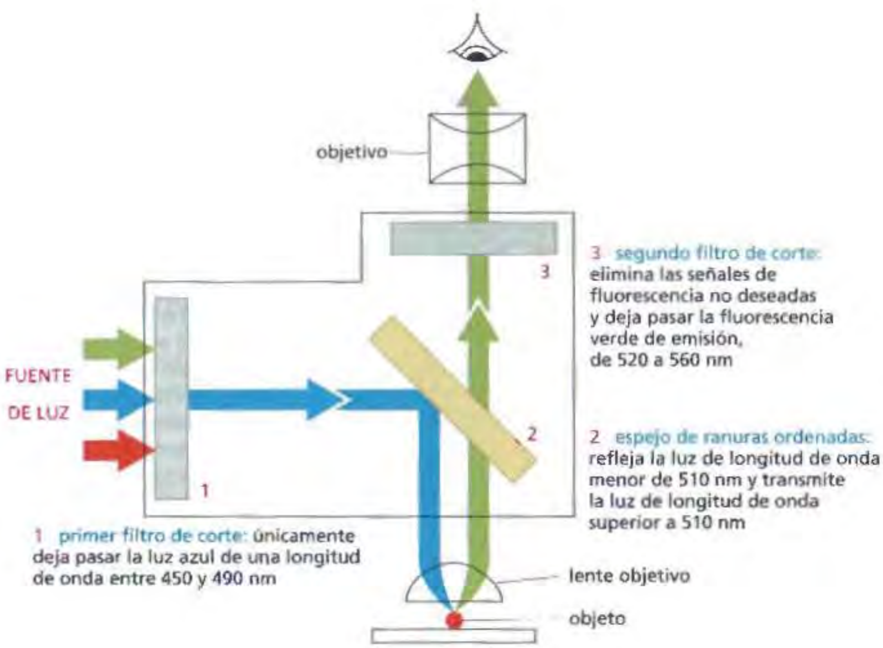


Figura 9–13 Sistema óptico de un microscopio de fluorescencia. El juego de filtros consta de dos filtros de corte (1 y 3) y de un espejo dicroico (de ranuras ordenadas) (2). Este ejemplo muestra un juego de filtros adecuado para la detección de la fluorescencia de la fluoresceína. En este tipo de microscopios es especialmente importante que la lente objetivo tenga una elevada apertura numérica, ya que para una amplificación dada, la brillantez de la imagen fluorescente es proporcional a la cuarta potencia de la apertura numérica (véase también la Figura 9-6).

dos series de filtros, uno específico para cada colorante. De la misma manera, tal como se muestra en la **Figura 9–15**, se utilizan tres colorantes fluorescentes para distinguir tres tipos de moléculas distintas en la misma célula. Muchos colorantes fluorescentes aparecidos más recientemente, como Cy3, Cy5 y los colorantes Alexa se han desarrollado para ser utilizados en la microscopía de fluorescencia (Figura 9–14). Estos fluorocromos orgánicos tienen algunas desventajas. Sólo se excitan por una luz de longitud de onda muy precisa pero diferente y, además, la luz decae con rapidez cuando son iluminados de forma continua. Para solucionar este problema se han desarrollado fluorocromos inorgánicos más estables. Finos cristales de material semiconductor, llamados nanopartículas o *puntos cuánticos* también se pueden excitar por un amplio espectro de luz azul y emiten fluorescencia. La luz que emiten tiene un color que depende del tamaño exacto del nanocristal, de entre 2 y 10 nm de diámetro y, además, la fluorescencia decae lentamente (**Figura 9–16**). Por lo tanto, estas nanopartículas, que se pueden acoplar con otras sondas como anticuerpos, resultan ideales para seguir moléculas en el tiempo. Si se introducen en una célula viva, por ejemplo en un embrión, se puede seguir la progenie de esta célula durante varios días debido a su fluorescencia, lo cual permite trazar linajes celulares.

Métodos de microscopía de fluorescencia, que se describen más adelante en este capítulo, se pueden utilizar para seguir cambios en la concentración y localización de moléculas específicas en *células vivas* (véase página 592).

Se pueden utilizar anticuerpos para detectar determinadas moléculas

Los anticuerpos son proteínas producidas por el sistema inmunológico de los vertebrados como defensa contra las infecciones (véase Capítulo 24). Tienen una cualidad única entre las proteínas: se producen en miles de millones de formas diferentes, cada una de las cuales tiene un lugar de unión diferente que reconoce de forma específica a una molécula diana (o *antígeno*). La exacta especificidad de los anticuerpos frente a los antígenos los convierte en poderosas herramientas para la biología celular. Marcados con colorantes fluorescentes, los anticuerpos resultan muy útiles para localizar de forma específica determinadas moléculas en las células, mediante microscopía de fluorescencia (**Figura 9–17**); marcados con partículas densas en electrones, como pueden ser las esferas de oro coloidal, se utilizan con un propósito similar en la microscopía electrónica (se trata más adelante).

Cuando utilizamos anticuerpos como sondas para detectar y analizar moléculas determinadas en las células, mediante métodos químicos se amplifica la señal fluorescente que

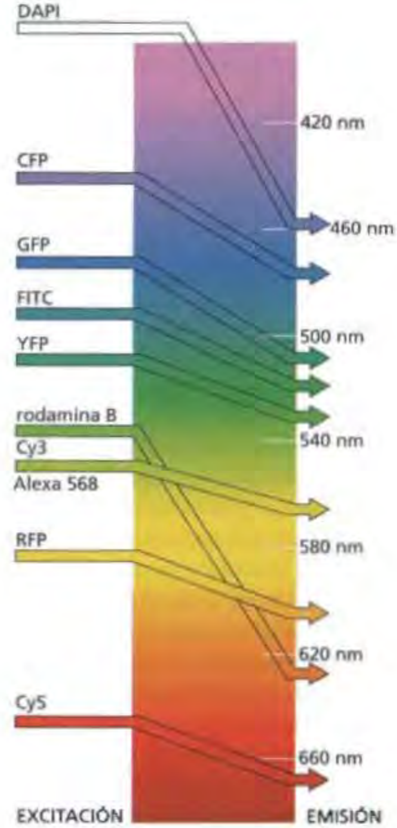


Figura 9–14 Sondas fluorescentes. Se muestran las longitudes de onda de máxima excitación y de emisión de las sondas fluorescentes más utilizadas en relación a los colores correspondientes del espectro. El fotón emitido por una molécula fluorescente tiene necesariamente una energía menor (longitud de onda más larga) que el fotón absorbido y esto da lugar a la diferencia entre los picos de excitación y de emisión. La GFP, la YFP y la RFP son proteínas fluorescentes azul, verde y amarilla, respectivamente. No son colorantes, tal como se explica más adelante. DAPI es muy utilizada como un compuesto fluorescente general que tiñe sondas de DNA, absorbe luz UV y emite luz azul brillante. FITC es la abreviación de isotiocianato fluorescente (*fluorescence isothiocyanate*), un derivado de la fluoresceína de amplio uso que emite luz verde brillante. El resto de sondas se utilizan para marcar anticuerpos y otras proteínas.

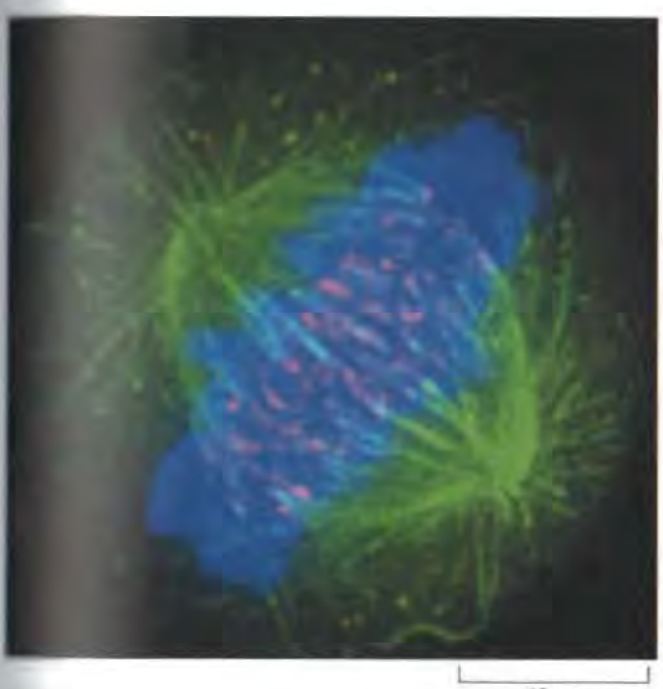


Figura 9–15 Ensayo de microscopía fluorescente con sonda múltiple. En esta micrografía de una célula en mitosis, se han utilizado tres sondas fluorescentes diferentes para teñir tres compuestos celulares diferentes. <GTCT> Los microtúbulos se han revelado con un anticuerpo *verde* fluorescente, los centrómeros con uno *rojo* y el DNA de los cromosomas condensados con el colorante fluorescente *azul* DAPI. (Por cortesía de Kevin F. Sullivan.)

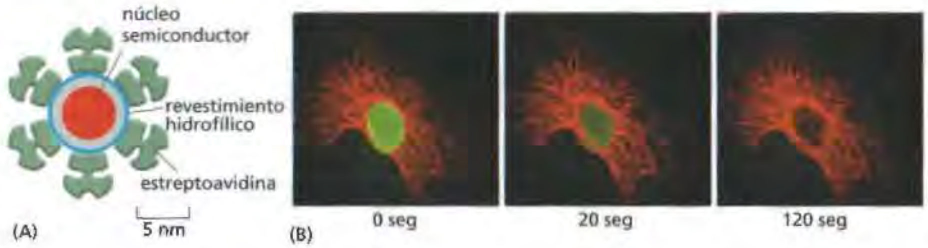


Figura 9–16 Nanopartículas fluorescentes o puntos cuánticos. Los puntos cuánticos son diminutas nanopartículas de selenito de cadmio, un semiconductor, con un revestimiento que les hace solubles en agua (A). Se pueden unir a sondas proteicas como anticuerpos o estreptoavidina y, cuando se introducen en la célula, se pueden unir a proteínas de interés. Los puntos cuánticos de diferentes tamaños emiten luz de colores diferentes –puntos más grandes emiten longitudes de onda más largas– pero todos ellos son excitados por la misma luz azul. (B) Los puntos cuánticos pueden brillar durante semanas, a diferencia de la mayoría de los colorantes orgánicos fluorescentes. En esta célula, una proteína nuclear está marcada (*verde*) con un colorante orgánico fluorescente (Alexa 488), mientras que los microtúbulos están teñidos (*rojo*) con puntos cuánticos unidos a estreptoavidina. En una exposición continuada a luz azul, el marcaje fluorescente se pierde rápidamente, mientras que los puntos cuánticos prolongan la fluorescencia. (B, de X. Wu et al., *Nat. Biotechnol.* 21:41-46, 2003. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

producen. Por ejemplo, aunque una molécula marcadora como un colorante fluorescente se puede unir directamente a un anticuerpo que será utilizado para el reconocimiento específico –el *anticuerpo primario*–, se consigue una señal mayor utilizando el anticuerpo primario sin marcar y después detectándolo con un grupo de *anticuerpos secundarios* marcados que se unan a él (**Figura 9–18**). Este proceso se denomina *inmunocitoquímica indirecta.*

Los métodos de amplificación más sensibles utilizan una enzima como molécula marcadora, unida al anticuerpo secundario. Por ejemplo, la fosfatasa alcalina es una enzima que en presencia de los reactivos adecuados produce fosfato inorgánico que, a su vez, genera la formación localizada de un precipitado coloreado. Este precipitado revela la presencia del anticuerpo secundario y, por lo tanto, la localización del complejo antígeno-anticuerpo. Puesto que cada molécula de enzima actúa catalíticamente generando varios cientos de moléculas de producto, este sistema permite la detección de cantidades ínfimas de antígeno. Sobre este principio se ha desarrollado el test ELISA *(enzyme-linked immunosorbent assay)*, que se utiliza en medicina y en la práctica clínica como un test de alta sensibilidad –por ejemplo como prueba de embarazo o para detectar varios tipos de infecciones. La amplificación enzimática hace que los métodos que utilizan una enzima unida al anticuerpo secundario sean muy sensibles, pero la difusión del precipitado de color que produce la enzima limita la resolución espacial de este método para la microscopía, por lo que cuando se desea conseguir la localización óptica más precisa posible se utilizan más a menudo los marcadores fluorescentes.

La manera más sencilla de preparar anticuerpos consiste en inyectar varias veces a un animal, como un conejo o una cabra, una muestra de un antígeno y luego extraer el suero rico en anticuerpo. Este *antisuero* contiene una mezcla heterogénea de anticuerpos, cada uno de los cuales ha sido producido por una célula secretora de anticuerpos diferente (un linfocito B). Los diferentes anticuerpos reconocen diferentes zonas de la molécula de antígeno (denominadas determinantes antigénicos o epítopos) y también impurezas de la preparación de antígeno que se inyectó. Eliminando las moléculas de anticuerpo que se unen a otras moléculas se puede aumentar la especificidad de un antisuero por una proteína deter-

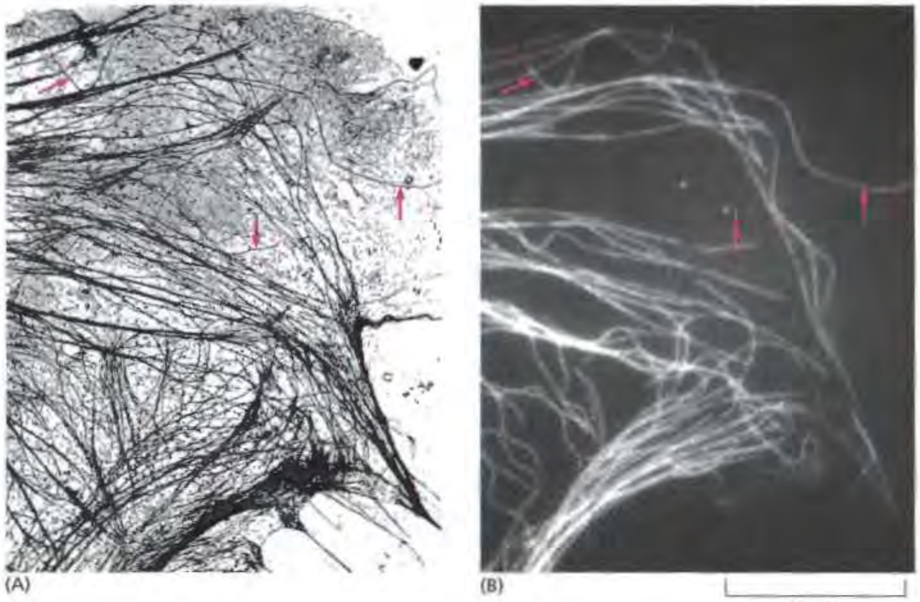


Figura 9–17 Inmunofluorescencia. (A) Electromicrografía de la zona cortical de una célula epitelial en cultivo, que muestra la distribución de los microtúbulos y de otros microfilamentos. (B) La misma área pero teñida con un anticuerpo fluorescente antitubulina, la proteína que se une formando los microtúbulos, utilizando la técnica de la inmunocitoquímica indirecta (véase Figura 9-18). Las *flechas rojas* indican microtúbulos individuales fácilmente reconocibles en ambas figuras. Nótese que debido a los efectos de difracción, en el microscopio óptico los microtúbulos aparecen 0,2 µm más gruesos que su tamaño real de 0,025 µm. (De M. Osborn, R. Webster y K. Weber, *J. Cell. Biol.* 77:R27-R34, 1978. Reproducido con la autorización de The Rockefeller University Press.)



Figura 9-18 Inmunocitoquímica indirecta. Este método de detección es muy sensible debido a que cada anticuerpo primario es reconocido por muchas moléculas del anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario está unido covalentemente a una molécula marcadora que lo hace detectable con facilidad. Entre las moléculas marcadoras más utilizadas se encuentran los colorantes fluoresceína y rodamina (para microscopía de fluorescencia), la enzima peroxidasa de rábano (tanto para microscopía óptica convencional como para microscopía electrónica), esferas de oro coloidal (para microscopía electrónica) y las enzimas fosfatasa alcalina o peroxidasa (para su detección bioquímica).

...nada. Por ejemplo, un antisuero producido contra una proteína X, cuando se hace pasar a través de una columna de afinidad de antígenos X, se unirá a estos antígenos mientras que otros anticuerpos atravesarán la columna. Posteriormente, los anticuerpos anti-X purificados se pueden eluir de la columna. Incluso así, a menudo la heterogeneidad de estos antisueros limita su utilidad. La utilización de anticuerpos monoclonales ha solucionado este problema (Figura 8-8). Sin embargo, su uso también presenta algunos inconvenientes. Puesto que son anticuerpos contra un único tipo de proteína, presentan una especificidad casi perfecta por un solo epítopo del antígeno, pero la accesibilidad del epítopo y, por tanto, la utilidad del anticuerpo, dependerá del proceso de preparación de la muestra. Por ejemplo, algunos anticuerpos monoclonales sólo reaccionan contra antígenos que no han sido fijados, otros si se han utilizado unos fijadores determinados, e incluso otros sólo reconocen proteínas previamente desnaturalizadas en un gel de SDS poliacrilamida y no reconocen la proteína en su conformación nativa.

Es posible obtener imágenes de objetos tridimensionales complejos mediante la microscopía óptica

Como ya hemos visto, para poder observar un tejido al microscopio óptico convencional se tiene que cortar en finas secciones; cuanto más finas sean las secciones mejor definidas resultarán las imágenes. Sin embargo, el proceso de obtención de las secciones hace perder información respecto a la tercera dimensión. ¿Entonces cómo podemos obtener una imagen de la arquitectura tridimensional de una célula o de un tejido? ¿Cómo podemos ver la estructura microscópica de una muestra que por una u otra razón no pueda ser cortada en secciones? Aunque un microscopio óptico enfoque concretamente un plano determinado dentro de la compleja estructura tridimensional de la muestra, el resto de la muestra, situado por encima y por debajo del plano focal, también está iluminada y la luz originada a partir de estas regiones contribuye a la formación de una imagen fuera de foco, degradada y borrosa. Esto puede hacer que la imagen sea difícil de interpretar en detalle, perdiéndose la nitidez de la estructura de la imagen.

Para solucionar este problema se han desarrollado dos métodos diferentes pero complementarios: uno es informático y el otro óptico. Estos métodos de imagen microscópica tridimensional hacen posible el enfoque de un plano determinado en una muestra fina a la vez que es eliminada la luz que proviene de las zonas fuera de foco, por encima y por debajo del plano focal. De esta manera se consigue una imagen nítida de una fina *sección óptica*. A partir de una serie de estas secciones ópticas tomadas a diferentes niveles y almacenadas en un ordenador, resulta sencillo reconstruir una imagen tridimensional. Estos métodos suponen para el microscopista lo que la TAC (tomografía axial computerizada) de barrido supuso (por diferentes razones) para los radiólogos que estudiaban el cuerpo humano: ambos sistemas proporcionan imágenes detalladas de secciones del interior de una estructura intacta.

El método informático utilizado para clarificar una imagen tridimensional se denomina *deconvolución*. Para entender cómo funciona, es necesario recordar que la naturaleza casi ondulatoria de la luz hace que los sistemas de lentes del microscopio reproduzcan como un disco borroso la imagen de un punto (véase la Figura 9-5), que aún resulta más borroso si se encuentra por encima o por debajo del plano focal. Esta imagen borrosa de un punto se llama *función de dispersión de un punto*. Se puede imaginar que una imagen de un objeto complejo se ha formado sustituyendo cada punto de la muestra por un disco borroso, dando como resultado una imagen que está, toda ella, desenfocada. Para realizar la deconvolución primero se obtiene una serie de imágenes (desenfocadas), por lo general con una

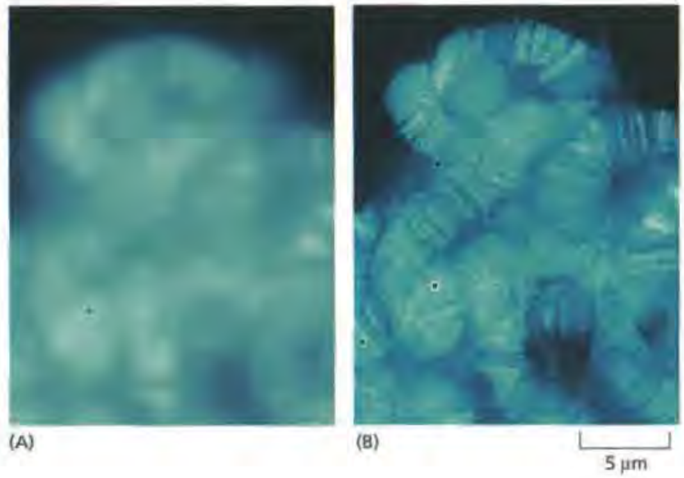


Figura 9–19 Imagen por deconvolución. (A) Micrografía óptica de los grandes cromosomas politénicos de *Drosophila*, teñidos con un colorante fluorescente que se une a la molécula de DNA. (B) El mismo campo después de limpiar la imagen, de manera que ahora se ve claramente el patrón de bandas del cromosoma. Cada banda tiene aproximadamente 0,25 µm de grosor, cercano al límite de resolución del microscopio óptico. (Por cortesía del laboratorio de John Sedat.)

cámara CCD enfriada), enfocando el microscopio alrededor de una serie de planos focales; de hecho, se obtiene una imagen tridimensional borrosa. Después, el conjunto de imágenes digitales es procesado por un ordenador que elimina en la medida de lo posible el desenfoque. Básicamente, el programa informático utiliza la función de dispersión de un punto del microscopio, para determinar qué nivel de desenfoque se ha dado en la imagen, y después aplica una inversión equivalente de este desenfoque (deconvolución), convirtiendo la imagen tridimensional borrosa en una serie de secciones ópticas claras. El sistema informático que se requiere es bastante complejo, lo cual suele suponer una limitación importante. Sin embargo, con ordenadores más rápidos y más baratos este método está ganando popularidad. En la **Figura 9–19** se muestra un ejemplo.

El microscopio confocal produce secciones ópticas, eliminando la luz que queda fuera de foco

El microscopio confocal consigue un resultado similar al de la deconvolución, pero lo hace manipulando la luz antes de que ésta sea medida; por tanto no es una técnica digital sino analógica. Los detalles ópticos del **microscopio confocal** son complejos, pero la idea básica es sencilla, como se ilustra en la **Figura 9–20**, y los resultados son muy superiores a los obtenidos por la microscopia óptica convencional (**Figura 9–21**).

El microscopio utiliza una óptica fluorescente (véase Figura 9–13), pero en lugar de iluminar toda la muestra a la vez, como se hace habitualmente, en cada instante el sistema óptico enfoca un pequeño punto luminoso en una profundidad determinada de la muestra. Se necesita una fuente de luz que produzca puntos luminosos muy brillantes; habitualmente se utilizan fuentes láser cuya luz haya pasado a través de un diafragma. La fluorescencia emitida por el material iluminado se recoge y produce una imagen a la entrada de un detector de luz adecuado. Se coloca un diafragma en el detector, en el lugar que es *confocal* con el punto luminoso –que es precisamente donde los rayos luminosos emitidos por el punto iluminado de la muestra están enfocados. Así, la luz de este punto de la muestra converge sobre esta apertura y entra en el detector.

Por lo contrario, la luz que procede de las regiones situadas fuera del plano focal del punto luminoso también están fuera de foco en el diafragma, por lo que resulta en gran manera excluida del detector (véase Figura 9–20). Para obtener una imagen bidimensional se recoge de forma secuencial la información de cada punto luminoso del plano focal mediante un barrido por todo el campo a observar (como ocurre en una pantalla de televisión) y se proyecta en una pantalla de vídeo. A pesar de que no se presenta en la Figura 9–20, el barrido se obtiene por reflexión del haz luminoso en un espejo oscilante situado entre el espejo dicroico y las lentes del objetivo de tal forma que el punto luminoso y el diafragma confocal del detector permanezcan en registro.

El microscopio de barrido confocal se ha utilizado para resolver estructuras de numerosos objetos tridimensionales complejos (**Figura 9–22**), incluyendo las redes de fibras del citoesqueleto del citoplasma y la disposición de los cromosomas y de los genes en el núcleo.

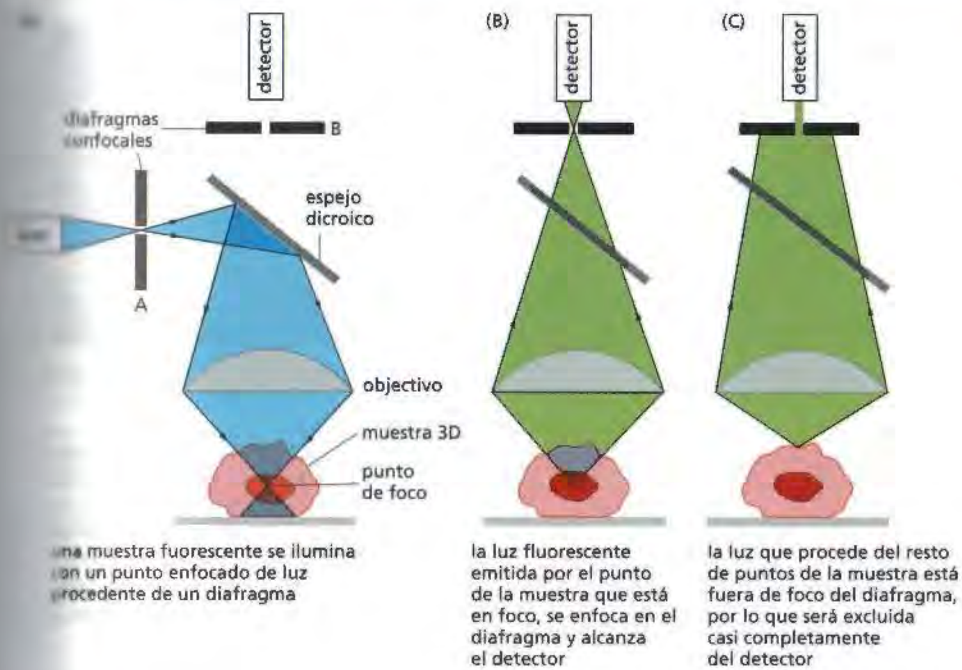


Figura 9–20 El microscopio confocal de fluorescencia. Este sencillo esquema muestra que la disposición básica de los componentes ópticos es similar a la del microscopio de fluorescencia estándar mostrado en la Figura 9–13, excepto en que en éste se utiliza un láser para iluminar una pequeña mancha de luz cuya imagen se enfoca en un solo punto de la muestra (A). La fluorescencia emitida por este punto de la muestra se enfoca en un segundo diafragma (confocal) (B). La luz emitida por el resto de la muestra no se enfoca en el diafragma, por lo que no contribuirá a formar la imagen final (C). Mediante un barrido de la mancha de luz por toda la muestra se obtiene una imagen bidimensional muy fina exactamente del plano de foco, que no está degradada de forma significativa por la luz procedente de otras regiones de la muestra.

Los méritos relativos de los métodos de la deconvolución y de la microscopía confocal respecto a la microscopía óptica tridimensional todavía son objeto de debate. El microscopio confocal es, en general, más sencillo de manejar que los sistemas de deconvolución y las secciones ópticas finales se pueden ver rápidamente. Por el contrario, las cámaras CCD (*charge-coupled device*) que se utilizan en los sistemas de deconvolución son extremadamente eficientes captando pequeñas cantidades de luz y se pueden utilizar para tomar buenas imágenes tridimensionales de muestras que están muy débilmente teñidas o que se dañan muy fácilmente con la luz brillante utilizada en la microscopía confocal.

Sin embargo, ambos métodos tienen otro inconveniente: no son eficientes para trabajar con muestras finas. Los métodos de deconvolución enseguida se vuelven ineficientes a profundidades de unos 40 μm dentro de una muestra, mientras que los microscopios confocales únicamente pueden obtener imágenes hasta profundidades de unos 150 μm. En la actualidad, los microscopios confocales especiales pueden aprovechar la manera en la que se excitan las moléculas fluorescentes, para sumergirse todavía más en las muestras. Las moléculas fluorescentes se excitan por un solo fotón de alta energía, de longitud de onda menor que la de la luz emitida, pero también pueden ser excitados por la absorción de dos o más fotones de energía menor, siempre y cuando lleguen a una distancia temporal de cómo máximo un femtosegundo uno del otro. La utilización de esta excitación por longitud de onda larga tiene algunas ventajas importantes. Además de reducir el ruido de fondo, la luz roja o

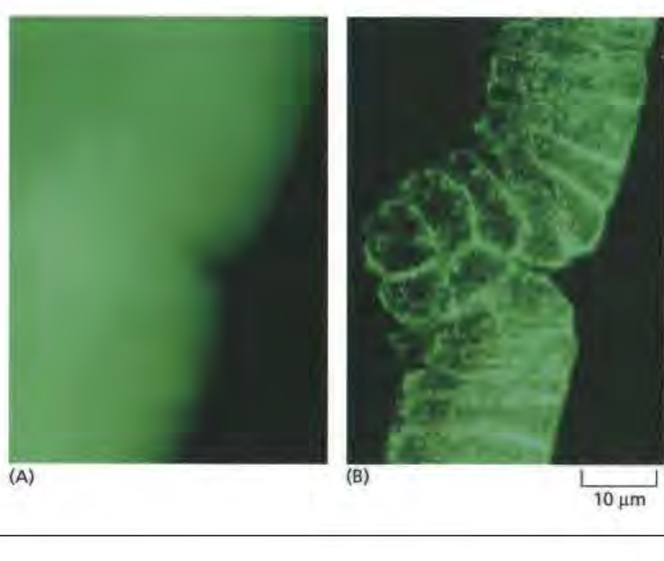


Figura 9–21 Comparación entre la microscopía convencional y la confocal. Estas dos micrografías proceden del mismo embrión intacto de *Drosophila* en estado de gástrula, teñido con una sonda fluorescente para filamentos de actina. La imagen convencional no procesada (A) resulta borrosa debido a la presencia de estructuras fluorescentes situadas por encima y por debajo del plano focal. En la imagen confocal (B) esta información fuera de foco se ha eliminado, resultando una sección óptica de la célula del embrión bien definida. (Por cortesía de Richard Warn y Peter Shaw.)



Figura 9–22 Reconstrucción tridimensional a partir de imágenes del microscopio de barrido confocal. Los granos de polen, en este caso de la flor de la pasionaria, tienen una pared celular estructurada de forma muy compleja que contiene compuestos fluorescentes. Las imágenes obtenidas a diferentes profundidades del grano utilizando un microscopio de barrido confocal, se pueden combinar obteniéndose una imagen tridimensional del grano de polen completo, como se muestra a la derecha. A la izquierda se presentan algunas secciones ópticas individuales de la serie completa de 30, cada una de las cuales contribuye ligeramente a la imagen final. (Por cortesía de Brad Amos.)

roja cercana puede penetrar más profundamente en las muestras. Los microscopios confocales multifotón, construidos para aprovechar la ventaja de este efecto de "**dos fotones**", pueden obtener imágenes a una profundidad de la muestra de unos 0,5 mm. Esto resulta en especial valioso para realizar estudios en tejidos vivos, como la actividad dinámica de las sinapsis y las neuronas que se hallan justo por debajo de la superficie de los cerebros vivos (**Figura 9–23**).

Las proteínas fluorescentes se pueden utilizar para marcar proteínas individuales en células y organismos vivos

Durante el ciclo celular de una célula, incluso la estructura celular más estable puede ser ensamblada, desensamblada y reorganizada. Otras estructuras, a menudo enormes a escala molecular, rápidamente cambian, se desplazan y se reorganizan cuando la célula realiza sus tareas internas y responde a su ambiente. Elementos complejos muy organizados de maquinarias moleculares desplazan sus componentes alrededor de la célula controlando el tráfico hacia dentro y hacia fuera del núcleo, entre un orgánulo y otro y hacia dentro o hacia fuera de la propia célula.

Se han desarrollado varias técnicas para hacer visibles al microscopio determinados componentes de las células vivas. La mayoría de estos métodos utilizan proteínas fluorescentes y requieren un compromiso entre la preservación de la estructura y la eficiencia del marcaje. Todas las moléculas fluorescentes de las que hemos tratado hasta ahora, se han sintetizado fuera de la célula y luego se han introducido de forma artificial dentro de ella. Ahora se han abierto nuevas oportunidades con el descubrimiento de genes que codifican moléculas de proteína que tienen fluorescencia inherente. La ingeniería genética permite la generación de líneas celulares u organismos que fabrican sus propias marcas sin la introducción de moléculas extrañas. Estas células exhibicionistas muestran su maquinaria interior en colores brillantes fluorescentes.

El primero entre las proteínas fluorescentes utilizadas con esta finalidad por los biólogos celulares es la **proteína fluorescente verde** (**GFP**: ***green fluorescent protein***), aislada a partir de la medusa *Aequoria victoria*. Esta proteína está codificada de forma normal por un solo gen que se puede clonar e introducir en células de otras especies. La proteína acabada de traducir no es fluorescente, pero al cabo de aproximadamente una hora (según los alelos de que se trate) inicia una modificación postraduccional autocatalizada que da lugar a un centro eficiente y de un fluorescente brillante, situado en el interior de una proteína con forma de barril (**Figura 9–24**). La mutagénesis dirigida extensiva realizada sobre la secuencia original del gen ha dado lugar a fluorescencia útil en organismos tan variados como animales, plantas, hongos y microbios. La eficiencia de la fluorescencia también se ha mejorado y se han generado variantes con espectros de absorción y de emisión modificados en el rango del azul-verde-amarillo. Recientemente se ha descubierto en corales una familia de proteí-



Figura 9–23 Imágenes multifotón. La luz láser infrarroja produce daños leves en las células vivas y tiene un elevado poder de penetración, lo que permite a los microscopistas profundizar en los tejidos vivos. El efecto de dos fotones, por el que un fluorocromo puede ser excitado por dos fotones infrarrojos coincidentes en vez de un solo fotón de alta energía, nos permite ver casi 0,5 mm del interior del córtex cerebral de un ratón vivo. Un colorante, cuya fluorescencia cambia con la concentración de calcio, revela sinapsis activas (*amarillo*) en las dendritas espinales (*rojo*) que cambian en función del tiempo. (Por cortesía de Karel Svoboda.)

nas fluorescentes relacionadas, que ha aumentado el rango a la región roja del espectro (véase Figura 9–14).

Una de las utilizaciones más sencillas de la GFP es como molécula indicadora, una sonda fluorescente que indica la expresión génica. Se puede generar un organismo transgénico con la secuencia que codifica GFP situada bajo el control transcripcional de un promotor que pertenece a un gen de interés, con lo que se obtendrá un patrón visible de la expresión de este gen en un organismo vivo (**Figura 9–25**). En otra aplicación, se puede añadir una señal de localización peptídica a la GFP para dirigirla a un compartimiento celular particular, como el retículo endoplasmático o la mitocondria, "iluminando" así estos compartimientos de forma que se pueden observar en su estado vivo (véase Figura 12–35B).

La secuencia de DNA que codifica GFP también se puede insertar al principio o al final del gen de otra proteína para generar un producto quimera formado por la proteína de interés con un domino GFP unido a ella. En muchos casos esta proteína de fusión con GFP se comporta de la misma forma que la proteína original, revelándonos de forma directa su localización y sus actividades mediante su contraste codificado genéticamente (**Figura 9–26**). <TTAT> A menudo es posible demostrar que la proteína de fusión con GFP tiene una función equivalente a de la proteína no marcada, por ejemplo utilizándola para rescatar un mutante que carece de esta proteína. El marcaje con GFP es la vía más clara y más inequívoca de mostrar la distribución y la dinámica de una proteína en un organismo vivo (**Figura 9–27**). <TTCT>

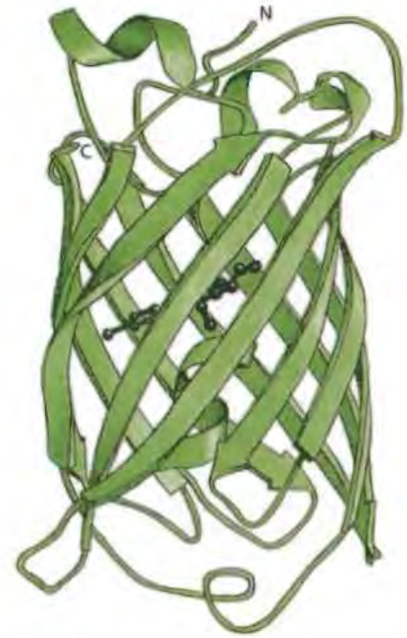


Figura 9–24 La proteína fluorescente verde (GFP). La estructura de la GFP, ilustrada de forma esquemática, subraya las once láminas β que forman las paredes del barril. Encerrado dentro del barril se encuentra el cromóforo activo (en *verde oscuro*) que se forma después de la traducción a partir del lado protuberante de las cadenas de tres residuos de aminoácidos. (Adaptado de M. Ormö et al., *Science* 273:1392-1395, 1996. Con la autorización de AAAS.)

La dinámica de las proteínas se puede seguir en células vivas

Las proteínas fluorescentes se utilizan no sólo para ver en qué lugar de la célula se localiza una proteína determinada sino también para descubrir sus propiedades cinéticas y si puede interaccionar con otras proteínas. A continuación, se describen tres técnicas en las que se utilizan las GFP y proteínas semejantes en este sentido.

La primera de ellas es el seguimiento de interacciones entre dos proteínas mediante **transferencia de energía fluorescente por resonancia (FRET**: *fluorescence resonance energy transfer*). En esta técnica, cuyos principios ya hemos descrito (véase Figura 8–26), las dos moléculas de interés son marcadas, cada una con un fluorocromo diferente y el espectro de emisión de uno de ellos se solapa con el espectro de absorción del otro. Si las dos proteínas se unen de forma que sus fluorocromos queden muy próximos (a unos 5 nm), uno de ellos transfiere directamente al otro la energía de la luz absorbida. Así, cuando el complejo es iluminado con la longitud de onda de excitación del primer fluorocromo, se produce luz de la longitud de onda de emisión del segundo fluorocromo. Este método se puede utilizar con dos variantes espectrales de GFP utilizándolas como fluorocromos para seguir procesos como la interacción de moléculas señal con sus receptores o para visualizar proteínas en complejos macromoleculares (**Figura 9–28**).

La complejidad y rapidez de muchos procesos intracelulares, como las acciones de las moléculas señal o los desplazamientos de las proteínas del citoesqueleto, hace que resulten difíciles de estudiar a un único nivel celular. Idealmente, deberíamos ser capaces de introducir en una célula viva cualquier molécula de interés, en un momento y en una localización determinadas, y seguir su comportamiento posterior, así como la respuesta de la célula a esta molécula. La microinyección está limitada por la dificultad del control del lugar y del momento de la administración. Una aproximación más poderosa consiste en sintetizar una forma inactiva de la molécula fluorescente de interés, introducirla en la célula y activarla bruscamente en un lugar determinado de la célula enfocando un punto de luz sobre ella. Este proceso se denomina **fotoactivación**. Se han sintetizado precursores fotosensibles de este tipo, a veces denominados *moléculas enjauladas*, a partir de muchas moléculas fluorescentes. Se puede utilizar un microscopio para enfocar un intenso pulso de luz proceden-

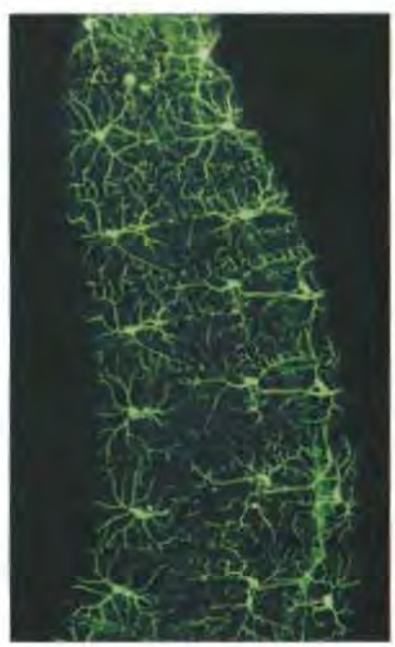


Figura 9–25 La proteína fluorescente verde (GFP) como reportera. Para este experimento, realizado en la mosca de la fruta, se ha unido (mediante técnicas de DNA recombinante) el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) con un promotor que es activo sólo en un grupo especializado de neuronas de la mosca. Esta imagen de un embrión vivo de mosca se ha captado mediante microscopía fluorescente y muestra aproximadamente 20 neuronas, cada una de las cuales tiene largas proyecciones (axones y dendritas) que se comunican con otras células (no fluorescentes). Estas neuronas se localizan bajo la superficie del animal y le permiten percibir su entorno inmediato. (De W.B. Grueber et al., *Curr. Biol.* 13:618-626, 2003. Con la autorización de Elsevier.)

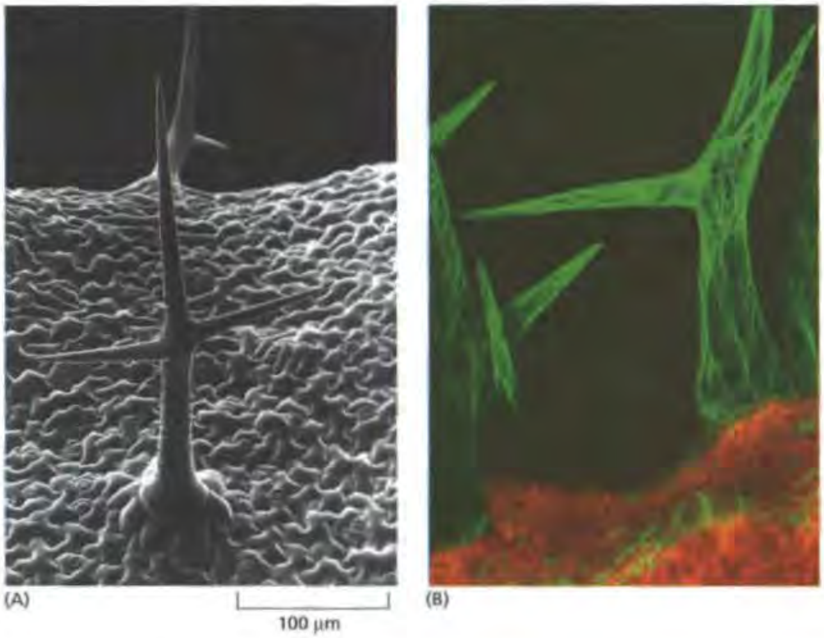


Figura 9-26 Marcaje de proteínas con GFP. (A) La superficie superior de las hojas de la planta *Arabidopsis* están cubiertas de unos enormes pelos unicelulares que sobresalen de la epidermis. Estos pelos o tricomas, se pueden ver con el microscopio electrónico de barrido. (B) Si una planta de *Arabidopsis* es transformada con una secuencia de DNA que codifica la talina (una proteína de unión a la actina), fusionada con una secuencia de DNA que codifica la GFP, la talina fluorescente que se genera se une a los filamentos de actina de todas las células vivas de la planta transgénica. La microscopía confocal puede revelar la dinámica de todo el citoesqueleto de actina del tricoma (de color *verde*). La fluorescencia roja procede de la clorofila de las células de la epidermis de la cara inferior de las hojas. (A, por cortesía de Paul Linstead; B, por cortesía de Jaideep Mathur.)

te de un láser sobre una fina región de la célula, de forma que el experimentador controla exactamente dónde y cuándo se fotoactiva la molécula fluorescente.

Se consigue una clase de proteínas fluorescentes enjauladas uniendo una marca fluorescente fotoactivable a una proteína purificada. Es importante que la proteína modificada siga siendo activa biológicamente: el marcaje con un colorante fluorescente enjaulado añade un enorme grupo sobre la superficie de una proteína, lo cual es fácil que cambie las propiedades de la proteína. Por lo general, mediante el método de ensayo y error se puede conseguir un protocolo satisfactorio de marcaje. Cuando se ha producido una proteína marcada biológicamente activa, hay que introducirla en la célula viva (véase Figura 9-34) en la que se va a seguir su comportamiento. Por ejemplo, la tubulina marcada con fluoresceína enjaulada, cuando se inyecta en una célula en división se puede incorporar a los microtúbulos del huso mitótico. Cuando se ilumina una pequeña región del huso con una luz láser, la tubulina marcada se vuelve fluorescente, de forma que se puede seguir con facilidad su desplazamiento a lo largo de los microtúbulos del huso (**Figura 9-29**).

Un desarrollo más reciente de la fotoactivación es el descubrimiento de que los genes que codifican GFP y otras proteínas relacionadas se pueden mutar para producir proteínas variantes, habitualmente con un cambio de un solo aminoácido, que bajo una excitación normal emiten muy poca fluorescencia pero que si se iluminan con un fuerte pulso de luz de una determinada longitud de onda emiten una gran fluorescencia. En principio, el microscopista puede así seguir el comportamiento *in vivo* de cualquier proteína que pueda ser expresada como fusión con una de estas variantes de GFP. Por tanto, estas proteínas fluorescentes fotoactivables, codificadas genéticamente, evitan la necesidad de introducir la sonda en la célula y permite estudiar la vida media y el comportamiento de cualquier proteína con independencia de otra proteína acabada de sintetizar (**Figura 9-30**).

Un tercer sistema que permite aprovechar la fusión de GFP a una proteína de interés consiste en utilizar un potente haz de luz láser para eliminar la fluorescencia de GFP de una determinada región de la célula. Analizando cómo se desplazan en función del tiempo las moléculas proteicas fluorescentes que quedan en el área blanqueada, podemos obtener in-

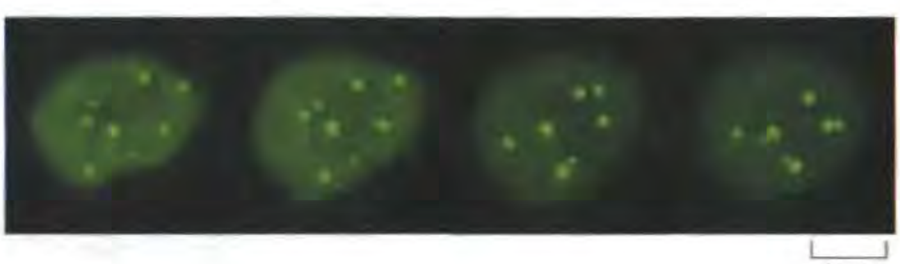


Figura 9-27 Dinámica del marcaje con GFP. Esta secuencia de micrografías muestra un conjunto de imágenes tridimensionales de un núcleo de una célula viva, tomadas en el transcurso de una hora. Las células del tabaco han sido transformadas de forma estable con la proteína GFP fusionada con una proteína del espliceosoma que se concentra en los pequeños cuerpos nucleares denominados cuerpos accesorios de Cajal (véase Figura 6-48). Los cuerpos accesorios de Cajal fluorescentes, visibles en una célula viva con un microscopio confocal, son estructuras dinámicas que se desplazan alrededor de la parte interior del núcleo. (Por cortesía de Kurt Boudonck, Liam Dolan y Peter Shaw.)

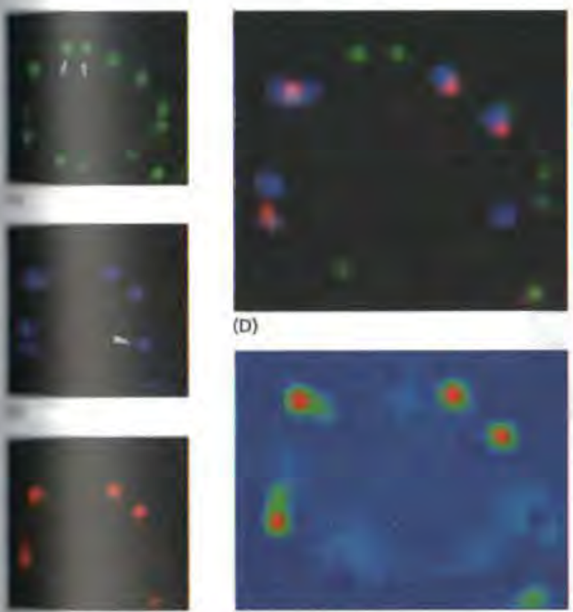


Figura 9–28 Imagen por transferencia de energía fluorescente por resonancia (FRET). Este experimento muestra que la proteína Sla1p puede interaccionar fuertemente con otra proteína llamada Abp1p, relacionada con la unión de la actina cortical a la superficie de una célula de levadura en desarrollo. Sla1p se expresa en células de levadura (A) como una proteína de fusión, variante amarilla, de la proteína fluorescente verde (YFP: ***yellow fluorescent protein***), mientras que Abp1p lo hace como una proteína de fusión (B) en una variante azulada (cian) de la GFP (CFP: ***cyan fluorescent protein***). La señal FRET (véase también la Figura 8–26), mostrada aquí en *rojo* (C), se ha obtenido por excitación de CFP pero grabando sólo la fluorescencia emitida por la YFP, lo que tendrá lugar cuando las dos moléculas estén íntimamente asociadas (a 0,5 nm). Las tres manchas en el córtex (D), que se pueden ver superponiendo (A), (B) y (C), cuando Sla1p se encuentra sola (*flechas* en A), cuando Abp1p se encuentra sola (flechas en B), y cuando están asociadas con fuerza y generan la señal FRET, mostradas en una imagen corregida y falsamente coloreada (E). Desde que se sabe que Sla1p forma parte de la maquinaria de endocitosis, este experimento asocia físicamente estos procesos con el proceso de unión de actina a las células del córtex. (De D.T. Warren et al., *J. Cell Sci.* 115:1703-1715, 2002. Con la autorización de The Company of Biologists.)

información sobre parámetros cinéticos de la proteína. Esta técnica, que se realiza con un microscopio confocal, se conoce como **recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueado** (**FRAP**: *fluorescente recovery **after** photobleaching*) y, como la fotoactivación, puede proporcionar una información cuantitativa muy valiosa sobre una proteína de interés, como los coeficientes de difusión <ATGT>, velocidades de transporte activo o tasas de unión y disociación a otras proteínas (**Figura 9–31**).

Indicadores que emiten luz pueden medir concentraciones intracelulares de iones que cambian con rapidez

Una vía para estudiar los procesos químicos de una sola célula viva consiste en insertar la fina punta de un **microelectrodo** de cristal, sensible a iones, directamente en el interior de la célula y a través de la membrana plasmática. Esta técnica se utiliza para medir las concentraciones intracelulares de iones inorgánicos muy comunes, tales como H^+, Na^+, K^+, Cl^- y Ca^{2+}. Sin embargo, los microelectrodos sensibles a iones sólo revelan la concentración iónica de un punto de la célula. Además, su respuesta es lenta y en ocasiones irregular para iones que se hallan presentes a concentraciones muy bajas, como es el caso del Ca^{2+}. Por ello, estos electrodos no son adecuados para medir los cambios intracelulares rápidos y transitorios de la concentración de Ca^{2+}, que tan importantes son para permitir a las células responder a señales extracelulares. Estos cambios pueden ser analizados mediante la utilización de **indicadores sensibles a iones**, cuya emisión de luz refleja la concentración local del ion. Algunos de estos indicadores son luminiscentes (emiten luz de forma espontánea) mientras que otros son fluorescentes (emiten luz cuando son expuestos a la luz).

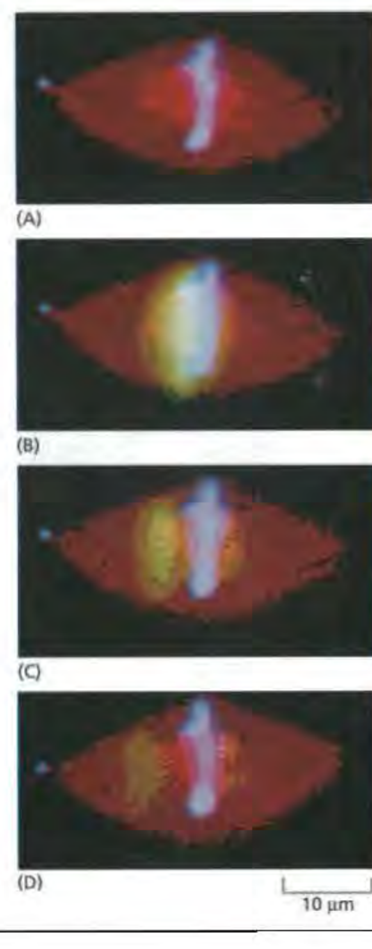


Figura 9–29 Determinación del flujo de microtúbulos del huso mitótico utilizando fluoresceína enjaulada unida a tubulina. (A) Un huso en metafase formado *in vitro* a partir de un extracto de huevos de *Xenopus* ha incorporado tres marcadores fluorescentes: tubulina unida a rodamina (*rojo*) para marcar todos los microtúbulos, un colorante *azul* unido al DNA que marca los cromosomas, y fluoresceína enjaulada unida a tubulina, que también se incorpora a todos los microtúbulos pero que resulta invisible –debido a que no es fluorescente– hasta que no se active con luz ultravioleta. En (B) se utiliza un haz de luz ultravioleta para liberar de forma local la fluoresceína enjaulada unida a tubulina principalmente en el lado izquierdo de la placa metafásica. Durante los minutos siguientes (después de un minuto y medio en C y de dos minutos y medio en D), la señal de tubulina unida a fluoresceína liberada se desplaza hacia el polo izquierdo del huso, lo cual indica que la tubulina se desplaza continuamente hacia los polos a pesar de que el huso (visualizado a través de la fluorescencia de la tubulina marcada con rodamina *roja*) permanece casi inalterado. (De K.E. Sawin y T.J. Mitchison, *J. Cell Biol.* 112:941-954, 1991. Con la autorización de The Rockefeller University Press.)

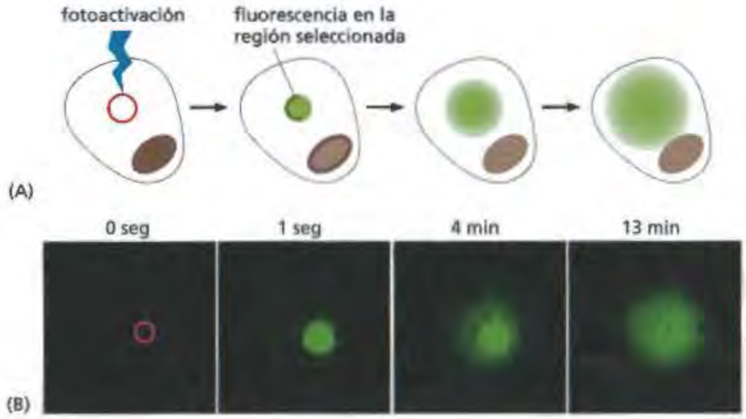


Figura 9–30 Fotoactivación. La fotoactivación es la activación inducida por la luz, que incide sobre una molécula inerte, hacia un estado activo. En este experimento, se expresa una variante fotoactivable de la GFP en una célula animal en cultivo. Antes de la activación (tiempo 0), en la región seleccionada (*círculo rojo*) se detecta poca o no se detecta GFP fluorescente cuando es excitada con luz azul de 488 nm. Sin embargo, después de la activación, aplicando un pulso de luz láser UV de 413 nm, aparece una fluorescencia brillante en la región seleccionada (*verde*). Se puede medir el desplazamiento de la GFP difundiendo fuera de esta región. Dado que únicamente pueden ser fluorescentes las proteínas fotoactivadas dentro de la célula, se han podido seguir las vías de tráfico, recambio y degradación de las proteínas. (B, de J. Lippincott-Schwartz y G.H. Patterson, *Science* 300:87-91, 2003. Con la autorización de AAAS.)

La *aecuorina* es una proteína luminiscente, aislada a partir de medusas marinas, que emite luz en presencia de Ca^{2+} y responde a los cambios de concentración de Ca^{2+} en el rango de 0,5 a 10 µM. Si se microinyecta por ejemplo en un óvulo, la aecuorina emite un destello de luz en respuesta a la súbita y localizada liberación de Ca^{2+} que se produce en el interior del citoplasma cuando el óvulo es fecundado (**Figura 9–32**). La aecuorina también ha sido expresada de forma transgénica en plantas y en otros organismos con lo que se ha conseguido un método de seguir la concentración de Ca^{2+} en todas las células de estos organismos, sin necesidad de utilizar la microinyección, que sería un proceso difícil.

Las moléculas bioluminiscentes como la aecuorina emiten cantidades de luz muy pequeñas –como mucho unos cuantos fotones por cada molécula indicadora– que resulta difícil de medir. Los indicadores fluorescentes emiten muchos más fotones por molécula y, por tanto, son más fáciles de medir y dan mejor resolución espacial. Se han sintetizado indicadores fluorescentes de Ca^{2+} que se unen con fuerza al Ca^{2+} y que cuando están libres son excitados a longitudes de onda ligeramente más largas que cuando están unidos a él. Midiendo la proporción de intensidad fluorescente a las dos longitudes de onda de excitación, puede determinarse la proporción de concentraciones entre el indicador unido a Ca^{2+} y el indicador libre. Esta relación proporciona una medida precisa de la concentración de Ca^{2+} libre. <CGTC> Indicadores de este tipo se utilizan para el seguimiento, segundo a segundo, de las variaciones de la concentración intracelular de Ca^{2+} en diferentes zonas de la célula, visualizándolas mediante un microscopio de fluorescencia (**Figura 9–33**). <AGGA>

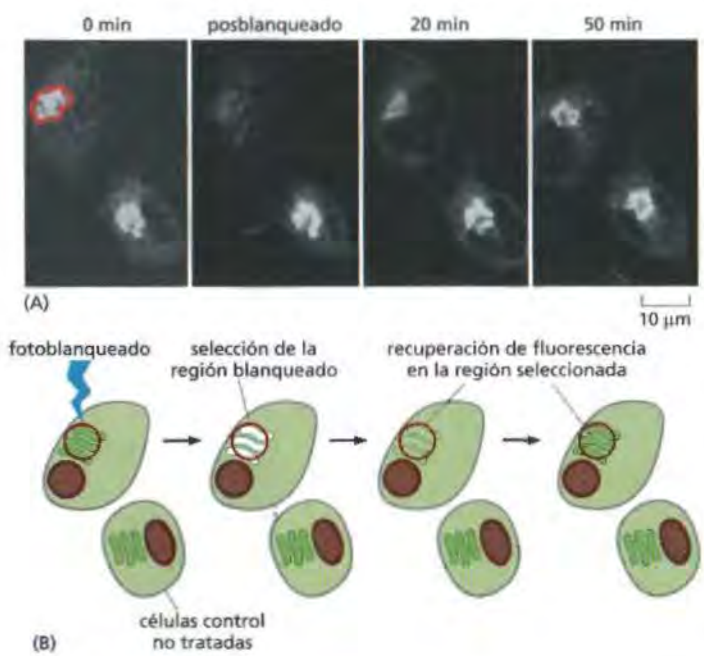


Figura 9–31 Recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueado (FRAP). Un fuerte pulso de luz láser puede extinguir, o blanquear, la fluorescencia de la GFP. Mediante el blanqueado selectivo de una serie de moléculas de proteína marcadas en una región, el microscopista puede seguir a lo largo del tiempo la recuperación, a medida que las moléculas que siguen siendo fluorescentes entran en la región decolorada. En el experimento mostrado en (A), se utilizan células de mono en cultivo que expresan galactosiltransferasa, una enzima que se recicla de forma constante entre el complejo de Golgi y el retículo endoplasmático. El complejo de Golgi se ha blanqueado selectivamente en una de las dos células, mientras que la producción de nueva proteína fluorescente es bloqueada mediante tratamiento de las células con cicloeximida. La recuperación, tras un periodo de seguimiento, indica que las moléculas de proteína se desplazan desde el ER hacia el complejo de Golgi. (B) El esquema del experimento se muestra en (A). (A, de J. Lippincott-Schwartz et al., *Histochem. Cell Biol.* 116:97-107, 2001. Con la autorización de Springer-Verlag.)

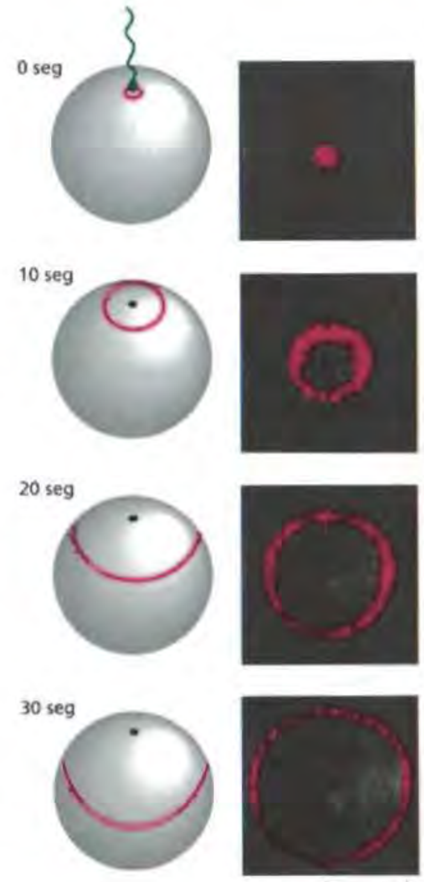


Figura 9–32 Aecuorina, una proteína luminiscente. La proteína luminiscente aecuorina emite luz en presencia de calcio libre. En esta figura se ha inyectado aecuorina a un huevo de pez medaka, la cual ha difundido por el citosol. A continuación, el óvulo se ha fecundado con un espermatozoide y se ha examinado con la ayuda de una cámara muy sensible. Las cuatro fotografías que se presentan fueron tomadas a intervalos de 10 segundos mirando hacia abajo el punto donde entró el espermatozoide. Las imágenes revelan una onda de liberación de calcio libre en el citosol a partir de reservorios intracelulares justo por debajo del lugar donde entró el espermatozoide, tal como se indica en el diagrama de la *izquierda*. (Fotografías reproducidas de J.C. Gilkey, L.F. Jaffe, E.B. Ridgway y G.T. Reynolds. *J. Cell Biol.* 76:448-466, 1978. Con la autorización de The Rockefeller University Press.)

Existen indicadores fluorescentes semejantes a éstos que son útiles para medir otros iones; por ejemplo, algunos de ellos se utilizan para medir H^+ y, por lo tanto, el pH intracelular. Algunos de estos indicadores pueden entrar en las células por difusión, por lo que no es necesario microinyectarlos, lo que permite controlar al microscopio de fluorescencia un gran número de células simultáneamente. Los nuevos tipos de indicadores y su utilización conjunta con los modernos métodos de análisis de imagen posibilitan el desarrollo de métodos rápidos y precisos similares a éstos que permiten analizar las variaciones de las concentraciones intracelulares de muchas otras pequeñas moléculas.

Existen diferentes sistemas que permiten introducir en una célula moléculas para las que la membrana celular sea impermeable

A menudo resulta útil poder introducir en la célula moléculas que no pueden atravesar la membrana, como anticuerpos que reconocen determinadas proteínas intracelulares, proteínas celulares normales que han sido marcadas con un compuesto fluorescente o moléculas que afectan la conducta de la célula. Una aproximación consiste en microinyectar estos compuestos a la célula mediante una micropipeta de vidrio.

Cuando se microinyectan en una célula, los anticuerpos pueden bloquear la función de la molécula que reconocen. Por ejemplo, la inyección de anticuerpos antimiosina-II en un óvulo fecundado de erizo de mar impide que el óvulo se divida en dos, a pesar de que la división nuclear se produce normalmente. Esta observación demuestra que la miosina desempeña un papel crucial en el proceso contráctil que divide el citoplasma durante la división celular, pero que no es necesaria para la división nuclear.

A pesar de que la microinyección es una técnica muy utilizada, supone la inyección de cada célula, una por una; por esta razón solamente resulta posible estudiar a la vez como mucho varios cientos de células. Otras aproximaciones permiten permeabilizar de forma simultánea grandes poblaciones de células. Por ejemplo, utilizando potentes choques eléctricos o agentes químicos como bajas concentraciones de detergentes, se rompe parcialmente la estructura de la membrana plasmática de la célula para permeabilizarla. La técnica eléctrica tiene la ventaja de generar grandes poros en la membrana plasmática sin dañar las membranas intracelulares. Dependiendo del tipo celular utilizado y del tipo de choque eléctrico que se aplique, los poros se mantienen abiertos durante intervalos de tiempo que pueden oscilar desde minutos hasta horas, y permiten incluso que las macromoléculas entren (y salgan) del citosol rápidamente. Este proceso de *electroporación* también es útil en genética molecular, ya que permite introducir moléculas de DNA en el interior de la célula. Si el tratamiento ha sido suave, un elevado porcentaje de las células tratadas consigue reparar sus membranas plasmáticas y sobrevive.



Figura 9–33 Visualización de la concentración de Ca^{2+} intracelular utilizando un indicador fluorescente. El ramificado árbol de dendritas de una célula de Purkinje del cerebelo recibe más de 100.000 sinapsis de otras neuronas. La señal de salida de la célula se transporta por un solo axón, que se ve saliendo del soma celular en la parte inferior de la figura. Esta imagen de la concentración intracelular de calcio de una célula de Purkinje (del cerebelo de un cobaya) se obtuvo utilizando una cámara de gran sensibilidad y el indicador fluorescente sensible al Ca^{2+}, fura-2. La concentración de Ca^{2+} libre está representada por diferentes colores, siendo la mayor concentración el color *rojo* y la menor *azul*. Las mayores concentraciones de Ca^{2+} se presentan en los centenares de ramas dendríticas. (Por cortesía de D.W. Tank, J.A. Connor, M. Sugimori y R.R. Llinas.)

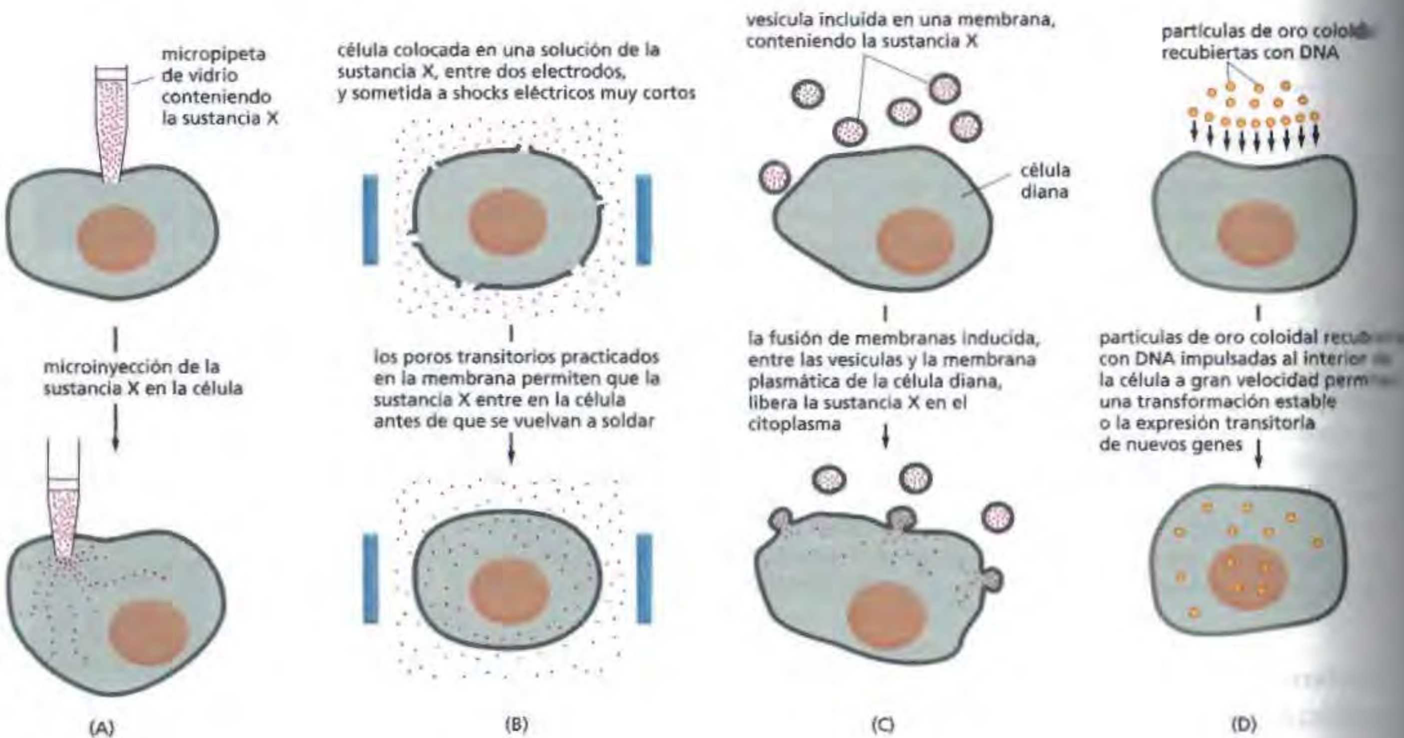


Figura 9–34 Métodos utilizados para introducir en una célula una sustancia para la cual la membrana es impermeable. En (A) la sustancia es inyectada mediante una micropipeta, aplicando una presión o, si la sustancia está cargada eléctricamente, aplicando un voltaje que obligue a la sustancia a pasar al interior de la célula como una corriente iónica (técnica denominada *iontoforesis*). En (B) la membrana celular se hace transitoriamente permeable a la sustancia que queremos introducir, rompiendo la estructura de la membrana mediante un breve pero intenso shock eléctrico (p. ej. de 2000 voltios por centímetro durante 200 μseg). En (C) se utiliza un sistema de fusión de membranas. Se pueden cargar vesículas rodeadas de membrana con una sustancia deseada y luego inducirlas a fusionarse con la célula diana. En (D) se utilizan partículas de oro coloidal recubiertas con DNA para introducir un nuevo gen en el núcleo.

Un tercer método para introducir grandes moléculas en las células consiste en provocar la fusión con la membrana plasmática de vesículas membranosas que contengan en su interior estas moléculas. Este método se utiliza habitualmente para aportar ácidos nucleicos a células de mamífero: DNA para estudios de transfección o RNA para experimentos de RNAi (se describe en el Capítulo 8). En el campo de la medicina también se ha utilizado como método para la administración guiada de nuevos compuestos farmacéuticos.

Por último, las moléculas de DNA y de RNA también pueden ser introducidas físicamente en determinadas células disparándolas a una elevada velocidad, acopladas a partículas de oro coloidal. Las células vivas a las que hemos disparado estas partículas de oro coloidal acopladas a ácidos nucleicos (por lo general de menos de 1 μm de diámetro) pueden incorporar con éxito el RNA (p. ej. utilizándolo para estudios de expresión transitoria o de RNAi) o el DNA (para transfección estable) introducidos. Estos cuatro métodos se utilizan ampliamente en biología celular y se ilustran en la **Figura 9–34**.

La luz se puede utilizar tanto para ver objetos microscópicos como para manipularlos

Los fotones tienen un pequeño momento cinético. Esto significa que un objeto que absorbe o refracta un haz de luz experimenta una pequeña fuerza. Con fuentes de luz normal esta presión de radiación es demasiado pequeña como para ser significativa. Sin embargo, a escala cósmica esta fuerza sí que es importante (ayuda a evitar el colapso gravitacional de las estrellas). Aunque más modestamente, también lo es en el laboratorio de biología celular, ya que un potente láser puede ejercer fuerzas suficientes para empujar pequeños objetos dentro de una célula. Si el rayo láser se dirige sobre un objeto que tenga un índice de refracción más alto que los objetos que le rodean, el rayo será refractado haciendo que un gran número de fotones cambien de dirección. El patrón de deflexión de los fotones mantiene el objeto en el foco del rayo; si comienza a desplazarse de esta posición, la presión de radiación del láser, al actuar con más fuerza en un lado que en el otro del objeto, lo empujaría de nuevo al foco. Así, mediante un láser, normalmente un infrarrojo, que sea absorbido de forma mínima por los constituyentes celulares, es posible crear una **pinza óptica** que permite desplazar objetos subcelulares, como orgánulos y cromosomas. Este método, al que a veces se le denomina pinza de láser <CGCG><CACA> se ha utilizado para medir la fuerza que ejerce una molécula de actina-miosina, un microtúbulo y la RNA polimerasa (**Figura 9–35**).

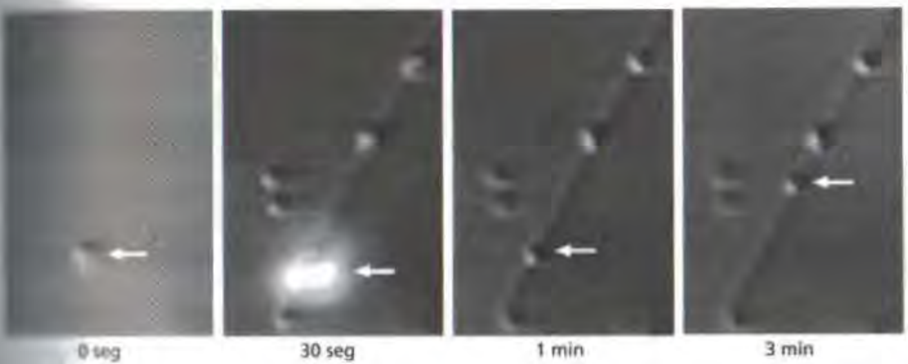


Figura 9–35 Pinzas ópticas. Se puede utilizar un haz de luz láser enfocado para atrapar partículas microscópicas y moverlas a voluntad. <CGCG> En este experimento, se utilizaron una pinzas ópticas para ordenar pequeñas bolas de sílice (0,2 nm, *flecha*), recubiertas con algunas moléculas de quinesina (0 seg), y situarlas en un axonema ciliar aislado formado por microtúbulos (30 seg). El halo brillante es la reflexión del láser en la interfase de agua y el cubreobjetos. La quinesina situada sobre la bola liberada (1 min) acopla la hidrólisis de ATP al desplazamiento a lo largo del microtúbulo del axonema y potencia del desplazamiento de la bola (3 min). (De S.M. Block et al., *Nature* 348:348-352, 1990. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

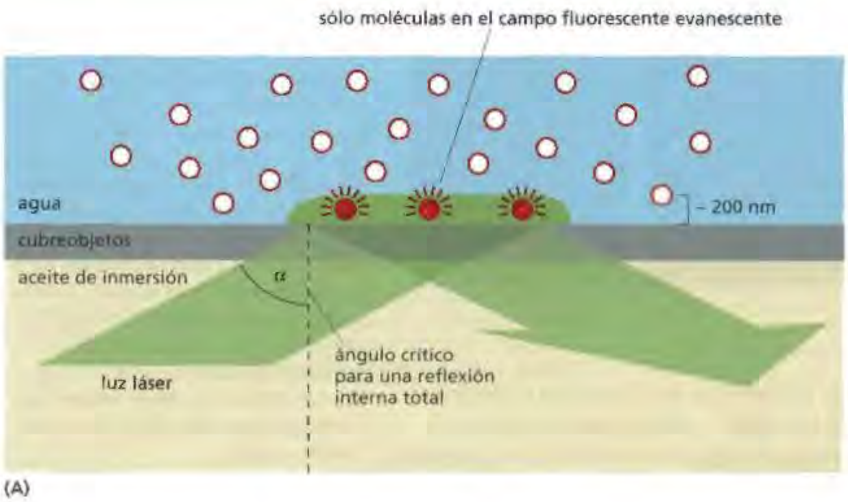
Un láser más potente que sea absorbido más fuertemente por el material biológico se puede utilizar como "cuchilla óptica" –para matar una célula, cortarla o hacer agujeros quemándola, o para separar un componente intracelular de otro. En este sentido, los recursos ópticos proporcionan una herramienta básica para la microcirugía celular.

Se pueden visualizar moléculas individuales utilizando microscopía fluorescente de reflexión interna total

Se pueden utilizar pequeñas bolitas como marcadores para seguir las huellas de los desplazamientos de las proteínas, pero es claramente preferible ser capaces de visualizar las propias proteínas. En principio, esto se puede conseguir marcando la proteína con una molécula fluorescente mediante la unión química de una pequeña molécula fluorescente a moléculas aisladas de la proteína de interés o expresando construcciones de fusión de proteínas fluorescentes (véase p. 593). Sin embargo, en los microscopios normales, las moléculas fluorescentes individuales no pueden ser detectadas. La limitación no tiene que ver con el límite de resolución, sino que procede de la interferencia de la luz emitida por las moléculas fuera de foco que anula la fluorescencia que procede de la molécula particular de interés. Este problema se puede resolver con la utilización de una técnica óptica especializada denominada microscopía fluorescente de reflexión interna total (TIRF: ***t****otal* ***i****nternal* ***r****eflectance* ***f****luorescence*). En un microscopio TIRF, una luz láser ilumina la superficie del cubreobjetos con el ángulo crítico al que se produce la reflexión interna total (**Figura 9–36**A). Debido a esta reflexión interna total, la luz no entra en la muestra y, por tanto, la mayoría de las moléculas fluorescentes no son iluminadas. Sin embargo, la energía electromagnética se extiende, como un campo evanescente, a una distancia muy corta más allá de la superficie del cubreobjetos y hacia adentro de la muestra, permitiendo que se exciten únicamente estas moléculas cercanas al haz y a la superficie. Cuando estas moléculas emiten fluorescencia, la luz que desprenden no compite con la luz de las moléculas cercanas situadas fuera de foco, por lo que puede ser detectada. La microscopía TIRF ha permitido realizar experimentos extraordinarios, como imaginar una proteína motor desplazándose a lo largo de un microtúbulo o detectar un filamento de actina polimerizando y despolimerizando. Sin embargo, por ahora la técnica está restringida a una fina capa de sólo 100-200 nm de la superficie celular (Figura 9–36 B y C).

Las moléculas individuales se pueden tocar y desplazar utilizando la microscopía de fuerza atómica

La microscopía de TIRF permite visualizar las moléculas de forma individual, pero es un método de observación pasivo. Para estudiar las funciones de las moléculas resultaría muy útil ser capaz de manipular las moléculas una a una, y esto es precisamente lo que se puede conseguir con la microscopía de fuerza atómica (AFM: ***a****tomic* ***f****orce* ***m****icroscopy*). En un dispositivo AFM se fabrica una punta muy pequeña y fina, de silicona o nitruro de silicona, utilizando métodos de nanofabricación similares a los que se utilizan en la industria de los semiconductores. Esta punta del AFM, se une a un brazo voladizo flexible montado sobre un sistema de posicionamiento extremadamente preciso que permite que se desplace a distancias muy pequeñas. Además de esta capacidad de movimiento tan precisa, el AFM es ca-



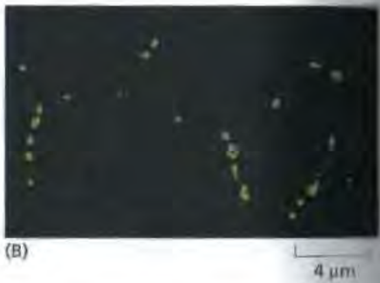




Figura 9–36 La microscopía TIRF permite la detección de una molécula fluorescente (A) La microscopía TIRF utiliza la luz láser excitadora para iluminar la superficie del cubreobjetos en un ángulo crítico, en el que toda la luz es reflejada por la interfase cristal-agua. Parte de la energía electromagnética se extiende, a pequeña distancia, a través de la interfase como una onda evanescente que sólo excita aquellas moléculas que están muy cerca de la superficie. (B) En esta imagen se ha utilizado la microscopía TIRF para representar moléculas de miosina-GFP (*puntos verdes*) unidas a filamentos de actina no fluorescentes (C), que no son visibles pero que están unidos a la superficie del cubreobjetos. (Cortesía de Dmitry Cherny y Clive R. Bagshaw.)

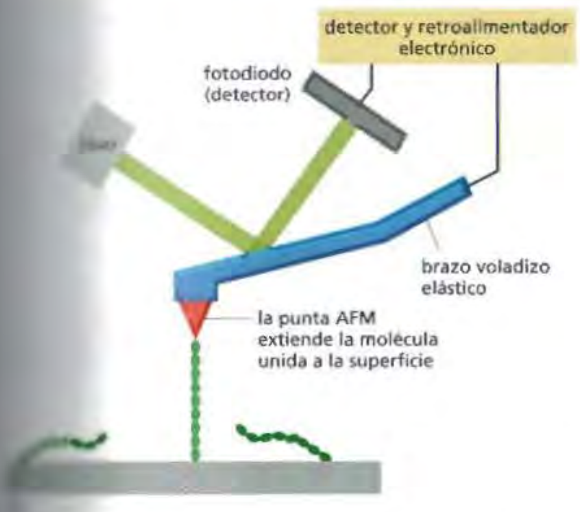
paz de medir la fuerza mecánica realizada por su punta cuando se desplaza sobre la superficie (**Figura 9–37**A). Cuando se desarrolló el AFP se pretendía obtener una tecnología de imagen que permitiera medir características a escala molecular sobre una superficie. Cuando se utiliza de esta forma, la sonda se escanea sobre la superficie desplazándola arriba y abajo lo que sea necesario para mantener una fuerza de interacción constante con la superficie, revelando así la presencia de cualquier objeto, como una proteína, que pueda estar presente en la superficie plana (véase Figuras 10-14 y 10–32). Sin embargo, la AFM no se limita a obtener imágenes de superficies, sino que también se puede utilizar para tomar y desplazar moléculas individuales, a una escala molecular semejante a las pinzas ópticas descritas. Utilizando esta tecnología, se pueden medir con detalle las propiedades mecánicas de las moléculas individuales de proteína. Por ejemplo, la AFM se ha utilizado para desplegar una sola molécula de proteína para medir la energía implicada en el plegado de un dominio (Figura 9–37B). En la actualidad, se está empezando explorar todo el potencial que tiene la AFM para sondear mecánicamente las proteínas, así como para ensamblar proteínas individuales formando complejos definidos, pero parece probable que esta herramienta irá ganando importancia en el futuro.

Las moléculas se pueden marcar con radioisótopos

En biología celular a menudo resulta importante cuantificar una molécula determinada y saber dónde se encuentra en la célula y cómo cambian sus niveles o su localización en respuesta a señales extracelulares. Las moléculas de interés van desde pequeños iones inorgánicos como Ca^{2+} o H^+, hasta grandes macromoléculas, como determinadas proteínas o secuencias de DNA o de RNA. Hasta ahora hemos descrito cómo se pueden utilizar los métodos sensibles a la fluorescencia para estudiar este tipo de moléculas y para seguir su comportamiento dinámico en muchas de las células vivas. Para terminar esta sección vamos a describir cómo se utilizan los radioisótopos para marcar el camino que siguen moléculas concretas a través de la célula.

La mayoría de los elementos que se presentan en la naturaleza son una mezcla de isótopos ligeramente diferentes. Estos isótopos se diferencian entre sí por la masa de sus núcleos atómicos, pero dado que tienen el mismo número de protones y de electrones, tienen las mismas propiedades químicas. Los núcleos de los isótopos radiactivos, o radioisótopos, son inestables y sufren desintegraciones de forma aleatoria en el tiempo, dando lugar a átomos diferentes. En el curso de estas desintegraciones se emiten partículas energéticas subatómicas como electrones, o radiaciones como los rayos gamma. Utilizando sistemas de síntesis química para incorporar uno o más átomos radiactivos a pequeñas moléculas de interés, como un azúcar o un aminoácido, se puede seguir el destino de esta molécula durante cualquier reacción biológica.

Los radioisótopos naturales son poco frecuentes (a causa de su inestabilidad), pero se pueden producir en grandes cantidades en reactores nucleares, bombardeando diferentes



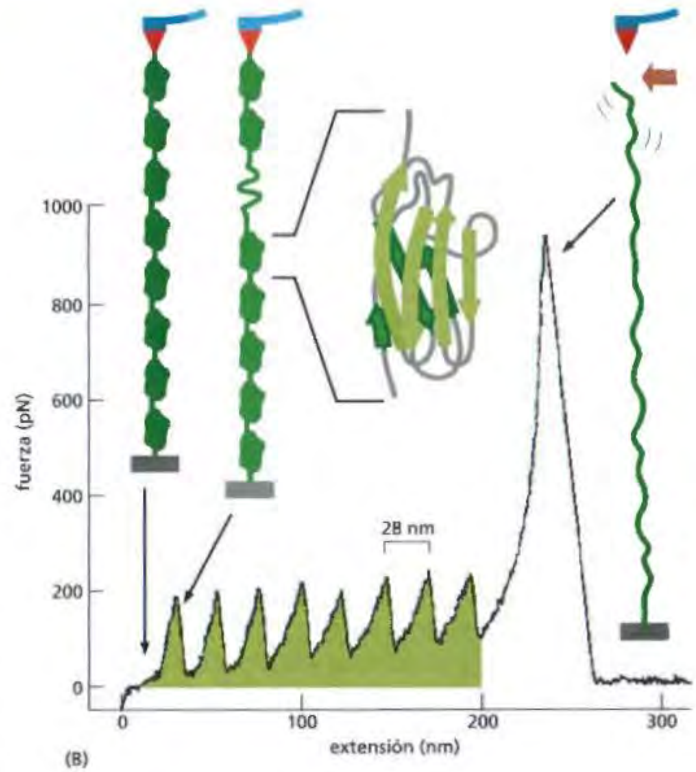


Figura 9-37 Se pueden manipular moléculas individuales de proteína mediante microscopía de fuerzas atómicas. (A) Esquema de los componentes fundamentales de un microscopio de fuerzas atómicas (AFM: *atomic force microscope*) que muestra la punta sensora unida al extremo de una molécula de proteína en el experimento descrito en (B). (B) La titina es una molécula de proteína que proporciona al músculo su elasticidad (véase la Figura 16–76). La capacidad de extensión de esta proteína se puede examinar utilizando una proteína generada de forma artificial que contiene ocho repeticiones de dominio Ig de una región de la proteína. En este experimento, la punta del AFM se usa para levantar y estirar progresivamente una molécula hasta que se rompe. Cuando se aplica la fuerza, el dominio Ig comienza a desplegarse bruscamente pudiendo medirse en cada caso (alrededor de 200 pN). La región de la curva fuerza-extensión muestra en *verde* los desplegamientos ocurridos en cada uno de los ocho dominios. (Adaptado de Linke et al., *J. Struct. Biol.* 137:194-205, 2002. Con la autorización de Elsevier.)

con partículas de alta energía. Como resultado este avance, hoy disponemos de las formas marcadas radioisotópicamente de muchos compuestos importantes desde el punto de vista biológico (**Tabla 9–1**). La radiación que emiten se puede detectar de diferentes maneras. Los electrones (partículas β) pueden ser detectados en un contador Geiger por la ionización que producen en un gas o se pueden cuantificar con un contador de centelleo gracias a las pequeñas chispas de luz que generan en un líquido de centelleo. Estos métodos hacen posible medir cuidadosamente la cantidad de un radioisótopo determinado que existe en una muestra biológica. También es posible determinar la localización de un radioisótopo en una muestra utilizando una autorradiografía, como describiremos más adelante. Todos estos métodos de detección son muy sensibles: en condiciones favorables pueden detectar casi todas las desintegraciones que se producen y, por lo tanto, casi todos los átomos radiactivos que se desintegran.

Los radioisótopos se utilizan para seguir la pista de moléculas tanto en las células como en los organismos

Una de las primeras aplicaciones de la radiactividad en la biología consistió en seguir la ruta química del carbono durante la fotosíntesis. Se mantuvieron algas verdes unicelulares en una atmósfera que contenía CO_2 marcado radiactivamente ($^{14}CO_2$) y, tras periodos variables de tiempo después de haber sido expuestos a la luz solar, se separaron sus contenidos solubles mediante cromatografía sobre papel. Colocando una hoja de película fotográfica sobre el cromatograma seco se detectaron las pequeñas moléculas que contenían ^{14}C derivado del CO_2. De esta manera, se identificaron los principales componentes de la vía fotosintética, desde el CO_2 hasta el azúcar.

Tabla 9–1 Algunos radioisótopos de uso habitual en investigación

ISÓTOPO	VIDA MEDIA
^{32}P	14 días
^{131}I	8,1 días
^{35}S	87 días
^{14}C	5570 años
^{45}Ca	164 días
^{3}H	12,3 años

Los isótopos están ordenados en orden decreciente de energía de radiación β (electrones) que emiten. El ^{131}I también emite radiación γ. La vida media es el tiempo requerido para que se desintegre el 50% de los átomos de un isótopo.

Las moléculas radiactivas se utilizan para seguir el curso de casi todos los procesos celulares. Un experimento típico puede consistir en añadir a las células un precursor en su forma radiactiva. Las moléculas radiactivas se mezclarán con las moléculas preexistentes no marcadas; ambos tipos de moléculas serán tratados de forma idéntica por la célula, ya que sólo se diferencian en el peso de su núcleo atómico. Se podrán seguir los cambios de la localización o de la forma química de las moléculas radiactivas en función del tiempo. A menudo, se puede aumentar la resolución de estos experimentos utilizando un protocolo de marcaje denominado de **pulso y caza**, en el que el material radiactivo (el pulso) se añade durante un periodo de tiempo muy corto y después es eliminado mediante lavado y sustituido por moléculas no radiactivas. A intervalos regulares de tiempo, se toman muestras y en cada una de ellas se identifica la forma química o se localiza la radiactividad (la caza) (**Figura 9–38**). Los experimentos de pulso y caza combinados con la autorradiografía (véase más adelante) han sido importantes por ejemplo para dilucidar el camino seguido por las proteínas de secreción desde el retículo endoplasmático hasta el exterior celular.

El marcaje radioisotópico es un sistema inigualable para diferenciar moléculas que son químicamente idénticas pero que tienen historias diferentes –moléculas que se diferencian en su momento de síntesis. De esta manera, por ejemplo, se demostró que casi todas las moléculas de una célula viva son degradadas de forma continua y reemplazadas por otras, incluso cuando la célula no está creciendo y parece que se encuentra en estado estacionario. Estos procesos de "recambio" que algunas veces tiene lugar muy lentamente, serían imposibles de detectar sin el uso de radioisótopos.

En la actualidad, casi todas las pequeñas moléculas comunes están disponibles comercialmente en forma radiactiva y casi cualquier molécula biológica, por muy complicada que sea, puede marcarse con radiactividad. Los compuestos se pueden marcar con radiactividad incorporando átomos radiactivos en posiciones determinadas de su estructura, lo cual permite seguir los diferentes destinos de distintas zonas de una misma molécula durante las reacciones biológicas (**Figura 9–39**).

Como hemos mencionado anteriormente, una de las aplicaciones importantes de la radiactividad a la biología celular consiste en la localización por autorradiografía de compuestos radiactivos en secciones de células enteras o de tejidos. En este procedimiento, las células vivas son expuestas brevemente a un pulso de un compuesto radiactivo determinado y se incuban durante un periodo variable de tiempo –para permitir que el compuesto se incorpore– antes de fijarlas y tratarlas para microscopía óptica o electrónica. Posteriormente, cada preparación es recubierta con una fina película de una emulsión fotográfica y se coloca en la oscuridad durante varios días, durante los cuales parte del radioisótopo se desintegra. Entonces la emulsión se revela y se determina la posición de la radiactividad en cada célula mediante la posición de los granos oscuros de plata generados (véase Figura 5–29). Así por ejemplo, la incubación de células con un precursor radiactivo del DNA (timidina ^{3}H), muestra que el DNA se sintetiza en el núcleo y que permanece allí (**Figura 9–40**). En cambio el marcaje de la células con un precursor radiactivo de RNA (uridina ^{3}H) revela que el RNA se sintetiza inicialmente en el núcleo de la célula (véase Figura 4–62), pero que luego se desplaza con rapidez hacia el citoplasma. Las moléculas marcadas con radiactividad también pueden ser detectadas por autorradiografía después de haber sido separadas de otras moléculas mediante electroforesis en gel; de esta manera se detecta la posición tanto de las proteínas (véase Figura 8–23) como de los ácidos nucleicos (véase Figura 8–33A).

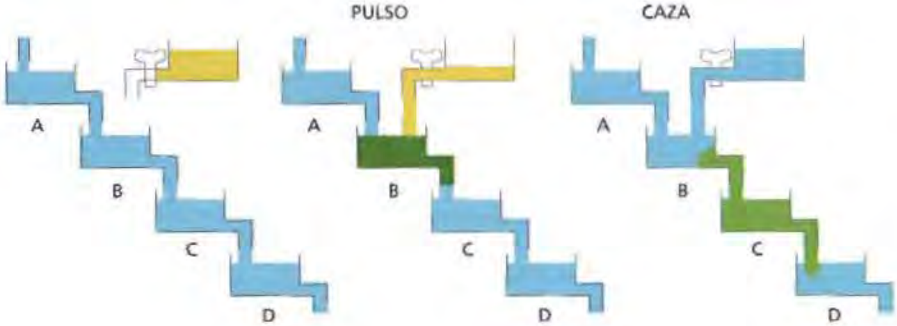


Figura 9–38 Lógica de un experimento típico de pulso y caza utilizando radioisótopos. Los recipientes marcados con A, B, C y D representan compartimientos diferentes de la célula (detectados mediante técnicas de autorradiografía o de fraccionamiento subcelular) o compuestos químicos distintos (detectados mediante cromatografía u otros métodos químicos).

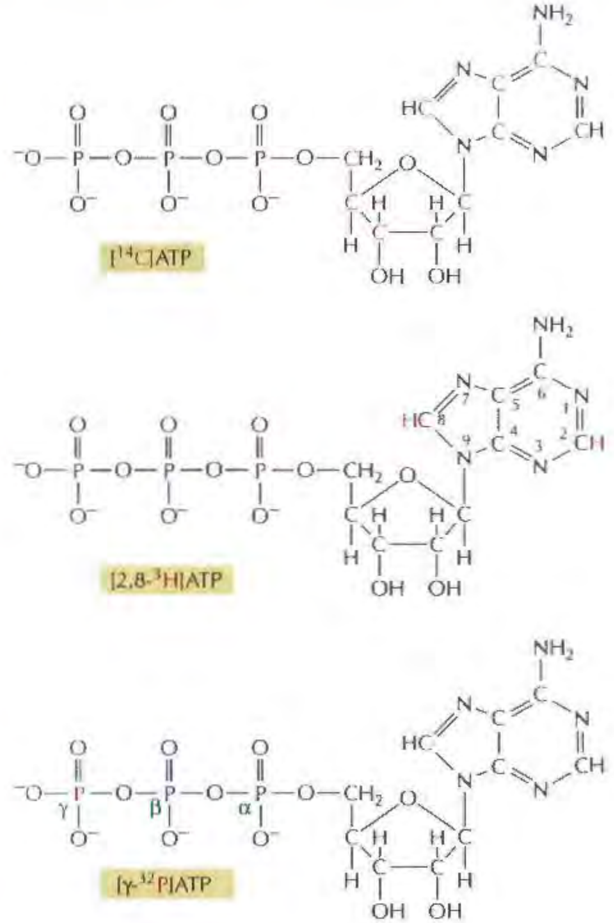


Figura 9-39 Moléculas marcadas con isótopos radiactivos. Tres formas radiactivas del ATP, disponibles comercialmente. Los átomos radiactivos se muestran en *rojo*. También se indica la nomenclatura utilizada para identificar la posición y el tipo de los átomos radiactivos.

Resumen

[illegible] muchas técnicas de microscopía óptica que permiten observar las células. Las célu[illegible] han sido fijadas y teñidas se pueden estudiar en un microscopio óptico convencional, [illegible]pueden utilizar anticuerpos acoplados con marcadores fluorescentes para localizar de[illegible]das moléculas en las células, utilizando un microscopio de fluorescencia. Las células [illegible] pueden observar con microscopios de contraste de fases, de contraste de interferencia [illegible]cial, de campo oscuro o de campo claro. Las técnicas de procesamiento digital de imá[illegible] facilitan todas las formas de microscopía óptica, ya que incrementan la sensibilidad y [illegible] la imagen. La microscopía confocal y la deconvolución de imagen permiten obtener [illegible]s secciones ópticas y pueden ser utilizadas para la reconstrucción tridimensional de [illegible]genes.

[illegible] la actualidad disponemos de un gran número de técnicas que permiten detectar, me[illegible] seguir casi cualquier molécula de interés en el interior de una célula. Por ejemplo, los [illegible]dores fluorescentes se pueden introducir en la célula para medir las concentraciones de [illegible]nados iones en células individuales o incluso en diferentes partes de una célula. El [illegible]rtamiento dinámico de muchas moléculas se puede seguir en una célula viva constru[illegible] un precursor inactivo empoquetado, que puede ser introducido en la célula y posterior[illegible] ser activado de forma instantánea en una región seleccionada de la célula mediante [illegible]cción de estimulación por luz. La GFP (green fluorescent protein) *es una sonda espe[illegible]nte versátil que se puede unir a otras proteínas por manipulación genética. Casi cual[illegible] proteína de interés se puede generar por ingeniería genética en forma de una proteína de [illegible] con GFP; entonces se puede observar en el interior de la célula viva mediante microsco[illegible] fluorescencia. También se pueden utilizar isótopos radiactivos de varios elementos pa[illegible]ir el destino de determinadas moléculas, tanto desde un punto de vista bioquímico [illegible] microscópico.*

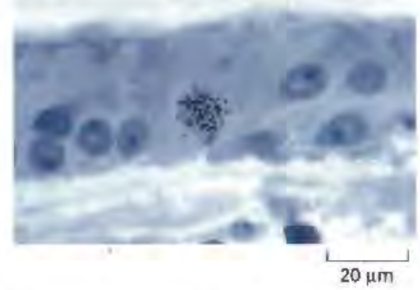


Figura 9-40 Autorradiografía. Este tejido ha sido expuesto durante un corto periodo de tiempo a timidina-³H. Las células que están replicando su DNA incorporan en el núcleo este precursor marcado radiactivamente y posteriormente se pueden visualizar por autorradiografía. Los granos de plata, que aparecen como *puntos negros* de la emulsión fotográfica sobre la sección, revelan qué célula está sintetizando DNA nuevo. Los núcleos mostrados corresponden al epitelio sensitivo del oído interno de pollo. (Cortesía de Mark Warchol y Jeffrey Corwin.)

OBSERVACIÓN DE CÉLULAS Y MOLÉCULAS CON EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO



Figura 9–41 **Límite de resolución del microscopio electrónico.** Electromicrografía de una fina capa de oro, en la que cada uno de los átomos aparece como manchas brillantes. La distancia entre los átomos de oro adyacentes es de unos 0,2 nm (2 Å). (Por cortesía de Graham Hills.)

La luz visible es limitante en cuanto al grado de detalle que puede revelar. Utilizando otros tipos de radiación –en especial en los microscopios electrónicos–, los microscopistas pueden resolver estructuras mucho más pequeñas de las que es posible resolver con luz visible. Esta mayor resolución tiene un coste: la preparación de las muestras para microscopía electrónica es mucho más compleja y resulta mucho más difícil de asegurar que lo que vemos en la imagen corresponde de forma precisa a la estructura real que estamos examinando. Sin embargo, ahora es posible utilizar la congelación muy rápida para preservar fielmente las estructuras para microscopía electrónica. Se puede utilizar el análisis digital de las imágenes para reconstruir objetos tridimensionales combinando información procedente de muchas partículas individuales o de muchas imágenes de un mismo objeto. En conjunto, estas aproximaciones incrementan la resolución y las aplicaciones de la microscopía electrónica hasta el punto en que podemos empezar a obtener imágenes fieles de las estructuras de las macromoléculas individuales y de los complejos que forman.

El microscopio electrónico resuelve la estructura fina de la célula

La relación entre el límite de resolución y la longitud de onda de la luz que se utiliza para iluminar la muestra (véase la Figura 9–6) es válida para cualquier forma de radiación, con independencia de que sea un haz de luz o un haz de electrones. Sin embargo, en el caso de los electrones el límite de resolución puede llegar a hacerse muy pequeño. La longitud de onda de un electrón disminuye a medida que aumenta su velocidad. En un **microscopio electrónico** que tenga un voltaje de aceleración de 100.000 voltios, la longitud de onda de un electrón es de 0,004 nm. Así, en teoría, la resolución de un microscopio de este tipo sería de aproximadamente 0,002 nm, lo cual es unas 100.000 veces mayor que la de un microscopio óptico. Sin embargo, debido a que las aberraciones de las lentes electrónicas son mucho más difíciles de corregir que las de las lentes de cristal, el poder de resolución real de la mayoría de los microscopios electrónicos actuales es, en el mejor de los casos, de 0,1 nm (1 Å) (**Figura 9–41**). Esto es debido a que en las lentes electrónicas, solamente es válido su centro exacto y, por tanto, su apertura numérica real es muy pequeña. Además, los problemas de preparación de la muestra, de contrastado y de lesión por la radiación, limitan claramente la resolución normal para los materiales biológicos a unos 1 nm (10 Å), unas 200 veces mayor a la resolución de un microscopio óptico. Además, en los últimos años la fabricación de microscopios electrónicos se ha mejorado gracias al desarrollo de fuentes de iluminación electrónica llamadas pistolas de emisión de campo. Estas fuentes, muy brillantes y uniformes, pueden mejorar sustancialmente la resolución que se consigue.

El microscopio electrónico de transmisión (TEM: ***transmission electron microscope***) es parecido a grandes rasgos a un microscopio óptico, aunque es de mayor tamaño e invertido

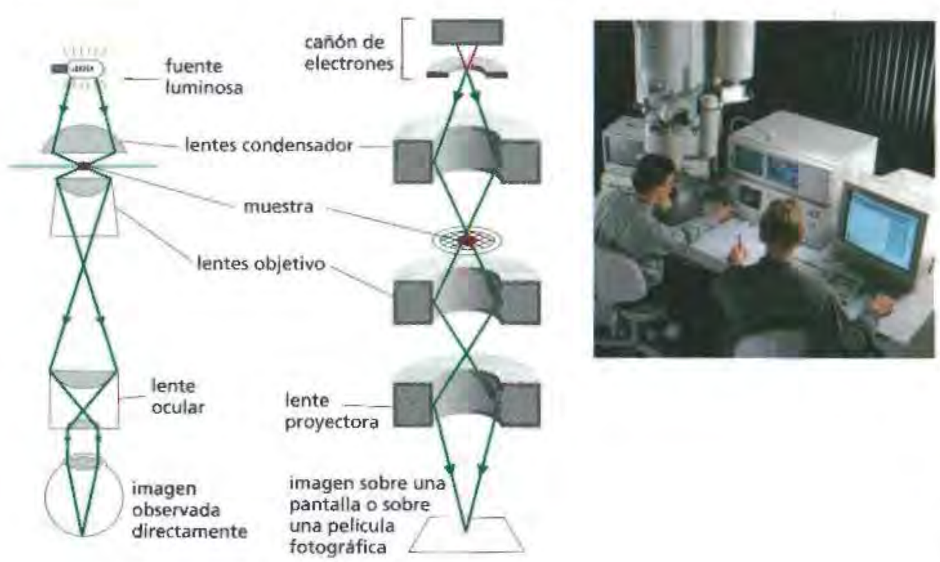


Figura 9–42 **Características principales de un microscopio óptico y de un microscopio electrónico de transmisión.** El esquema pone de relieve las similitudes generales del diseño de estos dos tipos de microscopios. Las lentes del microscopio óptico son de vidrio mientras que las del microscopio electrónico son bobinas magnéticas. El microscopio electrónico requiere que la muestra se coloque en el vacío. La fotografía de la derecha muestra un microscopio electrónico de transmisión en funcionamiento. (Por cortesía de la FEI Company Ltd.)

(Figura 9–42). La fuente de iluminación es un filamento o cátodo situado, en la parte superior de una columna cilíndrica de unos dos metros de altura, que emite electrones. Puesto que los electrones son dispersados al colisionar con las moléculas del aire, se debe extraer el aire de la columna para producir el vacío. A continuación, los electrones son acelerados desde el filamento mediante un ánodo y pueden pasar a través de un diminuto orificio y formar un haz de electrones que se dirige hacia la parte inferior de la columna. Unas bobinas magnéticas situadas a intervalos a lo largo de la columna enfocan el haz de electrones, como las lentes enfocan la luz en un microscopio óptico. La muestra se coloca en el vacío de la columna a través de una antecámara de compresión de manera que se sitúa en el camino del haz de electrones. Como en el caso del microscopio óptico, habitualmente la muestra se contrasta; en este caso, se hace mediante un material *electrodenso*, como veremos en la sección siguiente. Algunos de los electrones que atraviesan la muestra son dispersados por estructuras contrastadas con el material electrodenso; el resto de electrones son enfocados formando una imagen –de manera análoga a como se forma la imagen en el microscopio óptico. La imagen se puede observar sobre una pantalla fosforescente o se puede grabar sobre una placa fotográfica o con una cámara digital de alta resolución. Puesto que los electrones que han sido dispersados han desaparecido del haz, las regiones densas de la muestra aparecen como áreas de un flujo bajo de electrones y se ven negras.

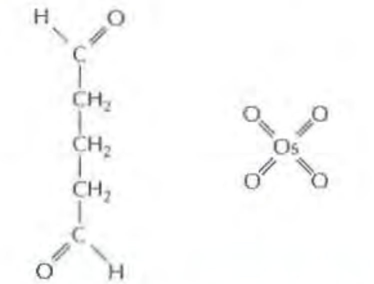


Figura 9–43 Dos fijadores químicos que se utilizan habitualmente en microscopia electrónica. Los dos grupos reactivos aldehído del glutaraldehído le permiten establecer enlaces cruzados entre diversos tipos de moléculas y formar uniones covalentes entre ellos. El tetróxido de osmio forma complejos mediante puentes cruzados con numerosos compuestos orgánicos y en este proceso se reduce. Esta reacción resulta especialmente útil para la fijación de las membranas celulares, ya que los dobles enlaces C=C existentes en muchos ácidos grasos reaccionan con el tetróxido de osmio.

Para poder ser estudiadas con el microscopio electrónico, las muestras biológicas requieren una preparación especial

En los primeros tiempos de su aplicación a materiales biológicos, el microscopio electrónico reveló la existencia en las células de una gran cantidad de estructuras inimaginables. Sin embargo, antes de que estos descubrimientos se pudieran llevar a cabo, los especialistas en microscopía electrónica tuvieron que desarrollar nuevos procedimientos de inclusión, corte y tinción de los tejidos.

Las muestras para microscopía electrónica deben ser expuestas a un vacío muy intenso, por lo que normalmente los tejidos vivos se matan y son protegidos por fijación –primero con *glutaraldehído*, que une de forma covalente las moléculas proteicas a sus vecinas, y después con *tetróxido de osmio*, que se une y estabiliza tanto las bicapas lipídicas como las proteínas (Figura 9–43). Los electrones tienen un poder penetrante muy limitado, y para poder observar los tejidos fijados se tienen que cortar en secciones muy delgadas (de 50 a 100 nm de espesor, aproximadamente 1/200 del espesor de una célula). Esto se consigue deshidratando la muestra e infiltrándola con una resina monomérica que polimeriza formando un bloque sólido de plástico; el bloque se puede cortar mediante una cuchilla de vidrio o de diamante, en un ultramicrótomo especial (ultramicrótomo). Estas *secciones ultrafinas*, libres de agua y de otros disolventes volátiles, se recogen sobre una pequeña rejilla metálica circular y son observadas en el microscopio (**Figura 9–44**). <AACA>

Desde sus inicios, las etapas necesarias para preparar el material biológico para su posterior observación con el microscopio electrónico han supuesto un reto para los microscopistas. ¿Cómo podemos estar seguros de que la imagen que finalmente vemos de la muestra después de fijarla, deshidratarla e incluirla en una resina, tiene algo que ver con el delicado sistema biológico acuoso que estaba presente en la célula viva? La mejor de las aproximaciones actuales a este problema reside en una congelación rápida. Si un sistema acuoso es enfriado lo bastante rápidamente a una temperatura bastante baja, el agua y el resto de componentes no tienen tiempo de reorganizarse o de formar cristales de hielo. En lugar de ello, el agua pasa a un estado rígido pero no cristalino –un "vidrio"– denominado gel vítreo. Este estado se puede conseguir utilizando, por ejemplo, un dispositivo especial para colocar la muestra contra un bloque de cobre congelado con helio líquido, sumergiéndola o vaporizándola con un refrigerante como propano líquido, o enfriándola a alta presión.

Algunas muestras congeladas se pueden examinar directamente con el microscopio electrónico utilizando un soporte especial para muestras congeladas. En otros casos, el bloque helado se puede fracturar para revelar superficies internas o el hielo que rodea la muestra se puede sublimar para dejar expuestas las superficies externas. Sin embargo, lo más habitual es observar cortes ultrafinos teñidos previamente para conseguir un contraste adecuado en la imagen que nos proporciona el microscopio electrónico (se describe más adelante). Por tanto, es necesario un compromiso para conseguir congelar rápidamente el tejido, después reemplazar el agua –que debe mantenerse en estado vítreo– por disolventes orgánicos y por último incluir el tejido en la resina, cortar las secciones y contrastar. Aunque



Figura 9–44 Rejilla de cobre utilizada como soporte de los cortes ultrafinos de una muestra, para ser observada con el microscopio electrónico de transmisión (TEM).

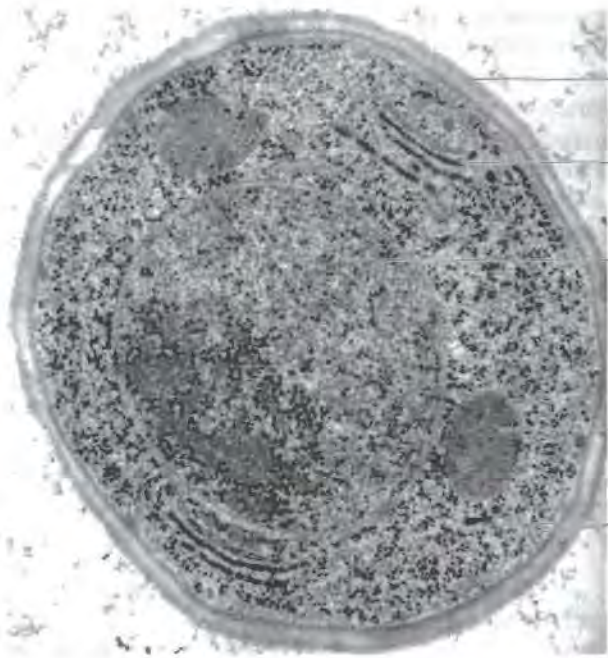


Figura 9–45 Secciones ultrafinas de una célula. Una sección ultrafina de una célula de levadura congelada rápidamente; el hielo vítreo se ha reemplazado por disolventes orgánicos y después ha sido incluido en resina plástica. La disposición del núcleo, la mitocondria, la pared celular, las complejos de Golgi y los ribosomas pueden verse en el estado en el que se supone están en la célula viva. (Cortesía de Andrew Staehelin.)

técnicamente, todavía resulta un proceso complejo, este método estabiliza y conserva el tejido en condiciones muy similares a las originales (**Figura 9–45**).

Con el microscopio electrónico, el contraste depende del número atómico de los átomos de la muestra: cuanto más elevado sea el número atómico, mayor número de electrones serán dispersados y, por lo tanto, mayor será el contraste obtenido. Las moléculas biológicas están compuestas por átomos de número atómico muy bajo (fundamentalmente de carbono, oxígeno, nitrógeno e hidrógeno). Para hacerlas visibles, se contrastan (antes o después de seccionarlas) con sales de metales pesados tales como el uranio y el plomo. El grado de impregnación o "de teñido" con estas sales revela los diferentes constituyentes celulares con diferentes grados de contraste. Los lípidos, por ejemplo, tienden a contrastarse de oscuro tras la fijación con osmio, revelando así la localización de las membranas celulares.

Las macromoléculas pueden ser inmunolocalizadas de forma específica con partículas de oro coloidal, gracias a la microscopía electrónica

La utilización de anticuerpos en microscopía de fluorescencia permite localizar específicamente macromoléculas. Un método análogo –la **inmunodetección con partículas de oro coloidal**– se puede utilizar en microscopía electrónica. El procedimiento habitual consiste en incubar primero una sección ultrafina con un anticuerpo primario específico y después con un anticuerpo secundario al que se le han unido partículas de oro coloidal. Las partículas de oro son electrodensas y con el microscopio electrónico se pueden ver como puntos negros (**Figura 9–46**).

A menudo la observación de secciones ultrafinas con el microscopio electrónico de transmisión no permite reconstruir la disposición tridimensional de los componentes celulares, lo cual puede inducir a errores: por ejemplo, una estructura lineal como un microtúbulo puede aparecer en una sección como un elemento con forma de círculo, y una sección que atraviese zonas protuberantes de un mismo elemento sólido de forma irregular, pueden aparecer como dos o más objetos. Aunque la tercera dimensión puede ser reconstruida a partir de cientos de secciones seriadas (**Figura 9–47**), supone un proceso largo y tedioso.

Las secciones ultrafinas tienen incluso un espesor considerable respecto a la resolución del microscopio electrónico, lo cual también puede inducir a errores en el sentido contrario. El diseño óptico del microscopio electrónico –la apertura numérica tan pequeña que tiene– produce una gran profundidad de campo, de manera que la imagen que se puede ver co-

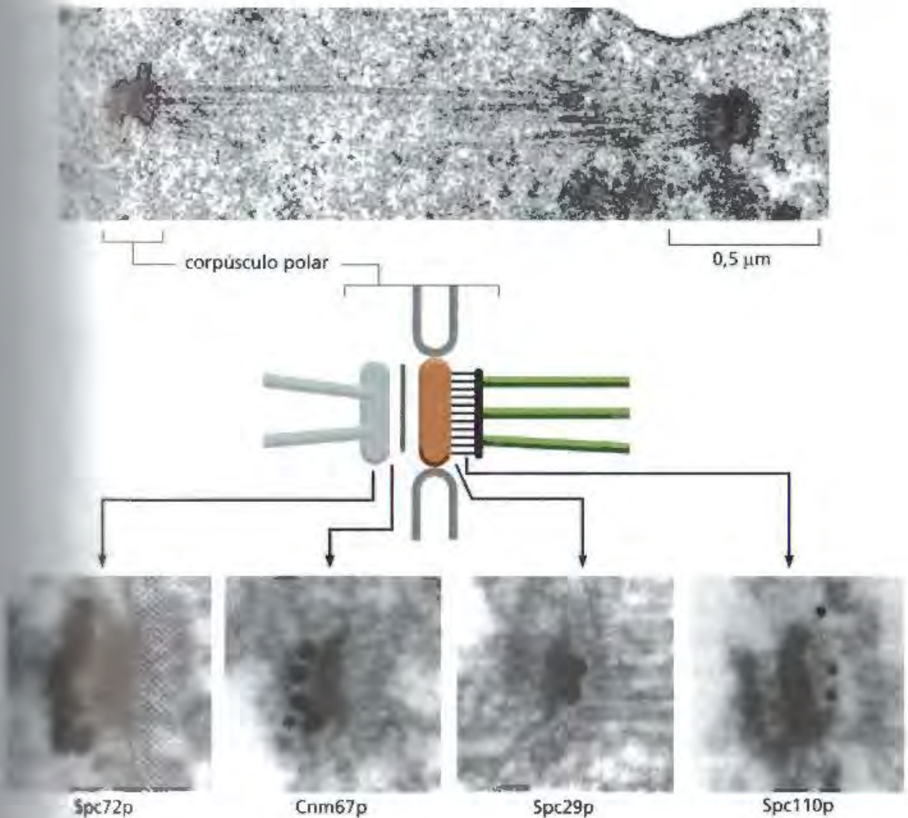


Figura 9–46 Localización de proteínas mediante microscopio electrónico. En esta imagen se utiliza la inmunodetección con partículas de oro coloidal para localizar cuatro componentes proteicos diferentes en el huso del cuerpo polar de una levadura. En la parte superior, se ve una sección ultrafina del huso mitótico de una levadura, mostrando el haz de microtúbulos que cruzan el núcleo y en cada extremo conecta con un corpúsculo polar. En la inferior, se muestra un esquema de los componentes de un corpúsculo polar. Se utilizan cuatro anticuerpos distintos unidos a partículas de oro coloidal (*puntos negros*), para determinar la localización de cada proteína dentro de la estructura compleja. (Por cortesía de John Kilmartin.)

corresponde a una superposición (una proyección) de estructuras situadas a diferentes niveles de profundidad. Otra complicación más para la inmunodetección con partículas de oro coloidal es que los anticuerpos y las partículas de oro coloidal no penetran en la resina que se utiliza para incluir las muestras, por lo que solamente se pueden detectar antígenos que se encuentren en la superficie de la sección. Este hecho significa primero, que la sensibilidad de detección es baja, porque las moléculas de antígeno que se encuentren en zonas más profundas de la sección no se detectan, y segundo que podemos obtener una impresión falsa si queremos determinar qué estructuras contienen el antígeno y cuáles no. Una solución a este problema consiste en marcar la muestra antes de incluirla en el plástico, ya que en este momento las células y los tejidos son accesibles a las moléculas marcadoras. Las partículas de oro muy pequeñas (de 1 nm de diámetro) son ideales para este procedimiento. Estas partículas de oro no suelen ser visibles de forma directa en las secciones ultrafinas finales y por ello posteriormente se rodean de plata o de oro, en un proceso químico similar al que se utiliza en el revelado de fotografía.

Mediante la microscopía electrónica de barrido se pueden obtener imágenes de superficies

El **microscopio electrónico de barrido** (**SEM**: *scanning electron microscope*) proporciona directamente una imagen de la estructura tridimensional de la superficie de una muestra. Suele ser más pequeño, sencillo y barato que el microscopio electrónico de transmisión.

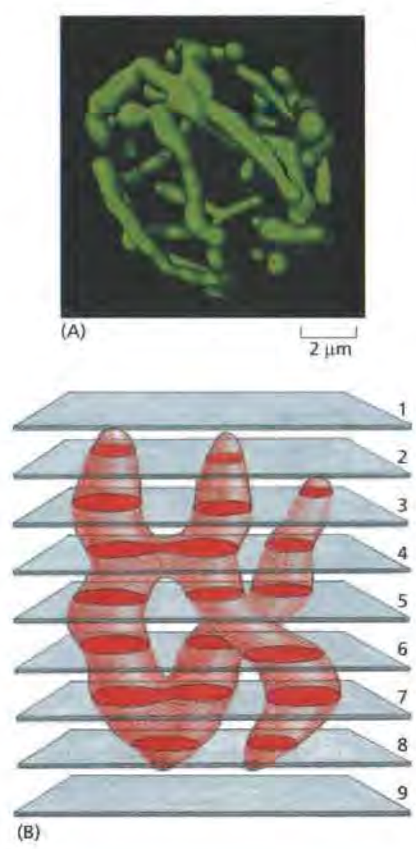


Figura 9–47 Reconstrucción tridimensional a partir de secciones seriadas. (A) Una reconstrucción tridimensional del compartimiento mitocondrial de una célula viva de levadura, ensamblado por series de secciones ópticas, que muestra la estructura ramificada. A menudo las secciones ultrafinas individuales, como en la estructura vista al microscopio electrónico, conducen a impresiones erróneas. En este ejemplo (B), la mayoría de las secciones de una célula que contiene una mitocondria ramificada parecen contener dos o tres mitocondrias diferentes (comparar con la Figura 9–45). Por otra parte, a partir de las secciones 4 y 7 se podría deducir que una mitocondria se halla en proceso de división. Sin embargo, a partir de los cortes seriados se puede reconstruir la verdadera forma tridimensional. (A, cortesía de Stefan Hell.)

Mientras que el TEM forma la imagen a partir de los electrones que han atravesado la muestra, el SEM utiliza los electrones dispersados o emitidos a partir de la superficie de la muestra. La muestra a examinar se fija, se seca y se recubre con una capa delgada de un metal pesado. También se puede congelar rápidamente y pasarla después a un soporte especial para su observación directa al microscopio. A menudo, una parte de una planta o un animal pequeño se pueden observar al microscopio tras muy poca preparación (**Figura 9–48**). A continuación, la muestra preparada mediante alguna de las formas descritas es barrida por un haz focalizado de electrones. La cantidad de electrones dispersados o emitidos cuando este haz primario bombardea de forma consecutiva cada uno de los puntos de la superficie metálica es medido y utilizado para controlar la intensidad del segundo haz, que se mueve sincrónicamente con el haz primario y forma una imagen sobre una pantalla de televisión. De esta manera se construye una imagen completa y muy ampliada de la superficie de la muestra (**Figura 9–49**).

La técnica de SEM proporciona una gran profundidad de foco; es más, gracias a que el grado de dispersión característico de los electrones depende del ángulo relativo entre el haz y la superficie, la imagen tiene puntos brillantes y sombras oscuras que le confieren un aspecto tridimensional (véase la Figura 9–48 y la **Figura 9–50**). Sin embargo solamente se pueden examinar detalles de la superficie y en la mayoría de modelos de SEM la resolución que se puede alcanzar no es muy elevada (alrededor de 10 nm, con un aumento efectivo de hasta 20.000 veces); por consiguiente, esta técnica se utiliza sobre todo para estudiar células enteras o tejidos y no orgánulos celulares.<AACG> Sin embargo, se han desarrollado SEM con un alto poder de resolución; como fuente de electrones tienen un cañón de emisión. Este tipo de SEM puede producir imágenes que rivalizan en resolución con las imágenes del TEM (**Figura 9–51**).



Figura 9–48 Espiga o flor del trigo en desarrollo. Esta delicada flor con estructura de espiga se sometió a una congelación rápida, se recubrió con una fina película metálica y se examinó directamente con un microscopio electrónico de barrido (SEM: *scanning **e**lectron **m**icroscope*). Esta electromicrografía, a bajo aumento, pone de manifiesto la gran profundidad de campo del SEM. (Por cortesía de Kim Findlay.)

El sombreado metálico permite el examen de detalles superficiales a alta resolución mediante el microscopio electrónico de transmisión

El TEM también se utiliza para estudiar la superficie de una muestra –y por lo general a mayor resolución que en un SEM– por ejemplo para revelar la forma de macromoléculas individuales. Como en el caso de la microscopía electrónica de barrido, sobre la muestra seca se evapora una fina película de un metal pesado como el platino. En este caso, sin embargo, el metal se vaporiza oblicuamente de manera que se forma una capa que en algunos lugares es

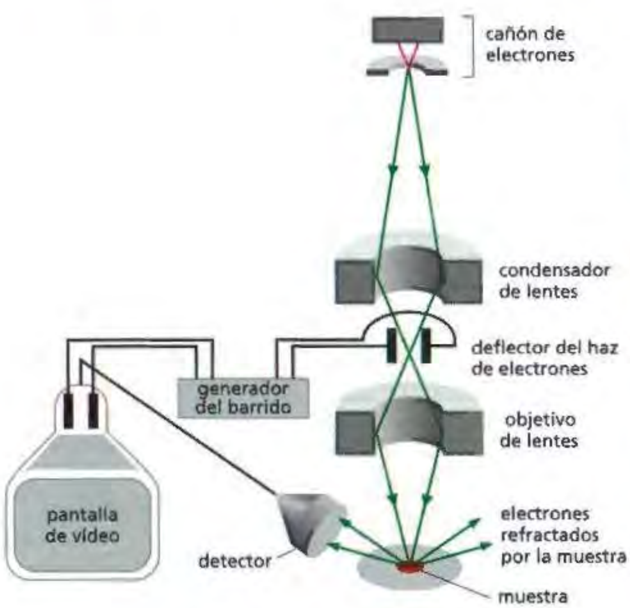




Figura 9–49 El microscopio electrónico de barrido. En el SEM, la muestra es barrida por un haz de electrones que se enfocan hacia la muestra mediante bobinas electromagnéticas que actúan como lentes. El detector mide la cantidad de electrones dispersados o emitidos mientras el haz de electrones bombardea cada punto de la superficie de la muestra y controla la intensidad de los puntos sucesivos en una imagen que se forma en una pantalla de vídeo. El SEM proporciona imágenes impactantes de objetos tridimensionales con una gran profundidad de foco y una resolución entre 3 y 20 nm según el instrumento. (Fotografía por cortesía de Andrew Davies.)

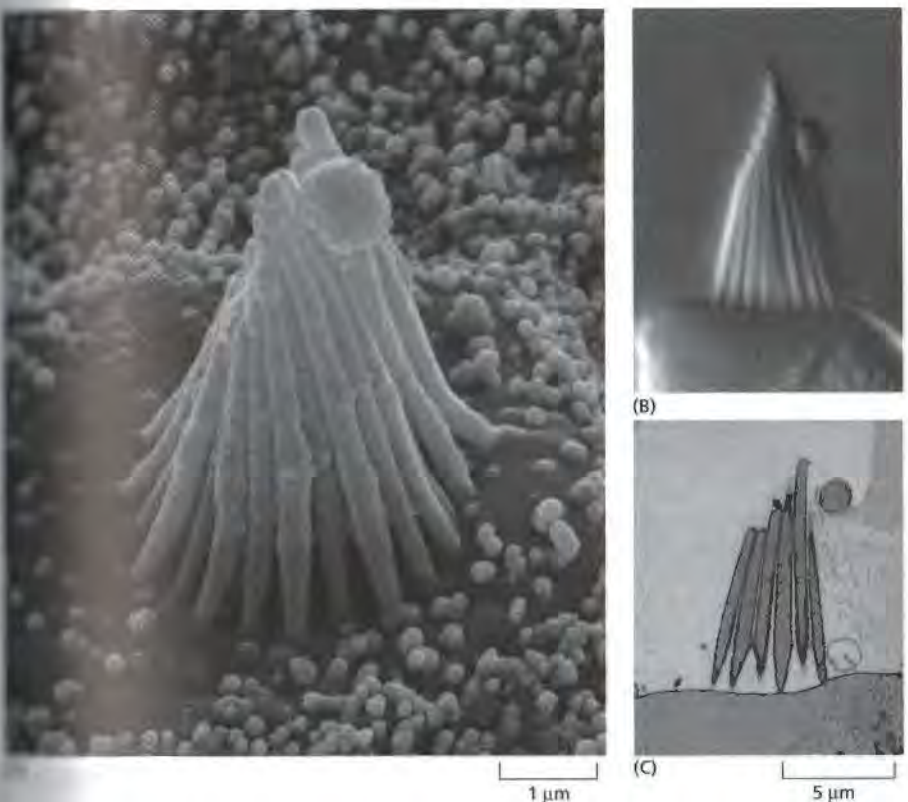


Figura 9–50 Microscopía electrónica de barrido. (A) Electromicrografía obtenida con un microscopio de barrido, mostrando la disposición cónica que adoptan los estereocilios que se proyectan desde la cara apical de las células ciliadas del oído interno. <CATA> Para comparar, la misma estructura se muestra observada por (B) microscopía óptica de contraste de fases interferencial y (C) una sección ultrafina con microscopía electrónica de transmisión. (Por cortesía de Richard Jacobs y James Hudspeth.)

gruesa que en otros –un proceso conocido como *sombreado* porque se crea un efecto de bras que da una imagen con apariencia tridimensional.

Algunas muestras recubiertas de esta manera son bastante finas o bastante pequeñas que el haz de electrones penetre en ellas directamente; éste es el caso de las moléculas viduales, los complejos moleculares y los virus. En todos estos casos se puede realizar el do, antes de hacer el sombreado, sobre un film que hace de soporte plano fabricado de material relativamente transparente a los electrones, como carbón o plástico. También se den obtener imágenes de la estructura interna de las células utilizando un sombreado álico. En este caso, las muestras se congelan de forma muy rápida (como hemos descri- se fracturan con una cuchilla. El nivel de hielo de la superficie fracturada disminuye por sublimación del hielo en el vacío a medida que la temperatura aumenta –en un proceso minado deshidratación por congelación. Las zonas de la célula que han quedado ex- tas por este proceso de *grabado* son sombreadas como antes para conseguir una répli- de metal. El material orgánico de la célula permanece, pero tiene que haber sido inado por disolución después del sombreado de forma que tan sólo quede la fina *répli-* metálica de la superficie de la muestra. Entonces, la réplica se refuerza con una película carbón para que pueda ser colocada en una rejilla y examinada al microscopio electróni- de transmisión de la manera habitual (**Figura 9–52**). Esta técnica expone estructuras del rior de la célula y puede revelar su organización tridimensional con una claridad excep- al (**Figura 9–53**).

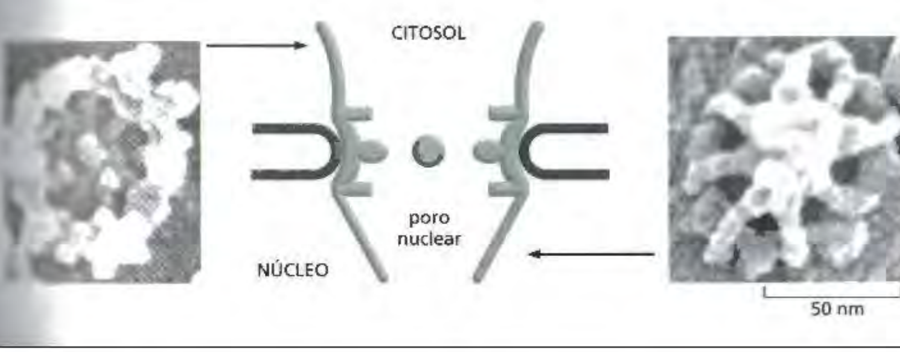


Figura 9–51 El poro nuclear. Las envolturas nucleares congeladas rápidamente fueron observadas con el SEM de alta resolución equipado con un campo emisor de electrones como fuente de electrones. Las imágenes de cada lado del poro nuclear representan el límite de resolución del SEM, que puede compararse con la Figura 12–9. (Por cortesía de Martin Goldberg y Terry Allen.)

Tanto la tinción negativa como la microscopía crioelectrónica permiten observar macromoléculas a alta resolución

Aunque las macromoléculas aisladas, tales como el DNA o las grandes proteínas, se pueden visualizar fácilmente con el microscopio electrónico si se vaporizan con un metal pesado para darles contraste, utilizando la **tinción negativa** también se pueden visualizar sus detalles más precisos. En este caso las moléculas, colocadas sobre una fina película de carbón (que resulta casi transparente a los electrones), se mezclan con una solución de una sal de un metal pesado, como el acetato de uranilo. Una vez seca la muestra, una película muy fina de la sal metálica cubre la película de carbón por todas partes excepto por donde ha sido excluida debido a la presencia de una macromolécula adsorbida. Puesto que la macromolécula permite que los electrones pasen con mucha más facilidad a través de ella que a través del metal pesado circundante, se crea una imagen inversa o negativa de la macromolécula. La tinción negativa es especialmente útil para visualizar grandes agregados macromoleculares tales como virus o ribosomas y para observar la estructura de subunidades de los filamentos proteicos (**Figura 9–54**).

Tanto la tinción negativa como el sombreado son capaces de proporcionar visiones de alto contraste de la superficie de pequeños conjuntos macromoleculares; sin embargo, el tamaño de las partículas metálicas utilizadas en el sombreado o en la tinción limita la resolución de ambas técnicas. Métodos más recientes proporcionan una alternativa que ha permitido visualizar directamente a alta resolución incluso las características internas de estructuras tridimensionales tales como virus y orgánulos. En esta técnica, llamada **microscopía crioelectrónica**, sobre una rejilla de microscopía se prepara una capa muy delgada (de unos 100 nm) de muestra hidratada que es rápidamente congelada. Se requiere un portamuestras especial para colocar esta muestra a –160 °C en el vacío del microscopio, donde se visualiza de forma directa sin necesidad de fijación, tinción ni secado. Al contrario que en la tinción negativa, mediante la cual lo que observamos es la tinción que ha sido excluida debido a la presencia de una macromolécula adsorbida, en la microscopía crioelectrónica la imagen se genera a partir de la propia estructura de la macromolécula. Sin embargo, para obtener la máxima cantidad posible de información sobre la estructura de una molécula, es necesario utilizar técnicas especiales de procesamiento de imágenes, tales como las que se describen a continuación.

Para incrementar la resolución se pueden combinar múltiples imágenes

Cualquier imagen, tanto si se ha obtenido con un microscopio óptico o con uno electrónico, está formada por partículas –fotones o electrones– que chocan contra un detector de algún tipo. Pero estas partículas están gobernadas por la mecánica cuántica, por lo que el número de partículas que llegan a alcanzar el detector sólo es predecible en un sentido estadístico. En el caso de un número de partículas muy grande, su distribución en el detector es determinada de forma muy precisa por la muestra fotografiada. Sin embargo, con números de partículas más pequeños, esta estructura subyacente en la fotografía queda oscurecida por

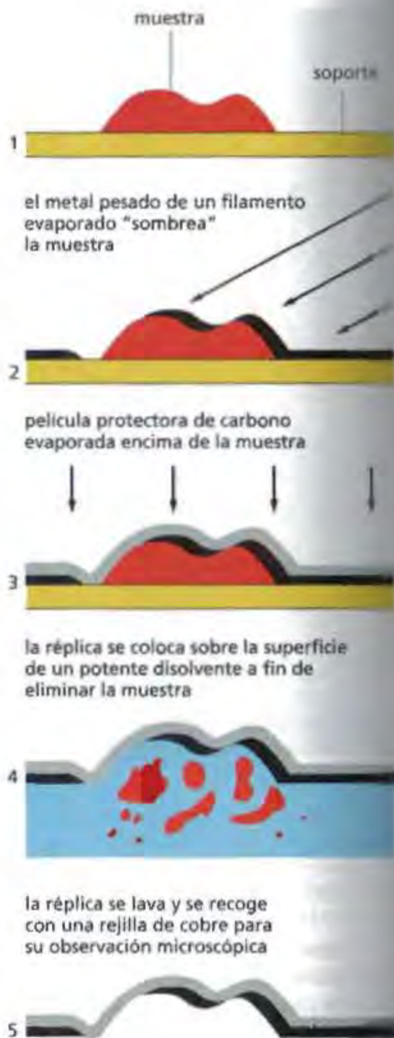


Figura 9–52 Preparación de una réplica metalizada de la superficie de una muestra. Obsérvese que el grosor del metal refleja los contornos de la superficie de la muestra original.



Figura 9–53 Ordenación regular de los filamentos proteicos de un músculo de insecto. Para obtener esta imagen, las fibras musculares fueron rápidamente congeladas en helio líquido, fracturadas a través del citoplasma y sometidas a grabado profundo. Luego, se preparó una réplica metalizada que se examinó a gran aumento. (Por cortesía de Roger Cooke y John Heuser.)



Figura 9–54 Electromicrografía de filamentos de actina con tinción negativa. Cada filamento tiene aproximadamente 8 nm de diámetro. Al examinarlo detenidamente, se observa que está formado por una cadena helicoidal de moléculas globulares de actina . (Por cortesía de Roger Craig.)

...mación estadística del número de partículas detectado en cada región. El término *rui-... fondo* describe la variabilidad aleatoria que confunde la imagen subyacente de la pro-... muestra.

El ruido de fondo es importante en microscopía óptica a niveles bajos de luz pero resul-... problema particularmente grave en microscopía electrónica de macromoléculas sin ...star. Una molécula proteica sólo puede tolerar sin sufrir daños una dosis de unas po-... decenas de electrones por nanómetro cuadrado; esta dosis está varios órdenes de mag-...l por debajo de la necesaria para definir una imagen a la resolución atómica.

La solución consiste en obtener imágenes de muchas moléculas idénticas –tal vez cien-... de decenas de imágenes individuales– y combinarlas para obtener una imagen media ... muestre detalles estructurales que estaban ocultos por el ruido en las imágenes origina-... Este procedimiento se denomina **reconstrucción de una sola partícula**. Sin embargo, ... de poder combinar las imágenes individuales se deben alinear unas con otras. Algunas ... es posible inducir a las proteínas y los complejos a formar ordenamientos cristalinos, ... que cada molécula tiene la misma orientación en un entramado regular. En estos ca-... el problema de la alineación queda resuelto. Así, utilizando este tipo de cristalografía ...ónica se han conseguido determinar muchas estructuras proteicas hasta una resolu-... atómica. Sin embargo, en principio los ordenamientos cristalinos no son imprescindi-... Con la ayuda de un ordenador, las imágenes digitales de moléculas distribuidas de ...a aleatoria, pero todavía desalineadas, se pueden procesar y combinar hasta alcanzar ...trucciones de alta resolución. <TATT> Las estructuras que tienen alguna simetría in-...a son más sencillas de alinear de forma precisa, pero esta técnica también se ha utili-... para objetos como ribosomas, que no tienen ninguna simetría. En la **Figura 9–55** se ...tra un virus icosaédrico que se ha determinado a alta resolución por la combinación de ...has partículas y muchas imágenes.

Mediante microscopía electrónica se han conseguido resoluciones de 0,3 nm trabajan-... sobre distribuciones cristalinas bien ordenadas –una resolución suficiente para ver las ...buciones atómicas internas en una proteína o para rivalizar con la resolución de la cris-...grafía de rayos X. Con la reconstrucción de una sola partícula el límite actual de resolu-... está alrededor de 0,5 nm, suficiente para identificar subunidades y dominios proteicos ...ucturas secundarias de proteínas limitadas. A pesar de que la microscopía electrónica

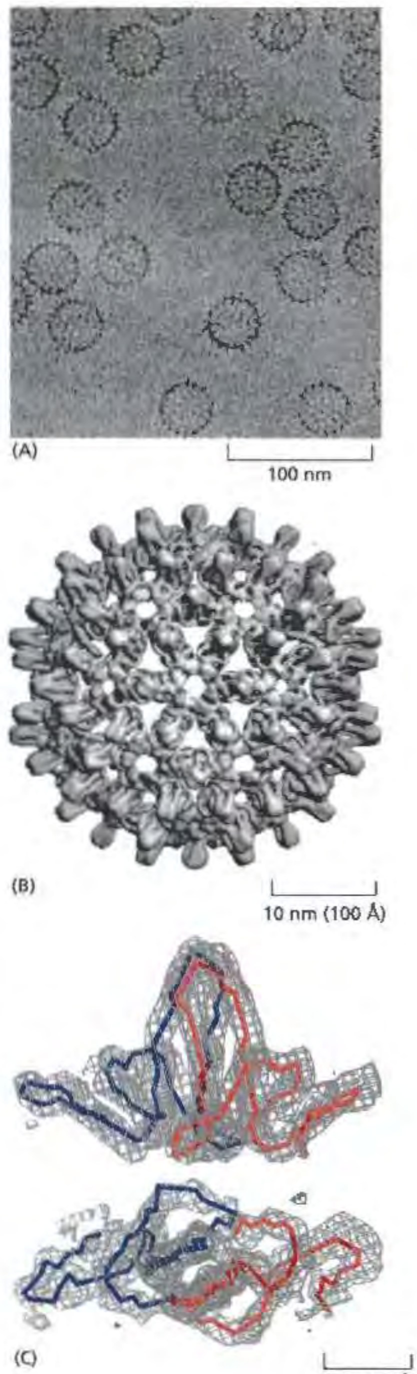


Figura 9–55 Reconstrucción de una partícula. La cubierta proteica esférica del virus de la hepatitis B está preservada en una fina película de hielo (A) y se observa con el microscopio electrónico de transmisión. Se combinaron cientos de partículas individuales por el sistema de "reconstrucción de una sola partícula" generando el mapa tridimensional de la partícula icosaédrica que se presenta en (B). Las dos imágenes de un mismo dímero proteico (C), que forman las espículas en la superficie de la cubierta, muestran que la resolución de la reconstrucción (0,74 nm) es suficiente para resolver la cubierta de la cadena polipeptídica. (A, por cortesía de B. Böttcher, S.A. Wynne y R.A. Crowther; B y C, de B. Böttcher, S.A. Wynne y R.A. Crowther, *Nature* 386:88-91, 1997. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

será incapaz de superar la cristalografía de rayos X (se describe en el Capítulo 8) como método para la determinación de estructuras macromoleculares, tiene algunas ventajas evidentes sobre ella. En primer lugar, no requiere en absoluto muestras cristalinas. En segundo lugar puede aplicarse a complejos muy grandes –que pueden resultar demasiado grandes o variables para cristalizar satisfactoriamente.

El análisis de estructuras macromoleculares grandes y complejas es bastante más fácil si se conoce la estructura atómica de una o más subunidades, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X. Entonces, los modelos moleculares pueden "ajustar" matemáticamente la envoltura de la estructura determinada a baja resolución utilizando la microscopía electrónica. En la **Figura 9–56**, se muestra la estructura de un ribosoma con la localización de un factor de liberación unido a ella (véase también las Figuras 6–74 y 6–75).

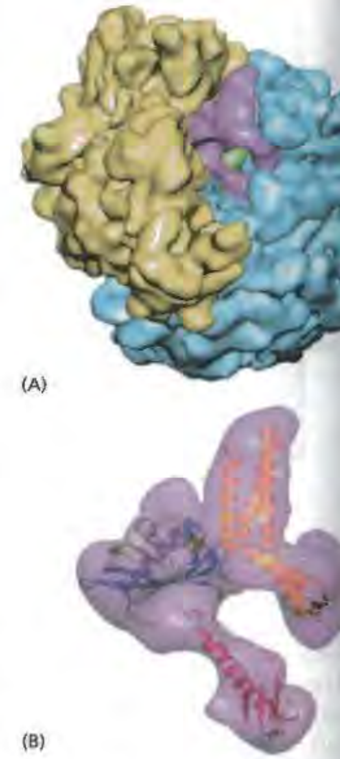


Figura 9–56 **Reconstrucción de una partícula y modelo molecular de ajuste.** Utilización de ribosomas bacterianos con y sin el factor de liberación necesario para la liberación de péptidos del ribosoma, para generar mapas tridimensionales crio-EM de alta resolución (resolución superior a 1 nm). Se han utilizado cerca de 20.000 ribosomas, preservados en hielo, para la reconstrucción de una sola partícula. En (A) se pueden distinguir la subunidad 30S (*amarillo*) y la subunidad 50S (*azul*) de una densidad de electrones adicional, que puede atribuirse al factor de liberación RF2 (*rosa*). La estructura molecular conocida de RF2 ha sido modelada a partir de su densidad de electrones (B). (De U.B.S. Rawat et al., *Nature* 421:87-90, 2003. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

Imágenes de un mismo objeto tomadas desde distintas direcciones se pueden combinar para dar lugar a una reconstrucción tridimensional

Los detectores utilizados para grabar imágenes obtenidas con el microscopio electrónico producen fotografías bidimensionales. Debido a la gran profundidad de campo del microscopio, todas las zonas de una muestra tridimensional están enfocadas; la imagen resultante es una proyección de la estructura a lo largo de la dirección en la que se observa. La pérdida de información en lo que se refiere a la tercera dimensión se puede recuperar si observamos la misma muestra desde diferentes direcciones. Los métodos informáticos para llevar a cabo esta técnica se desarrollaron en la década de 1960 y han sido ampliamente utilizados en los escáners médicos: la tomografía computerizada (CT: *computed tomography*). En un escáner de CT el equipo que toma las fotografías se desplaza alrededor del paciente para generar diferentes imágenes. En la **tomografía al microscopio electrónico** (**EM**: *electron-microscope*), el soporte de la muestra gira en el microscopio de manera que se consigue el mismo resultado. De esta manera, combinando un conjunto de imágenes obtenidas desde diferentes ángulos de una misma molécula, podemos conseguir una reconstrucción tridimensional en la orientación estándar elegida. Cada imagen por separado tendrá mucho ruido de fondo pero combinándolas en tres dimensiones y haciendo una media, se elimina gran parte de este ruido y se consigue así una imagen nítida de la estructura molecular. A partir de secciones plásticas finas de material incluido, las reconstrucciones tridimensionales o *tomogramas*, <ATCC> <CGAT> se utilizan muy a menudo para describir la anatomía detallada de pequeñas regiones de la célula, como el complejo de Golgi (**Figura 9–57**) o el citoesqueleto. Sin embargo, cada vez más los microscopistas aplican la tomografía EM a secciones hidratadas congeladas y no teñidas, e incluso a células u orgánulos congelados rápidamente (**Figura 9–58**). La microscopía electrónica proporciona un puente sólido entre dos escalas diferentes: el estudio de una única molécula y el de una célula completa.

Resumen

La determinación de la estructura detallada de las membranas y de los orgánulos celulares requiere la resolución asequible con un microscopio electrónico de transmisión. Las macromoléculas se pueden localizar específicamente con anticuerpos unidos a partículas de oro coloidal. Se pueden obtener visiones tridimensionales de las superficies de las células y los tejidos mediante microscopía electrónica de barrido. También se pueden determinar las formas de macromoléculas aisladas después de sombrearlas con un metal pesado o de destacarlas con una tinción negativa. Utilizando métodos de ordenador se pueden combinar muchas imágenes o imágenes obtenidas desde diferentes ángulos para obtener reconstrucciones detalladas de macromoléculas y de complejos moleculares utilizando la técnica de tomografía electrónica y de reconstrucción de una sola partícula, a menudo aplicada a muestras criopreservadas. La resolución obtenida con estos métodos permite que a menudo se puedan ajustar estructuras atómicas de moléculas individuales con las imágenes obtenidas por microscopía electrónica; la TEM está aumentanda la capacidad de colmar el vacío que existe entre las estructuras determinadas por cristalografía de rayos X y las determinadas por la microscopía óptica.

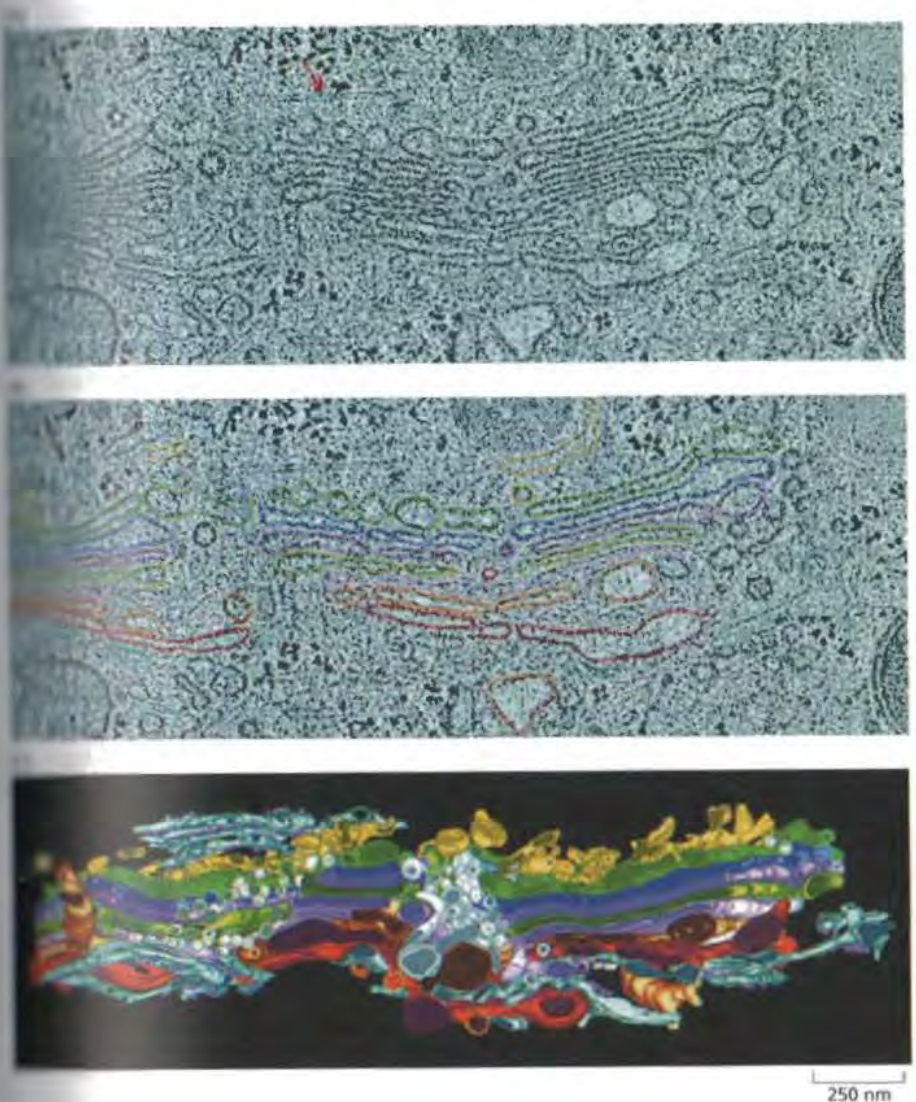


Figura 9–57 Tomografía de microscopio electrónico (EM). Las muestras que han sido congeladas rápidamente, y posteriormente incluidas en plástico, conservan su estructura en unas condiciones muy similares al del estado vivo original. Este experimento muestra un análisis de la estructura tridimensional del complejo de Golgi en células de riñón de rata preparadas de esta manera. Varias secciones gruesas (250 nm) de la célula se han inclinado en un microscopio electrónico de alto voltaje, siguiendo dos ejes diferentes, y se han recogido alrededor de 160 imágenes. Las imágenes digitales se combinaron usando el método de tomografía EM para obtener una reconstrucción tridimensional con una resolución de alrededor de 7 nm. El ordenador puede ofrecer imágenes de cortes muy finos, o tomogramas, a partir de los datos tridimensionales completos, y dos cortes seriados, cada uno de ellos de sólo 4 nm de grosor, que se muestran en (A) y (B). En (B) se representan pequeños cambios de un corte al siguiente, utilizando todos los datos, y codificando de forma manual el color de las membranas; en (C) una imagen tridimensional completa del complejo de Golgi y sus vesículas asociadas. (De M.S. Ladinsky et al., *J. Cell Biol.* 144:1135-1149, 1999. Con la autorización de The Rockefeller University Press.)

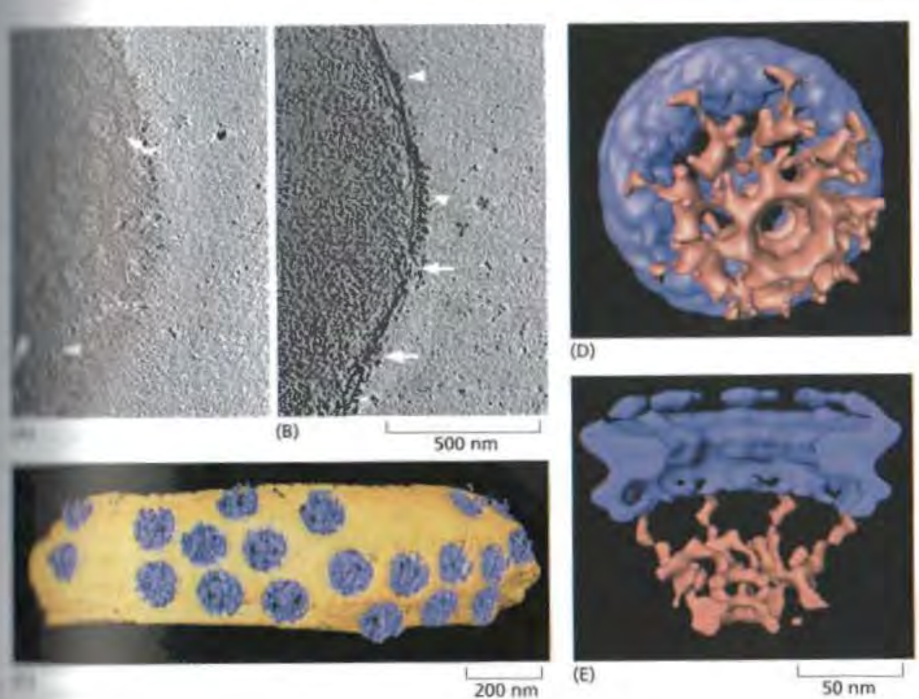


Figura 9–58 Combinación de criotomografía EM y reconstrucción de una sola partícula. La técnica de tomografía EM puede aplicarse a secciones pero también a especies pequeñas no fijadas que son rápidamente congeladas y examinadas mientras todavía están congeladas utilizando un sistema de inclinación en el microscopio. En este experimento, el pequeño núcleo de *Dictyostelium* fue aislado con cuidado, congelado rápidamente y observado a diferentes ángulos. La serie de imágenes digitales obtenidas se combinaron mediante métodos de tomografía EM obteniendo un tomograma tridimensional. Se muestran dos cortes digitales finos (10 nm) de este tomograma en los que se puede ver una imagen superior (A) y lateral (B) de poros nucleares individuales. En el modelo tridimensional (C) se puede ver una superficie que rodea los poros (*azul*) embebida en la envoltura nuclear (*amarillo*). A partir de una serie de tomogramas fue posible extraer series de datos de cerca de 300 poros nucleares, cuyas estructuras pudieron medirse utilizando las técnicas de reconstrucción de una sola partícula. En (D) se presenta una imagen renderizada de la cara nuclear de uno de estos poros reconstruidos y en (E) una sección de esta imagen tridimensional. Pueden compararse con la Figura 12-10. El complejo de poro está coloreado en *azul* y la cesta nuclear en *marrón*. (De M. Beck et al., *Science* 306: 1387-1390, 2004. Con la autorización de la AAAS.)

PROBLEMAS

¿Qué afirmaciones son ciertas? Explicar por qué sí o por qué no

9–1 Debido a que la doble hélice del DNA sólo tiene 10 nm de ancho –muy por debajo de la resolución de la microscopía óptica– resulta imposible ver los cromosomas en las células vivas sin ninguna tinción especial.

9–2 Una molécula fluorescente que ha absorbido un fotón de luz a una determinada longitud de onda siempre lo emite a una longitud de onda mayor.

9–3 Se pueden introducir en una célula moléculas enjauladas y después activarlas mediante un fuerte pulso de luz láser en un momento y un lugar precisos escogidos por el experimentador.

Resolver los problemas siguientes

9–4 Los diagramas de la **Figura P9–1** muestran los caminos que siguen los rayos de luz cuando atraviesan una muestra con una lente seca o con una lente de inmersión en aceite. Explicar por qué las lentes de inmersión deben proporcionar una resolución mayor. El aire, el vidrio y el aceite tienen los índices de refracción siguientes: 1,00, 1,51 y 1,51, respectivamente.



Figura P9–1 Vías que siguen los rayos de luz a través de lentes secos o de inmersión (Problema 9–4). El *círculo blanco* situado en el origen de los rayos de luz representa la muestra.

9–5 La **Figura P9–2** muestra un esquema del ojo humano. Los índices de refracción de los componentes del paso de luz son: córnea 1,38; humor acuoso 1,33; cristalino 1,41 y humor vítreo 1,38. ¿Donde se produce la mayor refracción (el principal enfoque)? ¿Qué papel desempeña el cristalino?

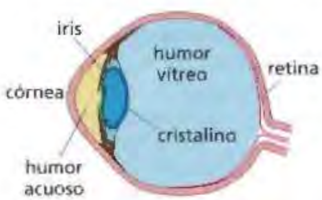


Figura P9–2 Diagrama del ojo humano (Problema 9–5).

9–6 ¿Por qué se ve tan mal en el agua? ¿Por qué las gafas submarinas mejoran la visión?

9–7 Explicar la diferencia entre la resolución y la ampliación.

9–8 Los anticuerpos que se unen específicamente a proteínas son importantes herramientas para definir la localización de moléculas en las células. A menudo la sensibilidad del anticuerpo primario –el que reacciona con la molécula diana– se puede incrementar utilizando anticuerpos secundarios marcados que se unen al primario. ¿Cuáles son las ventajas y las desventajas del uso de anticuerpos secundarios que transportan marcas fluorescentes respecto a los que transportan enzimas unidas a ellos?

9–9 La **Figura P9–3** muestra una serie de proteínas GFP modificadas que emiten luz en un rango de colores. ¿Cómo un mismo cromóforo puede emitir luz fluorescente de longitudes de onda tan variadas?

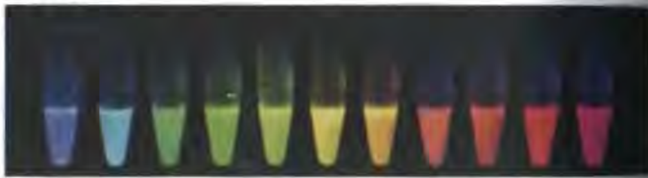


Figura P9–3 Un abanico de colores producidos por GFP modificadas (Problema 9–9). (De R.F. Service, *Science* 306: 1457, 2004. Con la autorización de la AAAS.)

9–10 Considerar un detector de fluorescencia diseñado para seguir la localización celular de las proteínas tirosina quinasa activas. Una proteína fluorescente azul (cian) (CFP: *cyan fluorescent protein*) y otra proteína fluorescente amarilla (YFP: *yellow fluorescent protein*), se fundieron a cada uno de los dos extremos de un dominio proteico híbrido. Este segmento proteico híbrido está formado por un péptido que es reconocido por la proteína tirosina quinasa Abl y un dominio de unión a fosfotirosina (**Figura P9–4**A). La estimulación del dominio CFP no provoca que el dominio YFP emita luz, ya que están lo bastante separados uno del otro. Sin embargo, cuando ambos dominios se juntan, la transferencia de energía resonante fluorescente (FRET) permite que la excitación de CFP estimule la emisión de YFP. FRET se muestra experimentalmente como un incremento de la relación de emisión a 526 nm respecto a 476 nm (YFP/CFP) cuando CFP es excitado con luz de 434 nm de longitud de onda.

La incubación de la proteína reportera con la proteína tirosina quinasa Abl en presencia de ATP provoca un incremento de la emisión YFP/CFP (Figura P9–4B). En ausencia de ATP o de la proteína Abl no se produce FRET. También se elimina FRET por la adición de una proteína fosfatasa (Figura P9–4B). Describir lo mejor posible de qué forma la proteína reportera detecta la actividad proteína tirosina quinasa Abl.

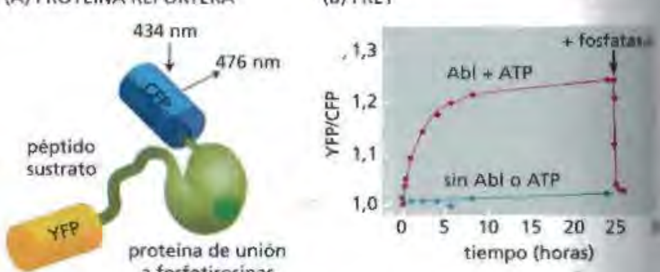


Figura P9–4 Proteína reportera fluorescente diseñada para detectar fosforilación en tirosinas (Problema 9–10). (A) Estructura del dominio de la estructura reportera. Se indican 4 dominios: CFP, YFP, un péptido sustrato de tirosinas quinasa y un dominio de unión a fosfotirosina. (B) Ensayo FRET. YFP/CFP está normalizado a 1,0 a tiempo 0. La proteína reportera se incuba en presencia (o ausencia) de Abl y de ATP durante los intervalos de tiempo que se indican. La *flecha* indica el momento de la adición de la proteína fosfatasa. (De A.Y. Ting, K.H. Klain, R.L. Klemke y R.Y Tsien. *Proc. Natl Acad. Sci.* U.S.A. 98: 15003-15008, 2001. Con la autorización de National Academy of Sciences.)

9–11 El poder de resolución práctico de los microscopios electrónicos modernos es de unos 0,1 nm. La razón principal de esta limitación es la pequeña abertura numérica (n sen θ) que está limitada por θ (la mitad de la amplitud angular de los rayos recogi-

...por las lentes del objetivo). Asumiendo que la longitud de on- ... de los electrones es de 0,004 nm y que el índice de refrac- ... (n) es de 1,0, calcular el valor de θ. ¿Cómo es este valor ...parado con el correspondiente a 60º, que es un valor típico ... microscopios ópticos?

$$\text{resolución} = \frac{0{,}61\,\lambda}{n\,\text{sen}\,\theta}$$

...12 Es difícil decir si son protuberancias o cavidades únicamen- ...ando el patrón de sombreado. Considera la **Figura P9–5** que ...tra un juego de círculos sombreados. En la Figura P9–5A, los ... parecen protuberancias. Sin embargo, si giramos la figura ... P9–5B) los círculos parecen cavidades. Se trata de una ilu- ... óptica clásica. Esta misma ilusión óptica se presenta en el ...reado metálico como se muestra en las dos micrografías elec- ...as de la Figura P9–5. En una de ellas, la membrana aparece ...bierta de protuberancias mientras que en la otra la membrana ... llena de cavidades. ¿Es posible para un microscopista po- ... seguro que una de las dos visiones es la correcta, o es arbi- ...? Explicar el razonamiento.

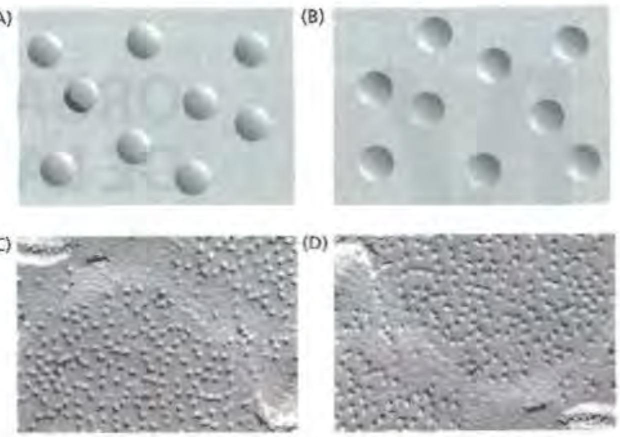


Figura P9–5 Protuberancias y cavidades (Problema 9–12). (A) Círculos sombreados que parecen protuberancias. (B) Círculos sombreados que parecen cavidades. (C) Electromicrografía orientada de forma que parece recubierta de protuberancias. (D) Electromicrografía orientada de forma que parece recubierta de cavidades. (C y D, por cortesía de Andrew Staehelin.)

BIBLIOGRAFÍA

...eral

..., Carter N, Simons K et al (eds) (2005) Cell Biology: A Laboratory ...dbook, 3.ª ed. San Diego: Academic Press. (El volumen 3 cubre las ...ticas de los métodos utilizados con microscopios ópticos y ...rónicos; el 4 ilustra la transferencia de moléculas dentro de las células.)

... P (ed) (2006) Handbook of Biological Confocal Microscopy, 3.ª ed. ... York: Springer Science.

...diar la estructura de las células con el microscopio óptico

... MC, Salmon WC, Gupton SL et al (2003) A high-speed multispectral ...ing-disk confocal microscope system for fluorescent speckle ...scopy of living cells. *Methods* 29:29–41.

... DA, Hiraoka Y, Shaw P & Sedat JW (1989) Fluorescence microscopy in ... dimensions. In Methods in Cell Biology, vol 30: Fluorescence ...scopy of Living Cells in Culture, part B (DL Taylor, Y-L Wang eds). San ...: Academic Press.

...e VE (2002) Introduction to multiphoton excitation imaging for the ...gical sciences. *Methods Cell Biol* 70:129–48.

... M, Tu Y, Euskirchen G et al (1994) Green fluorescent protein as a marker ... gene expression. *Science* 263:802–805.

...s BN, Adams SR, Ellisman MH & Tsien RY (2006) The fluorescent ...box for assessing protein location and function. *Science* 312:217–224.

... E & Lane D (1988) Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring ...bor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

...d RP (ed) (1996) Handbook of Fluorescent Probes and Research ...micals, 8.ª ed. Eugene, OR: Molecular Probes, Inc. (Disponible online en ...://www.probes.com/)

... JK & Simon SM (2004) Potentials and pitfalls of fluorescent quantum ... for biological imaging. *Trends Cell Biol* 14:497–504.

...ijman EA & Jovin TM (2003) FRET imaging. *Nature Biotech* 21:1387–95.

...cott-Shwartz J, Altan-Bonnet N & Patterson G (2003) Photobleaching ... photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nature Cell* ... 5:S7–S14.

... M (1988) Memoir on inventing the confocal scanning microscope. ...ning 10:128–138.

...aki A, Sawano A & Kogure T (2003) Lighting up cells: labeling proteins ... fluorophores. *Nature Cell Biol* 5:S1–S7.

...n RM & Read ND (1999) Calcium and pH imaging in living cells. In Light ...oscopy in Biology. A Practical Approach, 2.ª ed. (Lacey AJ ed) Oxford: ...ford University Press.

... Y & Yanagida T (2003) Single-molecule visualization in cell biology. *Nature* ... *Mol Cell Biol* 4:SS1–SS5.

Sekar RB & Periasamy A (2003) Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J Cell Biol* 160:629–633.

Shaner NC, Steinbach PA & Tsien RY (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods* 2:905–909.

Sheetz MP (ed) (1997) Laser Tweezers in Cell Biology. *Methods Cell Biol* 55.

Sluder G & Wolf DE (2007) Video Microscopy 3.ª ed. *Methods Cell Biol* 81.

Stevens DJ & Allan (2003) Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging. *Science* 300:82–86.

Tsien RY (2003) Imagining imaging's future. *Nature Rev Mol Cell Rev* 4:SS16–SS21.

Weiss DG, Maile W, Wick RA & Steffen W (1999) Video microscopy. In Light Microscopy in Biology: A Practical Approach, 2.ª ed. (AJ Lacey ed) Oxford: Oxford University Press.

White JG, Amos WB & Fordham M (1987) An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J Cell Biol* 105:41–48.

Zernike F (1955) How I discovered phase contrast. *Science* 121:345–349.

Observación de células y moléculas con el microscopio electrónico

Allen TD & Goldberg MW (1993) High resolution SEM in cell biology. *Trends Cell Biol* 3:203–208.

Baumeister W (2002) Electron tomography: towards visualizing the molecular organization of the cytoplasm. *Curr Opin Struct Biol* 12:679–684.

Böttcher B, Wynne SA & Crowther RA (1997) Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature* 386:88–91.

Dubochet J, Adrian M, Chang J-J et al (1988) Cryoelectron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys* 21:129–228.

Frank J (2003) Electron microscopy of functional ribosome complexes. *Biopolymers* 68:223–233.

Hayat MA (2000) Principles and Techniques of Electron Microscopy, 4.ª ed. Cambridge: Cambridge University Press.

Heuser J (1981) Quick-freeze, deep-etch preparation of samples for 3D electron microscopy. *Trends Biochem Sci* 6:64–68.

Lippincott-Schwartz J & Patterson GH (2003) Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 300:87–91.

McIntosh R, Nicastro D & Mastronarde D (2005) New views of cells in 3D: an introduction to electron tomography. *Trends Cell Biol* 15:43–51.

McDonald KL & Auer M (2006) High pressure freezing, cellular tomography, and structural cell biology. *Biotechniques* 41:137–139.

Pease DC & Porter KR (1981) Electron microscopy and ultramicrotomy. *J Cell Biol* 91:287s–292s.

Unwin PNT & Henderson R (1975) Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystal specimens. *J Mol Biol* 94:425–440.

IV ORGANIZACIÓN INTERNA DE LA CÉLULA

Parte IV
Capítulos

10 Estructura de la membrana

11 Transporte de moléculas pequeñas a través de la membrana y las propiedades eléctricas de las membranas

12 Compartimientos intracelulares y clasificación de proteínas

13 Trafico vesicular intracelular

14 Conversión energética: mitocondrias y cloroplastos

15 Mecanismos de comunicación celular

16 El citoesqueleto

17 El ciclo celular

18 Apoptosis



Estructura de la membrana

10

En este capítulo

LA BICAPA LIPÍDICA 617

PROTEÍNAS DE MEMBRANA 629

Las membranas celulares son cruciales para la vida celular. La **membrana plasmática** envuelve la célula, definiendo sus límites y manteniendo las diferencias esenciales entre su contenido y el entorno. Dentro de la célula eucariota, las membranas del retículo endoplasmático, del complejo de Golgi, de las mitocondrias y de otros orgánulos delimitados por membrana mantienen las diferencias características entre el contenido de cada orgánulo y el citosol. Los gradientes iónicos que se establecen a través de las membranas, generados por la actividad de proteínas de membrana especializadas, pueden utilizarse para sintetizar ATP, dirigir el movimiento transmembrana de determinados solutos o, como en las células nerviosas y musculares, para producir y transmitir señales eléctricas. En todas las células, la membrana plasmática contiene también proteínas que actúan como sensores de señales externas, permitiendo que la célula cambie su comportamiento en respuesta a indicaciones ambientales, incluyendo señales procedentes de otras células; estas proteínas sensoras, o *receptores*, no transfieren moléculas a través de la membrana sino información.

A pesar de que tienen diferentes funciones, todas las membranas biológicas comparten una estructura básica común: una finísima capa de moléculas lipídicas y proteicas, que se mantienen unidas fundamentalmente por interacciones no-covalentes (**Figura 10–1**). Las membranas celulares son estructuras dinámicas, fluidas, y la mayoría de sus moléculas pueden desplazarse en el plano de la membrana. Las moléculas lipídicas están dispuestas en forma de una doble capa continua de aproximadamente 5 nm de grosor (Figura 10–1). Esta *bicapa lipídica* constituye la estructura básica de la membrana y actúa de barrera relativamente impermeable al paso de la mayoría de moléculas hidrosolubles. Las moléculas proteicas que atraviesan la bicapa lipídica (*proteínas transmembrana*, véase Figura 10–1) son responsables de la mayoría de las demás funciones de la membrana, por ejemplo transportando determinadas moléculas a través de ella o catalizando reacciones asociadas a membrana, como la síntesis de ATP. En la membrana plasmática algunas proteínas transmembrana actúan de eslabones estructurales que conectan el citoesqueleto, a través de la bicapa lipídica, con la matriz extracelular o con una célula adyacente. Otras proteínas actúan como receptores que reciben y transducen las señales químicas procedentes del entorno celular. Como podría esperarse, la célula precisa de numerosas proteínas de membrana para poder funcionar e interaccionar con su entorno. De hecho, se estima que el 30% de las proteínas codificadas por el genoma de una célula animal son proteínas de membrana.

En este capítulo, consideraremos la estructura y la organización de los dos constituyentes principales de las membranas biológicas: los lípidos y las proteínas. Si bien prestaremos especial atención a la membrana plasmática, muchos de los conceptos descritos también son aplicables a las membranas internas. Las funciones de las membranas celulares se considerarán en capítulos posteriores: su papel en la síntesis del ATP, por ejemplo, será descrito en el Capítulo 14; su papel en el transporte de pequeñas moléculas a través de las membranas, en el Capítulo 11, y su papel en la transmisión celular de señales y en la adhesión celular, en los Capítulos 15 y 19, respectivamente. En los Capítulos 12 y 13 se describirán las características de las membranas internas de la célula (endomembranas) y el transporte a través y entre ellas.

LA BICAPA LIPÍDICA

La **bicapa lipídica** proporciona la estructura básica de todas las membranas celulares. Es fácil de observar con el microscopio electrónico; su estructura se debe exclusivamente a las

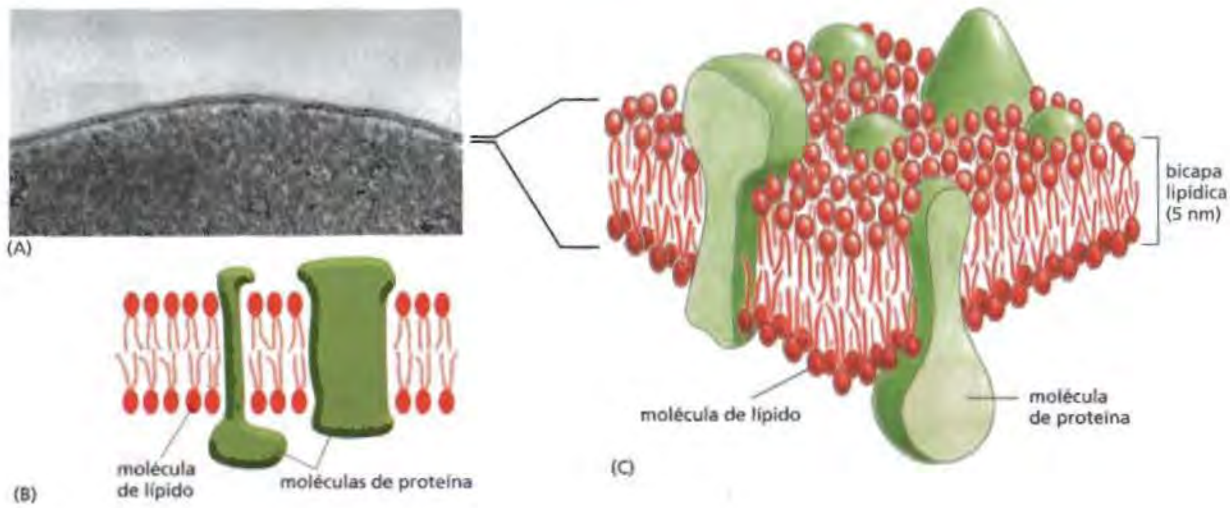


Figura 10–1 Tres visiones de una membrana celular. <TAGC> (A) Electromicrografía de una membrana plasmática (de un eritrocito humano) en sección transversal. (B y C) Estos dibujos esquemáticos muestran en dos y tres dimensiones la membrana celular y la disposición general de sus componentes lipídicos y proteicos. (A, cortesía de Daniel S. Friend.)

propiedades especiales de las moléculas lipídicas que la forman, que se ensamblan espontáneamente formando bicapas, incluso bajo condiciones artificiales sencillas.

Los fosfoglicéridos, los esfingolípidos y los esteroles son los principales lípidos de las membranas celulares

Las moléculas lipídicas constituyen aproximadamente el 50% de la masa de la mayoría de las membranas de las células animales y casi todo el resto es proteína. En una sección de bicapa lipídica de 1 μm × 1 μm hay unas 5×10^6 moléculas lipídicas, es decir, unas 10^9 moléculas lipídicas en la membrana plasmática de una célula animal pequeña. Todas las moléculas lipídicas de las membranas celulares son **anfifílicas,** es decir, tienen un extremo **hidrofílico** ("que se siente atraído por el agua") o *polar* y un extremo **hidrofóbico** ("que rehuye el agua") o *no polar*.

Los lípidos de membrana más abundantes son los **fosfolípidos**. Tienen una cabeza polar y dos *colas hidrocarbonadas* hidrofóbicas. En las células de los animales, de las plantas y de las bacterias las colas suelen ser ácidos grasos y pueden tener diferente longitud (por lo general contienen de 14 a 24 átomos de carbono). Una de las colas presenta típicamente uno o más dobles enlaces *cis* (es decir, es *insaturada*) mientras que la otra normalmente no tiene dobles enlaces (es decir, es *saturada*). Como se muestra en la **Figura 10–2**, cada doble enlace *cis* genera una suave curvatura en la cadena. Las diferencias de longitud y de grado de saturación entre las colas hidrocarbonadas son importantes porque afectan al modo en que se empaquetan las moléculas de fosfolípidos unas contra otras y determinan, por tanto, la fluidez de la membrana como veremos más adelante.

Los principales fosfolípidos de la mayoría de las membranas celulares son los **fosfoglicéridos**, que tienen como esqueleto el *glicerol*, que tiene tres átomos de carbono (véase la Figura 10–2). Dos ácidos grasos de cadena larga están unidos mediante enlaces éster a dos átomos de carbono adyacentes del glicerol; el tercer átomo de carbono está unido a un grupo fosfato el cual, a su vez, está unido a uno de entre varios tipos de grupos cabeza. Combinando diferentes ácidos grasos y grupos cabeza, la célula fabrica muchos fosfoglicéridos diferentes. En las membranas de las células animales, los principales son la *fosfatidiletanolamina*, la *fosfatidilserina* y la *fosfatidilcolina* (**Figura 10–3**A–C).

Otro fosfolípido importante, denominado *esfingomielina*, está formado a partir de *esfingosina* en lugar de glicerol (Figura 10–3D–E). La esfingosina es una larga cadena acilo con un grupo amino (NH_2) y dos grupos hidroxilo (OH) en un extremo de la molécula. En la esfingomielina, una cola de ácido graso está unida al grupo amino y un grupo fosfocolina está unido al grupo hidroxilo terminal, quedando por tanto un grupo hidroxilo libre. Este grupo hidroxilo libre contribuye a las propiedades polares del grupo cabeza adyacente, ya que puede formar enlaces de hidrógeno con el grupo cabeza de un lípido vecino, una molécula de agua o una proteína de membrana. En conjunto, los fosfolípidos fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y esfingomielina constituyen más de la mitad de la masa de lípidos de la membrana de la mayoría de células de mamífero (véase Tabla 10–1).

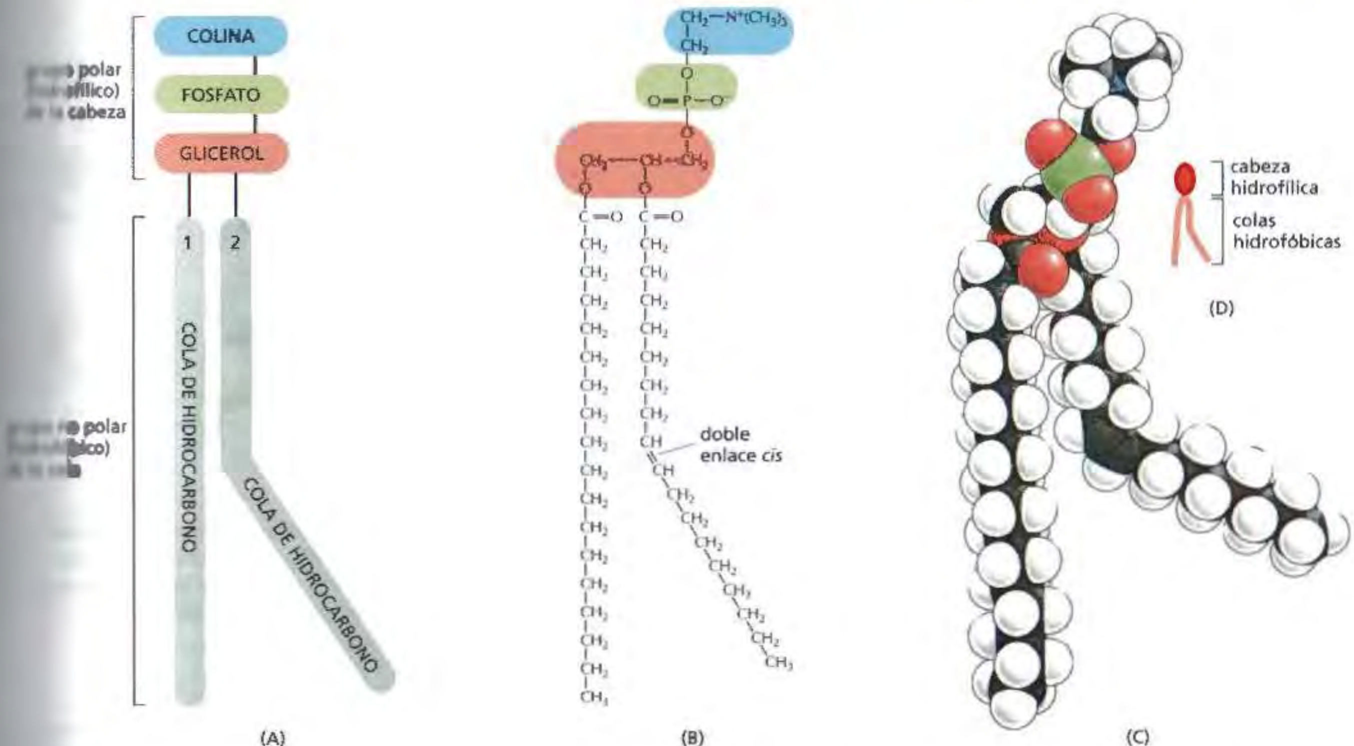


Figura 10–2 Partes que componen la molécula de un fosfoglicérido. La fosfatidilcolina representada (A) de forma esquemática, (B) como fórmula química, (C) modelo espacial compacto y (D) símbolo. La curva del doble enlace *cis* está exagerada para enfatizarlo.

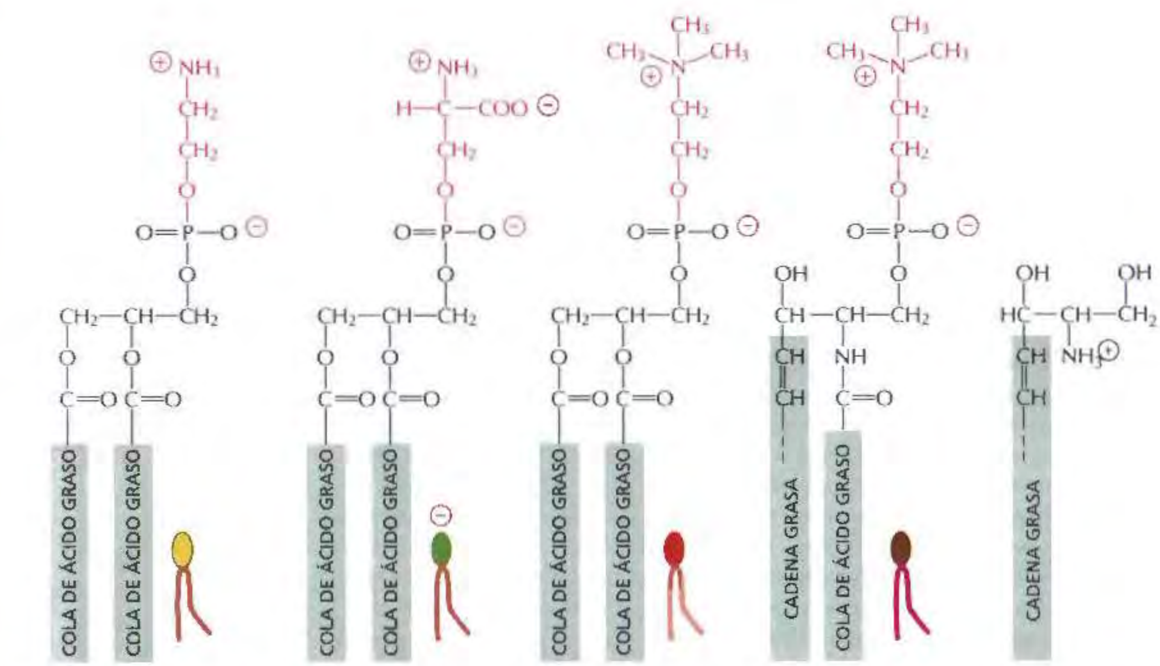


Figura 10–3 Cuatro de los principales fosfolípidos de las membranas plasmáticas de las células de mamífero. En los símbolos, los diferentes grupos de cabeza se representan mediante colores diferentes. Las moléculas lipídicas representadas en (A-C) son fosfoglicéridos que derivan del colesterol. La molécula en (D) es la esfingomielina, que deriva de la esfingosina (E) y, por tanto, es un esfingolípido. Obsérvese que sólo la fosfatidilserina lleva una carga neta negativa; de su importancia se tratará más adelante. Los otros tres son eléctricamente neutros a pH fisiológico y llevan una carga positiva y otra negativa.

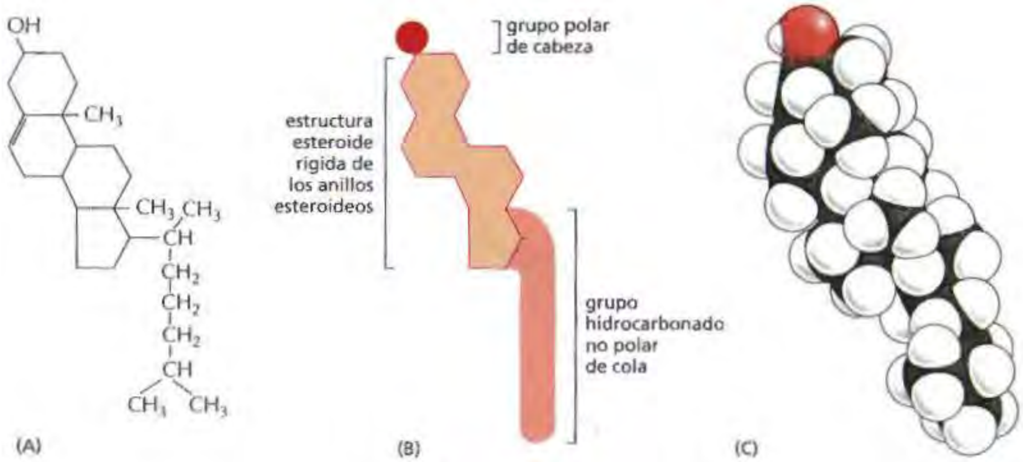


Figura 10–4 La estructura del colesterol. La molécula de colesterol representada mediante una fórmula (A), un esquema (B) y un modelo espacial compacto (C).

Además de los fosfolípidos, las bicapas lipídicas de muchas membranas celulares contienen *colesterol* y *glucolípidos*. Las membranas plasmáticas de eucariotas contienen cantidades especialmente elevadas de **colesterol** (**Figura 10–4**) –hasta una molécula por cada molécula de fosfolípido. El colesterol es un esterol. Contiene una estructura anular rígida a la que se encuentra unido un solo grupo hidroxilo polar y una corta cadena hidrocarbonada no-polar. Las moléculas de colesterol se orientan solas en la bicapa con su grupo hidroxilo cerca de los grupos polares de las moléculas adyacentes de fosfolípidos (**Figura 10–5**).

Los fosfolípidos forman bicapas de forma espontánea

La forma y la naturaleza anfifílica de las moléculas de fosfolípido hace que formen espontáneamente bicapas lipídicas en un entorno acuoso. Como se describe en el Capítulo 2, las moléculas hidrofílicas se disuelven con facilidad en agua, ya que contienen grupos cargados o grupos polares no cargados que les permiten establecer interacciones electrostáticas o enlaces de hidrógeno favorables con las moléculas de agua. Por el contrario, las moléculas hidrofóbicas son insolubles en agua, porque todos o casi todos sus átomos no presentan carga, son no polares, por lo que no pueden formar interacciones favorables energéticamente con las moléculas de agua. Si se dispersan en agua fuerzan a las moléculas de agua adyacentes a reorganizarse alrededor de las moléculas hidrofóbicas formando una especie de entramado similar al hielo (**Figura 10–6**). Dado que en estos entramados las moléculas de agua se encuentran más ordenadas que en el agua que las rodea, su formación incrementa la energía libre. Sin embargo, este coste de energía libre se reduce si las moléculas hidrofóbicas (o las porciones hidrofóbicas de las moléculas anfifílicas) se agregan entre sí, reduciendo al mínimo el número de moléculas de agua afectadas.

Las regiones hidrofóbicas e hidrofílicas de las moléculas lipídicas se comportan de esta misma forma. Así, las moléculas lipídicas se agregan espontáneamente de manera que sus colas hidrofóbicas hidrocarbonadas se escondan en el interior del agregado y sus cabezas hidrofílicas queden expuestas al agua. Dependiendo de cual sea su forma, pueden conseguir esta disposición de una de estas dos maneras: pueden formar *micelas* esféricas, con las colas hacia el interior, o pueden formar láminas de dos capas, o *bicapas*, con las colas hidrofóbicas escondidas entre dos capas de cabezas hidrofílicas (**Figura 10–7**).

Debido a su forma cilíndrica, en un entorno acuoso la mayoría de los fosfolípidos de membrana forman espontáneamente bicapas. En esta distribución más favorable desde un punto de vista energético, las cabezas hidrofílicas están en contacto con el agua en la superficie de la bicapa, y las colas hidrofóbicas están protegidas del agua en el interior de la estructura. Las mismas fuerzas que impulsan a los fosfolípidos a formar bicapas les confieren propiedades de autosellado. Una pequeña rotura de la bicapa crea un extremo libre en contacto con el agua; los lípidos tienden a reorganizarse de forma espontánea y eliminan este extremo libre energéticamente desfavorable. (En las membranas plasmáticas de las células eucariotas, los grandes "desgarrones" son reparados mediante la fusión de vesículas intracelulares.) El hecho de que no puedan existir extremos libres tiene una consecuencia muy importante: la única manera en que una bicapa puede evitar tener extremos libres es cerrándose sobre sí misma y formar un compartimiento sellado (**Figura 10–8**). Este notable

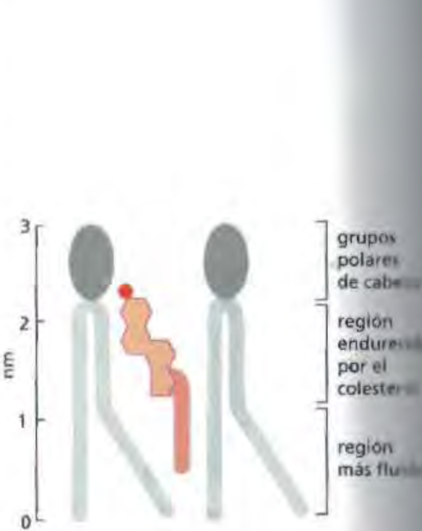


Figura 10–5 El colesterol en una bicapa lipídica. Dibujo esquemático de una molécula de colesterol interactuando con dos moléculas de fosfolípido en una de las monocapas de una bicapa lipídica.

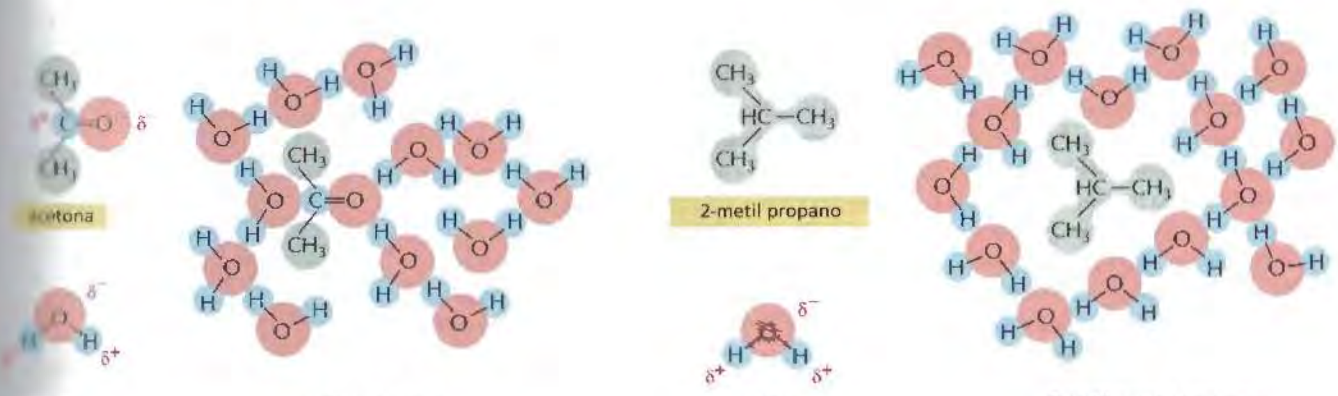


Figura 10–6 De qué forma interaccionan las moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas de manera diferente con el agua. (A) Dado que la acetona es polar, puede formar interacciones electrostáticas favorables con el agua, que también es polar. Así pues, la acetona se disuelve en agua. (B) Por el contrario, el 2-metil propano es por completo hidrofóbico. Puesto que no puede formar interacciones favorables con el agua, forzará a las moléculas de agua adyacentes a reorganizarse formando unos entramados parecidos a los del hielo, con el consiguiente incremento de la energía libre. Por lo tanto, este compuesto es casi insoluble en agua. El símbolo δ^- indica una carga negativa parcial y δ^+ indica una carga parcial positiva. Los átomos polares se muestran en color y los grupos no polares se muestran en *gris*.

comportamiento, que es fundamental para la creación de una célula viva, es una consecuencia directa de la forma y la naturaleza anfifílica de las moléculas de fosfolípido.

Además de esta propiedad de autosellado, las bicapas lipídicas tienen otras características que hacen de ellas una estructura ideal para constituir las membranas celulares. Una de las más importantes es su fluidez, que es crucial para muchas funciones de la membrana.

La bicapa lipídica es un fluido bidimensional

Hacia la década de 1970, los investigadores reconocieron por primera vez que las distintas moléculas lipídicas pueden difundir libremente dentro de las bicapas lipídicas. La demostración inicial procede de unos estudios sobre bicapas lipídicas sintéticas. En los estudios experimentales han resultado muy útiles dos tipos de preparaciones: (1) las bicapas producidas en forma de vesículas esféricas, denominadas **liposomas**, cuyo tamaño puede variar

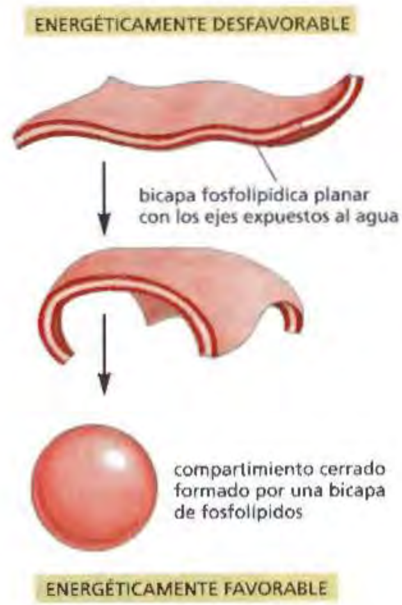


Figura 10–8 Sellado espontáneo de una bicapa fosfolipídica que forma un compartimiento cerrado. La estructura cerrada es estable porque evita la exposición al agua de las colas hidrocarbonadas hidrofóbicas, que podría ser energéticamente desfavorable.

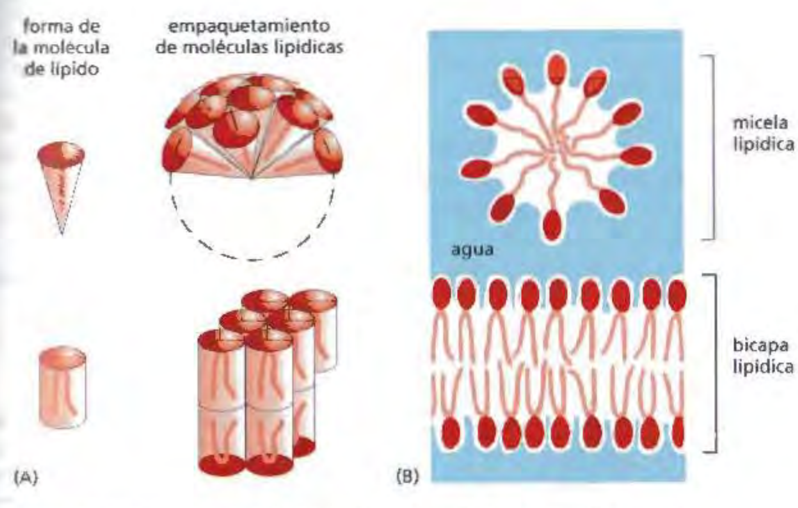


Figura 10–7 Empaquetamiento de moléculas lipídicas en un medio acuoso. (A) Las moléculas lipídicas en forma de cono (*arriba*) forman micelas, mientras que las moléculas de fosfolípidos en forma cilíndrica (*abajo*) forman bicapas. (B) Una micela lipídica y una bicapa lipídica vistas en sección lateral. Las moléculas de lípido forman, espontáneamente, estructuras como éstas en el agua, dependiendo de su forma.

de 25 nm a 1 mm de diámetro según cual sea el sistema de preparación (**Figura 10–9**), y (2) las bicapas planas, denominadas **membranas negras**, formadas a través de un agujero situado en una separación entre dos compartimientos acuosos (**Figura 10–10**).

Se han utilizado diversas técnicas para medir el desplazamiento de las moléculas lipídicas y de sus componentes. Por ejemplo, se puede construir una molécula lipídica con un colorante fluorescente o una pequeña partícula de oro unida a su grupo cabeza polar y seguir la difusión de cada molécula individual en una membrana. Otra opción es modificar un grupo cabeza para que contenga una "marca de espín", tal como un grupo nitroxilo (>N–O), que contiene un electrón desapareado cuyo espín genera una señal paramagnética que se puede medir mediante espectroscopia de resonancia de espín electrónico (ESR: *electron spin resonance*). (Los principios de esta técnica son similares a los de la resonancia magnética nuclear que se describe en el Capítulo 8.) Mediante el espectro ESR se puede medir el movimiento y la orientación de un lípido marcado dentro de una bicapa. Estos estudios demuestran que las moléculas de fosfolípidos de las bicapas artificiales raras veces migran de un lado a otro de la monocapa (también denominada una *hoja*). Este proceso, denominado "flip-flop", se produce menos de una vez al mes en cualquier molécula lipídica, aunque el colesterol es una excepción, ya que puede saltar por flip-flop rápidamente de una cara a otra de una bicapa. Por el contrario, las moléculas lipídicas intercambian con facilidad su lugar con el de las moléculas vecinas *dentro* de cada monocapa (~10^7 veces por segundo). Este fenómeno da lugar a una rápida difusión lateral, con un coeficiente de difusión (D) de aproximadamente 10^{-8} cm^2/segundo, lo cual significa que una molécula lipídica promedio difunde en la longitud de una gran célula bacteriana (~2 μm) en cerca de 1 segundo. Además, estos estudios indican que las moléculas lipídicas giran con gran rapidez alrededor de sus ejes longitudinales y que sus cadenas hidrocarbonadas son flexibles. Simulaciones por ordenador muestran que las moléculas lipídicas de las membranas están muy desordenadas presentando una superficie irregular formada por grupos de cabeza orientados y espaciados de forma variada hacia la fase acuosa a cada lado de la bicapa (**Figura 10–11**).

Estudios de movilidad similares con moléculas lipídicas marcadas en membranas biológicas aisladas y en células vivas han proporcionado resultados similares a los de las bicapas artificiales. Demuestran que el componente lipídico de las membranas biológicas es un líquido bidimensional en el que las moléculas que las constituyen son libres de desplazarse lateralmente. Como en las bicapas sintéticas, las moléculas de fosfolípido se hallan confinadas en su propia monocapa. Este confinamiento constituye un problema para su síntesis. Los fosfolípidos sólo son sintetizados en una de las monocapas de la membrana, la monocapa citosólica de la membrana del retículo endoplasmático. Si ninguna de estas moléculas recién sintetizadas pudiera migrar en un tiempo razonable hacia la monocapa no citosólica, no se podría construir más bicapa lipídica. Este problema se soluciona gracias a un tipo especial de enzimas transmembrana denominadas *translocasas de fosfolípidos*, que catalizan un rápido flip-flop de fosfolípidos desde la monocapa donde han sido sintetizados hasta la monocapa opuesta, como se describe en el Capítulo 12.

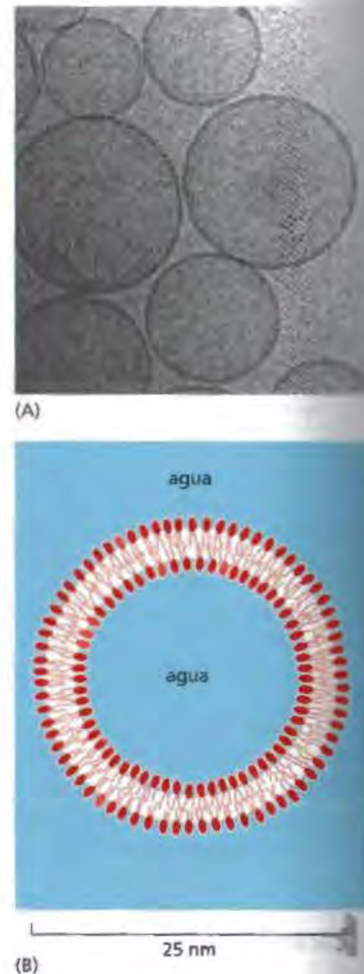


Figura 10–9 Liposomas.
(A) Electromicrografía de vesículas de fosfolípidos –liposomas– en agua, mediante congelación rápida a la temperatura del nitrógeno líquido.
(B) Dibujo de un pequeño liposoma esférico en sección transversal. Normalmente los liposomas se utilizan como modelo de membrana en estudios experimentales.
(A, de P. Frederik y W. Hubert, *Meth. Enzymol.* 391:431, 2005. Con la autorización de Elsevier.)

La fluidez de una bicapa lipídica depende de su composición

La fluidez de las membranas celulares tiene que ser regulada con precisión. Algunos procesos de transporte y algunas actividades enzimáticas, por ejemplo, pueden detenerse cuando la viscosidad de la bicapa se incrementa experimentalmente más allá de un nivel umbral.

La fluidez de una bicapa lipídica depende tanto de su composición como de su temperatura, como se ha demostrado por estudios en bicapas sintéticas. Una bicapa sintética, pro-

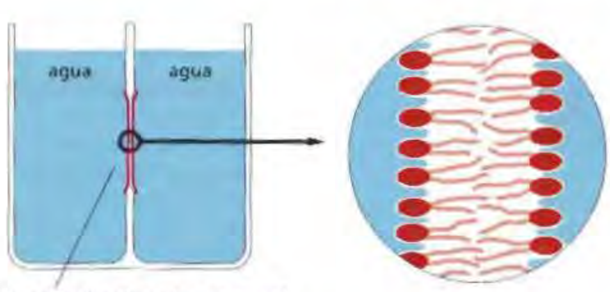


Figura 10–10 Representación en sección transversal de una membrana negra: una bicapa lipídica artificial. Esta bicapa plana aparece negra cuando se forma a través de un pequeño agujero en una pared que separa dos compartimientos acuosos. Las membranas negras se utilizan para medir las propiedades de permeabilidad de las membranas artificiales.

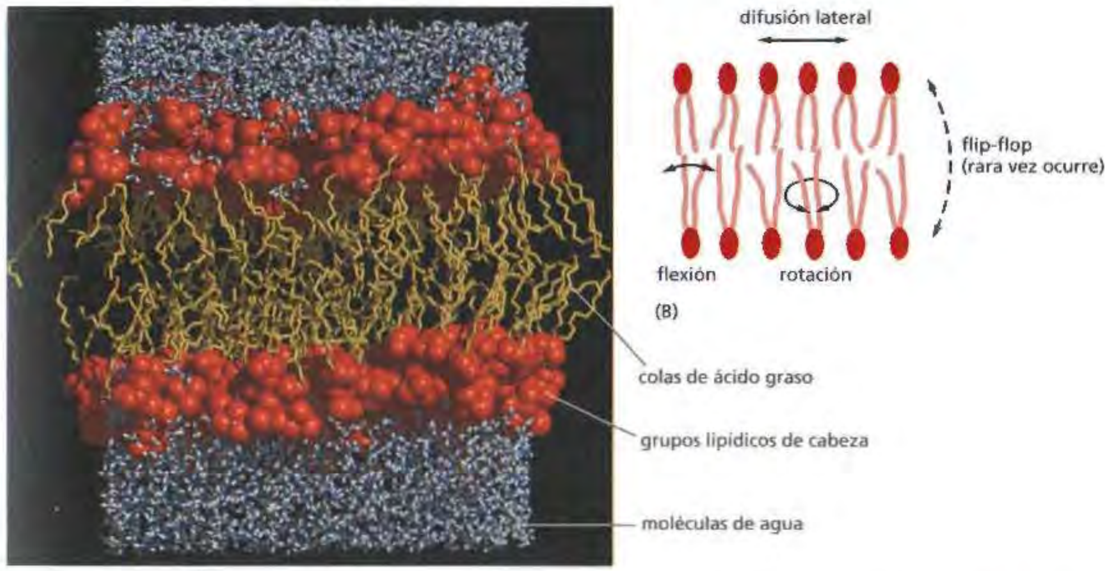


Figura 10–11 Movilidad de las moléculas de fosfolípidos en una bicapa lipídica artificial. <CACA> Empezando con un modelo de 100 moléculas de fosfatidilcolina ordenadas en una bicapa regular, un ordenador calculó las posiciones de cada átomo tras 300 picosegundos de tiempo simulado. A partir de estos cálculos teóricos (un trabajo que duró semanas en 1995), se formó un modelo de bicapa lipídica que tiene en cuenta casi todas las propiedades medibles de una bicapa lipídica sintética, tales como grosor, número de moléculas de lípido por área de membrana, profundidad de penetración del agua y diferencias entre las dos superficies. Obsérvese que si las colas en una monocapa son bastante largas, pueden interactuar con las de otra monocapa. (B) Los diferentes movimientos de una molécula de lípido en la bicapa. (A, basado en S.W. Chiu et al., *Biophys. J.* 69:1230-1245, 1995. Con la autorización de la Biophysical Society.)

...da a partir de un único tipo de fosfolípido, pasa de un estado líquido a un estado cristalino rígido (o gel) en un punto de congelación característico. Este cambio de estado recibe el nombre de *transición de fase*; la temperatura a la que se produce es más baja (es decir, la membrana resulta más difícil de congelar) si las cadenas hidrocarbonadas son cortas o tienen dobles enlaces *cis*. Una menor longitud de la cadena reduce la tendencia de las colas hidrocarbonadas a interaccionar entre sí, tanto entre fosfolípidos de la misma capa como de la capa opuesta, y los dobles enlaces *cis* producen pliegues en las cadenas hidrocarbonadas que dificultan su empaquetamiento, de forma que las membranas permanecen fluidas a temperaturas más bajas (**Figura 10–12**). Bacterias, levaduras y otros organismos cuyas temperaturas fluctúan con la de su entorno, controlan la composición de los ácidos grasos de sus lípidos de membrana manteniendo una fluidez relativamente constante. En caso de que la temperatura disminuya, las células de estos organismos sintetizan ácidos grasos con más dobles enlaces *cis*, de manera que evitan una pérdida de fluidez de la bicapa por efecto de la disminución de la temperatura.

El colesterol modula las propiedades de las bicapas lipídicas. Cuando se mezcla con fosfolípidos incrementa las propiedades de barrera permeable de la bicapa lipídica. Se inserta en la bicapa con su grupo hidroxilo próximo a las cabezas polares de las moléculas de fosfolípidos de forma que su anillo esteroideo, plano y rígido, interactúa con –y en parte inmoviliza– las regiones de las cadenas hidrocarbonadas que están más próximas a los grupos polares de la cabeza (véase Figura 10–5). El colesterol disminuye la movilidad de los prime-

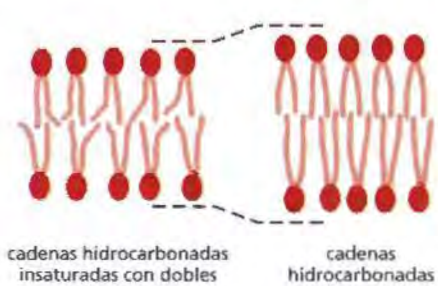


Figura 10–12 Influencia de la presencia de dobles enlaces *cis* en las cadenas hidrocarbonadas. La presencia de dobles enlaces hace más difícil el empaquetamiento de las cadenas, lo cual hace que la bicapa lipídica sea más difícil de congelar. Además, debido a que las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos no saturados están más separadas, las bicapas lipídicas que las contienen son más finas que las formadas exclusivamente por lípidos saturados.

Tabla 10–1 Composición lipídica aproximada de diferentes membranas celulares

	PORCENTAJE DEL LÍPIDO TOTAL EN PESO					
LÍPIDO	MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS HEPÁTICAS	MEMBRANA PLASMÁTICA DE ERITROCITOS	MIELINA	MITOCONDRIA (MEMBRANAS INTERNA Y EXTERNA)	RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO	BACTERIA *E. COLI*
Colesterol	17	23	22	3	6	0
Fosfatidil etanolamina	7	18	15	28	17	70
Fosfatidil serina	4	7	9	2	5	trazas
Fosfatidil colina	24	17	10	44	40	0
Esfingomielina	19	18	8	0	5	0
Glucolípidos	7	3	28	trazas	trazas	0
Otros	22	14	8	23	27	30

ros grupos CH_2 de las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas de fosfolípidos; este hecho provoca que la bicapa lipídica sea menos deformable en esa región y se reduzca su permeabilidad a pequeñas moléculas solubles en agua. A pesar de que el colesterol condensa el empaquetamiento de los lípidos de una bicapa, no hace que la membrana sea menos fluida. A las elevadas concentraciones a las que se presenta en la mayoría de las membranas plasmáticas de las células eucariotas, el colesterol también impide que las cadenas hidrocarbonadas se junten y cristalicen.

En la **Tabla 10–1** se compara la composición lipídica de distintas membranas biológicas. Obsérvese que a menudo las membranas plasmáticas bacterianas están compuestas principalmente por un único tipo de fosfolípido y no contienen colesterol; su estabilidad mecánica está asegurada por la pared celular que las recubre (véase Figura 11–18). En las arqueas, los lípidos contienen cadenas prenilo de 20-25 átomos de longitud en lugar de ácidos grasos. Las cadenas prenilo tienen una flexibilidad y unas características hidrofóbicas similares a las cadenas de ácidos grasos (véase la Figura 10–20F). Así, las bicapas lipídicas pueden estar formadas por diferentes diseños moleculares pero tener características similares. La composición de la membrana plasmática de la mayoría de las células eucariotas es más variada que la de los procariotas y las arqueas, ya que no sólo contienen grandes cantidades de colesterol, sino también una mezcla de diferentes fosfolípidos.

El análisis de las membranas lipídicas mediante espectrometría de masas ha revelado que la composición lipídica de una membrana celular típica es mucho más compleja de lo que inicialmente se había creído. De acuerdo con estos estudios, las membranas están compuestas por una extraordinaria variedad de especies lipídicas diferentes (entre 500 y 1000). Parte de esta complejidad refleja las variaciones combinatorias de grupos de cabeza, longitudes de cadenas hidrocarbonadas y grados de insaturación de las principales clases de fosfolípidos, pero las membranas también contienen muchos lípidos menos frecuentes y estructuralmente diferentes, al menos algunos de los cuales tienen funciones importantes. Por ejemplo, los *fosfolípidos de inositol* están presentes en cantidades pequeñas pero desempeñan funciones cruciales regulando el tráfico a través de la membrana y la señalización celular (se describe en los Capítulos 13 y 15, respectivamente). Su síntesis y destrucción locales están reguladas por un elevado número de enzimas, que dan lugar a pequeñas moléculas señal intracelulares y a lugares lipídicos de unión sobre las membranas que reclutan específicamente proteínas del citosol, como describiremos más adelante.

A pesar de su fluidez, las bicapas lipídicas pueden formar dominios de composición diferente

Dado que una bicapa lipídica es un fluido bidimensional, podríamos esperar que la mayoría de los diferentes tipos de moléculas lipídicas presentes en ella se encontraran distribuidas al azar, mezcladas unas con otras en cada monocapa. Las fuerzas de atracción de van der Waals entre las colas hidrocarbonadas adyacentes no son lo bastante selectivas para mantener unidos grupos de moléculas de fosfolípidos. Sin embargo, con ciertas mezclas lipídicas, diferentes moléculas lipídicas pueden permanecer juntas transitoriamente generando una mezcla dinámica de parches de diferentes dominio. En bicapas lipídicas sintéticas compuestas de fosfatidilcolina, esfingomielina y colesterol, las fuerzas de van der Waals entre las

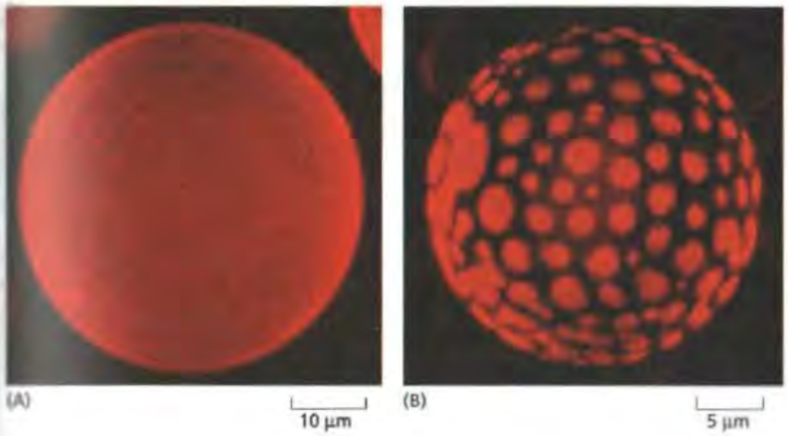


Figura 10–13 Separación de fase lateral en bicapas lipídicas artificiales. (A) Los liposomas gigantes producidos con una mezcla 1:1 de fosfatidilcolina y esfingomielina forman bicapas uniformes, mientras que (B) los liposomas producidos con una mezcla 1:1:1 de fosfatidilcolina, esfingomielina y colesterol forman bicapas con dos fases inmiscibles. Los liposomas están teñidos con concentraciones traza de colorante fluorescente que tiene preferencia por una de las fases. El tamaño medio de los dominios formados en este liposoma gigante artificial es bastante más grande de lo esperado en las membranas biológicas, donde las balsas pueden ser tan pequeñas como de un nanómetro de diámetro. (A, de N. Kahya et al., *J. Struct. Biol.* 147:77-89, 2004. Con la autorización de Elsevier; B, cortesía de Petra Schwille.)

cadenas hidrocarbonadas saturadas de las moléculas de esfingomielina podrían ser ...ante fuertes para mantener unidas de forma temporal a las moléculas adyacentes ...ura 10–13).

Se ha producido un largo debate entre científicos sobre si las moléculas lipídicas de la ...brana plasmática de las células animales pueden ensamblarse transitoriamente ...ndo dominios especializados, denominados **balsas lipídicas** (*lipid rafts*). Ciertas re... especializadas de la membrana plasmática como es el caso de las *caveolas* que parti... en la endocitosis (se discute en el Capítulo 13) están enriquecidas en esfingolípidos y ...terol y parece que las proteínas específicas que se ensamblan en ellos pueden ayudar a ...ilizar estas balsas. Dado que las cadenas hidrocarbonadas de los esfingolípidos son ...largas y más rectas que las de los otros lípidos de membrana, los dominios lipídicos ...más gruesos que otras zonas de la bicapa (véase la Figura 10–12) y pueden acomodar ... ciertas proteínas de membrana (**Figura 10–14**). Así, la segregación lateral de proteínas ...dos en dominios lipídicos o balsas podría ser, en principio, un proceso mutuamente es...zante. De esta forma, las balsas lipídicas facilitan la organización de las proteínas de ...brana concentrándolas para transportarlas en vesículas de membrana (se trata en el ...tulo 13), o para que trabajen juntas en ensamblajes proteicos, como cuando transfor... señales extracelulares en intracelulares (se trata en el Capítulo 15).

... gotas lipídicas están envueltas por una monocapa de fosfolípidos

...ayoría de las células almacenan su exceso de lípidos en **gotas lipídicas**, de donde se ...den recuperar como bloques de construcción para utilizarlos en la síntesis de membra-

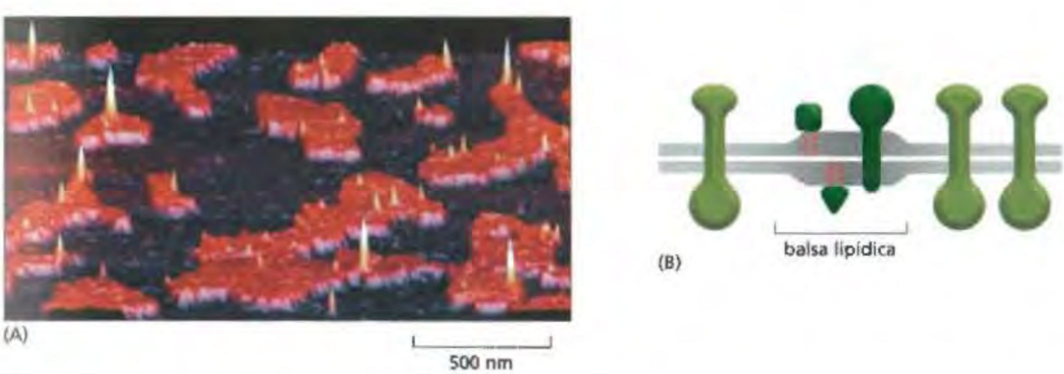


Figura 10–14 Efectos de las balsas lípidas en las bicapas lipídicas artificiales. (A) El contorno de la superficie de una bicapa que contiene balsas lipídicas analizado con el microscopio de fuerza atómicas. Obsérvese que las áreas de las balsas, mostradas en *naranja*, son más gruesas que el resto de la bicapa; como en la Figura 10–13, las balsas contienen sobre todo esfingomielina y colesterol. Las espículas amarillas son proteínas incorporadas, que se unen a la bicapa mediante un anclaje de glucosilfosfatidil-inositol (GPI: *glycosylphosphatidyl-inositol*) (ilustrado en el ejemplo 6 de la Figura 10–19) preferentemente a los dominios de las balsas. (B) Puesto que incrementan tanto el grosor como la composición de lípidos, se cree que las balsas concentran proteínas específicas de membrana (*verde oscuro*). (A, de D.E. Saslowsky et al., *J. Biol. Chem.* 277:26966-26970, 2002. Con la autorización de la American Society for Biochemistry and Molecular Biology.)

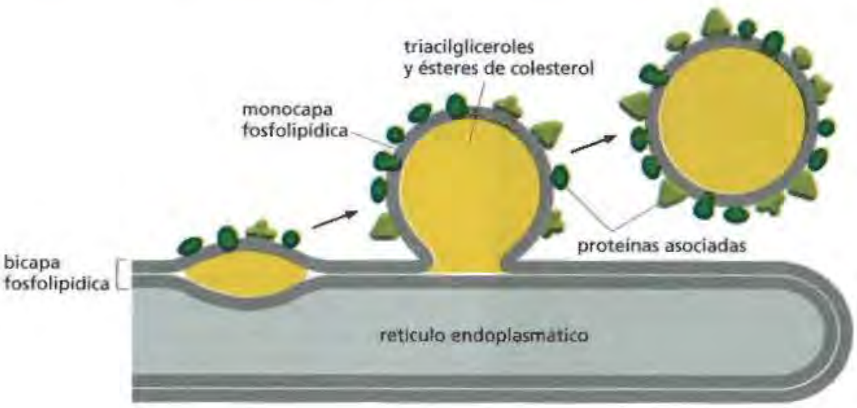


Figura 10–15 Modelo para la formación de gotas de lípido. Los lípidos neutros se depositan entre las dos monocapas de la membrana del retículo endoplasmático y se agregan formando una gota tridimensional que se separa de la membrana del retículo endoplasmático por gemación constituyendo como un orgánulo independiente rodeado por una monocapa de fosfolípidos y proteínas asociadas. (Adaptado de S. Martin y R.G. Parton, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:373-378, 2006. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

nas o como fuentes de energía. Las células adiposas, también denominadas adipocitos, están especializadas en el almacenamiento de lípidos (véase Figura 14–34). Contienen un elevado número de gotas lipídicas a partir de las cuales se pueden liberar ácidos grasos a demanda y ser exportados a otras células a través de la sangre. Las gotas lipídicas almacenan lípidos neutros, como son los triacilgliceroles y los ésteres de colesterol, sintetizados a partir de los ácidos grasos y colesterol por enzimas de la membrana del retículo endoplasmático. Dado que estos lípidos no contienen grupos hidrofílicos, son moléculas exclusivamente hidrofóbicas, que se agregan formando gotas tridimensionales en lugar de bicapas.

Las gotas lipídicas son orgánulos especiales por el hecho de que están envueltos por una sola monocapa de fosfolípidos que contiene una elevada variedad de proteínas. Algunas de estas proteínas son enzimas que participan en el metabolismo lipídico, pero la función de la mayoría de ellas es desconocida. Cuando las células se exponen a elevadas concentraciones de ácidos grasos se forman rápidamente estas gotas lipídicas, a partir de discretas regiones de la membrana del retículo endoplasmático donde se concentran muchas enzimas del metabolismo lipídico. En la **Figura 10–15** se muestra un modelo de cómo se pueden formar las gotas lipídicas y adquirir la monocapa que las envuelve de fosfolípidos y proteínas.

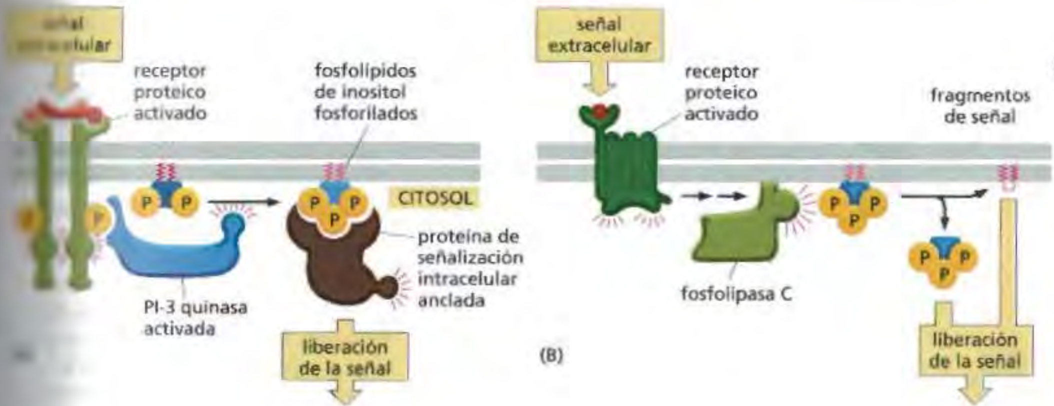
La asimetría de la bicapa lipídica es importante para su función

En muchas membranas, la composición lipídica de las dos monocapas de la bicapa lipídica es marcadamente diferente entre sí. Por ejemplo, en la membrana del glóbulo rojo humano en la monocapa exterior de la bicapa lipídica se encuentran la mayoría de las moléculas de fosfolípidos que tienen colina $-(CH_3)_3N^+CH_2CH_2OH-$ en su grupo de cabeza (fosfatidilcolina y esfingomielina) mientras que en la monocapa interior se encuentran la mayoría de las que contienen un grupo amino primario terminal (fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina) (**Figura 10–16**). Así, la fosfatidilserina, de carga negativa, está localizada en la monocapa interior, por lo que existe una importante diferencia de carga entre las dos mitades de la bicapa. En el Capítulo 12 se explica que los translocadores de fosfolípidos asociados a la membrana generan y mantienen la asimetría lipídica.

La asimetría de los lípidos es importante desde el punto de vista funcional, especialmente para transformar las señales extracelulares en señales intracelulares (se trata en el Capítulo 15). Muchas proteínas citosólicas se unen a un grupo de cabeza de un lípido determinado en la monocapa citosólica de la bicapa lipídica. Por ejemplo, la enzima *proteína quinasa C (PKC)* se activa como respuesta a varias señales extracelulares. Se une a la cara interna



Figura 10–16 Distribución asimétrica de los fosfolípidos y de los glucolípidos en la bicapa lipídica de los glóbulos rojos humanos. Los colores utilizados para los fosfolípidos son los mismos que en la Figura 10–3. Además, los glucolípidos se han dibujado con grupos de cabeza polar de forma hexagonal (*en azul*). Se cree que el colesterol (no se muestra) se distribuye casi a partes iguales en ambas monocapas.



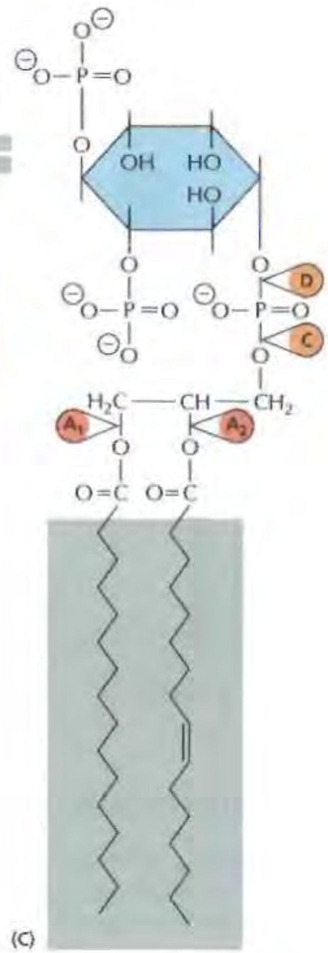


Figura 10–17 Dos funciones de señalización de los fosfolípidos de inositol en la cara citosólica de la membrana plasmática. (A) Algunas señales extracelulares activan la PI 3-quinasa, que fosforila fosfolípidos de inositol, generando lugares de anclaje para varias proteínas señalizadoras intracelulares. (B) Algunas señales extracelulares activan fosfolipasas que rompen fosfolípidos de inositol y crean fragmentos que ayudan a liberar la señal dentro de la célula. (C) Los lugares donde cortan las diferentes clases de fosfolipasas. En el esquema se representa la estructura del fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato. Las fosfolipasas C participan en la vía de señalización mostrada en (B).

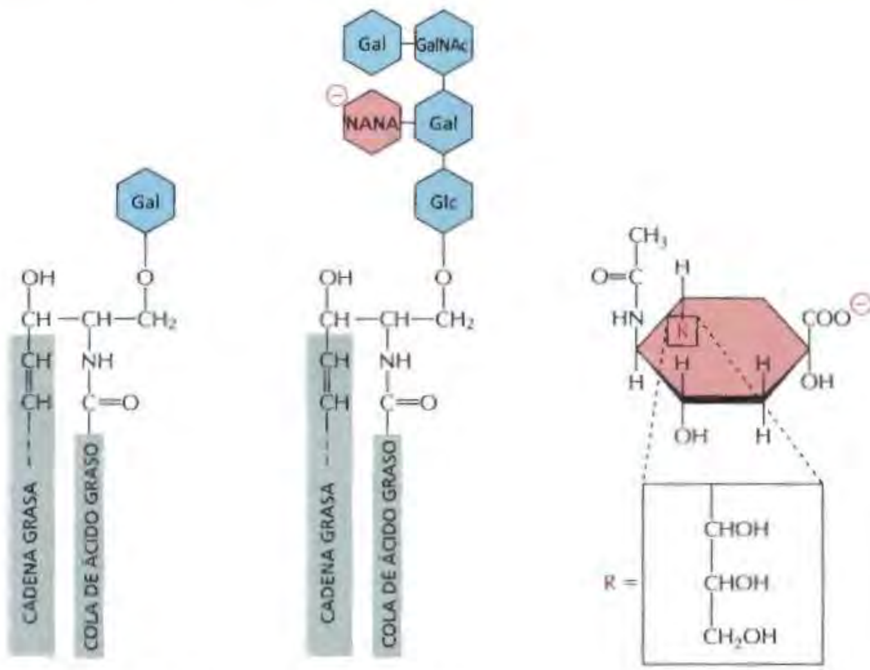
de la membrana plasmática donde se concentra la fosfatidilserina y, además, para ser activa necesita este fosfolípido cargado negativamente.

En otros casos, determinados grupos cabeza de fosfolípidos deben ser previamente modificados y generar lugares de unión a proteínas en ciertos momentos y lugares de la membrana. Por ejemplo, el *fosfatidilinositol* es un fosfolípido minoritario que se concentra en la monocapa citosólica de la membrana celular. Un variado grupo de quinasas de lípidos pueden añadir grupos fosfato en varias posiciones en el anillo inositol, generando sitios de unión que reclutan hacia la membrana determinadas proteínas del citosol. Un ejemplo importante de quinasa de lípidos es la *fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa)*, que se activa en respuesta a señales extracelulares y ayuda a reclutar, en la cara citosólica de la membrana plasmática, proteínas de señal intracelulares (**Figura 10–17**A). Otras quinasas de lípidos similares fosforilan fosfolípidos de inositol en las membranas intracelulares y facilitan la captura de proteínas implicadas en el transporte de membrana.

Los fosfolípidos de la membrana plasmática también actúan de otra manera transformando señales extracelulares en intracelulares. La membrana plasmática contiene varias *fosfolipasas*, que tras ser activadas por señales extracelulares, cortan específicamente ciertas moléculas de fosfolípidos, produciendo fragmentos que actúan como mediadores intracelulares de vida corta. Por ejemplo, la *fosfolipasa C*, corta un fosfolípido de inositol en la monocapa citosólica de la membrana plasmática y produce dos fragmentos, uno de los cuales permanece en la membrana plasmática favoreciendo la activación de la proteína quinasa C, mientras que el otro es liberado al citosol y estimula la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático (véase la Figura 10–17B–C).

Los animales aprovechan la asimetría de fosfolípidos de sus membranas para distinguir entre células vivas y muertas. Cuando las células animales sufren apoptosis (una forma de muerte celular programada, descrita en el Capítulo 18), la fosfatidilserina que por lo general está confinada en la monocapa citosólica de la bicapa lipídica, se transloca rápidamente a la monocapa extracelular. La fosfatidilserina expuesta en la superficie celular señaliza a las células vecinas, como los macrófagos, a fagocitar y digerir a la célula muerta. Parece que la translocación de la fosfatidilserina en las células apoptóticas ocurre por dos mecanismos:

1. Se inactiva el translocador de fosfolípidos que normalmente transporta este lípido de la monocapa no citosólica a la monocapa citosólica.
2. Se activa una enzima translocadora de fosfolípidos inespecífica (flipasa inespecífica o "escramblasa") que transfiere fosfolípidos al azar en ambas direcciones entre las dos monocapas.



(A) galactocerebrósido (B) gangliósido G_{M1} (C) ácido siálico (NANA)

Figura 10–18 Moléculas de glucolípidos (A) Los galactocerebrósidos se denominan *glucolípidos neutros* porque el azúcar que forma su grupo cabeza no está cargado. (B) Un gangliósido siempre contiene uno o más residuos de ácido siálico (también denominado ácido *N*-acetil neuramínico o NANA: ***N-acetylneuraminic acid***) cargado negativamente, cuya estructura se muestra en (C). En bacterias y en plantas casi todos los glucolípidos derivan del glicerol, como sucede en la mayoría de fosfolípidos, pero en las células animales casi siempre se basan en la esfingosina, como es el caso de la esfingomielina (véase Figura 10–3). Gal = galactosa; Glc = glucosa; GalNAc = *N*-acetil galactosamina; estos tres azúcares no están cargados.

En la superficie de todas las membrana plasmáticas hay glucolípidos

Las moléculas lipídicas que contienen azúcares, denominadas **glucolípidos**, son las que presentan mayor asimetría en cuanto a su distribución en las membranas celulares, ya que sólo se encuentran en la monocapa no citosólica de la bicapa lipídica. En las células animales se sintetizan a partir de esfingosina, exactamente igual que la esfingomielina. Estas fascinantes moléculas tienden a autoasociarse en parte mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre sus azúcares y en parte mediante fuerzas de van der Waals entre sus largas y rectas cadenas hidrocarbonadas, y preferentemente forman parte de balsas lipídicas. La distribución asimétrica de los glucolípidos en la bicapa es consecuencia de la adición de azúcares a las moléculas lipídicas en el lumen del complejo de Golgi. Así, el compartimiento en el que son sintetizadas es equivalente desde un punto de vista topológico al exterior celular (descrito en el Capítulo 12). Cuando son descargadas en la membrana plasmática, los grupos azúcar quedan expuestos a la superficie celular (véase Figura 10–16), donde ejercen funciones importantes en las interacciones de la célula con su entorno.

Los glucolípidos probablemente se presentan en las membranas plasmáticas de todas las células animales, constituyendo alrededor de un 5% de las moléculas lipídicas de la monocapa exterior. Además se encuentran en algunas membranas intracelulares. Los glucolípidos más complejos, los **gangliósidos**, contienen oligosacáridos con uno o más residuos de ácido siálico, lo que les proporciona una carga neta negativa (**Figura 10–18**). El más abundante de los más de 40 gangliósidos diferentes que se han identificado se encuentra en la membrana plasmática de las células nerviosas, donde constituyen cerca de un 5-10% de la masa lipídica total; también pueden encontrarse en cantidades mucho menores en otros tipos celulares.

Los indicios acerca de las funciones de los glucolípidos proceden de su localización. Por ejemplo, en la membrana plasmática de las células epiteliales, los glucolípidos se encuentran confinados en la superficie apical, donde podrían ayudar a proteger a la membrana de las condiciones adversas que con frecuencia existen allí (como pH bajo y elevadas concentraciones de enzimas degradativas). Los glucolípidos con carga, como los gangliósidos, pueden tener importancia debido a sus efectos eléctricos: su presencia alteraría el campo eléctrico a través de la membrana y la concentración de iones –especialmente Ca^{2+}– en la superficie de la membrana. Parece que los glucolípidos participan en los procesos de reconocimiento celular, en los que las proteínas de membrana de unión a carbohidratos (*lectinas*) se unen a los azúcares tanto de glucolípidos como de glucoproteínas, en el proceso de adhesión célula-célula (descrito en el Capítulo 19). Sin embargo, sorprendentemente, ratones

...antes deficientes en todos sus gangliósidos complejos no presentan anormalidades evi-...es, aunque se ha observado que los machos no pueden transportar de forma correcta la ...terona en los testículos, por lo que son estériles.

...ea cual sea su función normal, algunos glucolípidos son puntos de entrada de ciertas ...as bacterianas. Por ejemplo, el gangliósido G_{M1} (véase Figura 10–18) actúa como recep-... de superficie celular para la toxina bacteriana que causa la diarrea debilitante caracterís-... del cólera. La toxina colérica se une y penetra sólo en las células que tienen G_{M1} en su ...rficie, entre ellas las células epiteliales intestinales. Su entrada en la célula produce un ...ento prolongado en la concentración de AMP cíclico (descrito en el Capítulo 15), que, a ...z, provoca una gran salida de Na^+ y de agua al intestino

...sumen

...mbranas biológicas están formadas por una doble capa continua de moléculas lipídicas, en ... están inmersas las proteínas de membrana. Esta bicapa lipídica es fluida, de forma que las ...tas moléculas lipídicas pueden difundir rápidamente dentro de su propia monocapa. Las mo-... lipídicas de las membranas son anfifílicas. Cuando se colocan en agua, se agregan entre sí de ... espontánea formando bicapas, que se estructuran en compartimientos cerrados.

Las células contienen entre 500 y 1000 especies diferentes de lípidos. Existen tres clases princi-... de lípidos de membrana –los fosfolípidos, el colesterol y los glucolípidos– y centenares de clases ... abundantes. Las composiciones lipídicas de las monocapas externa e interna son diferentes ...jan las diferentes funciones de las dos caras de la membrana celular. Las membranas de ...ntes tipos celulares, y también las de un mismo tipo celular, presentan diferentes mezclas de lí-... Los fosfolípidos de inositol son una clase minoritaria de fosfolípidos que están en la cara cito-... de la membrana plasmática, donde desempeñan un papel importante en el proceso de ...ación celular: en respuesta a señales extracelulares determinadas quinasas lipídicas fosfori-... los grupos cabeza de estos lípidos y generan lugares de unión para proteínas señalizadoras ...ras que fosfolipasas específicas rompen ciertos fosfolípidos de inositol y generan pequeñas mo-... señal intracelulares.

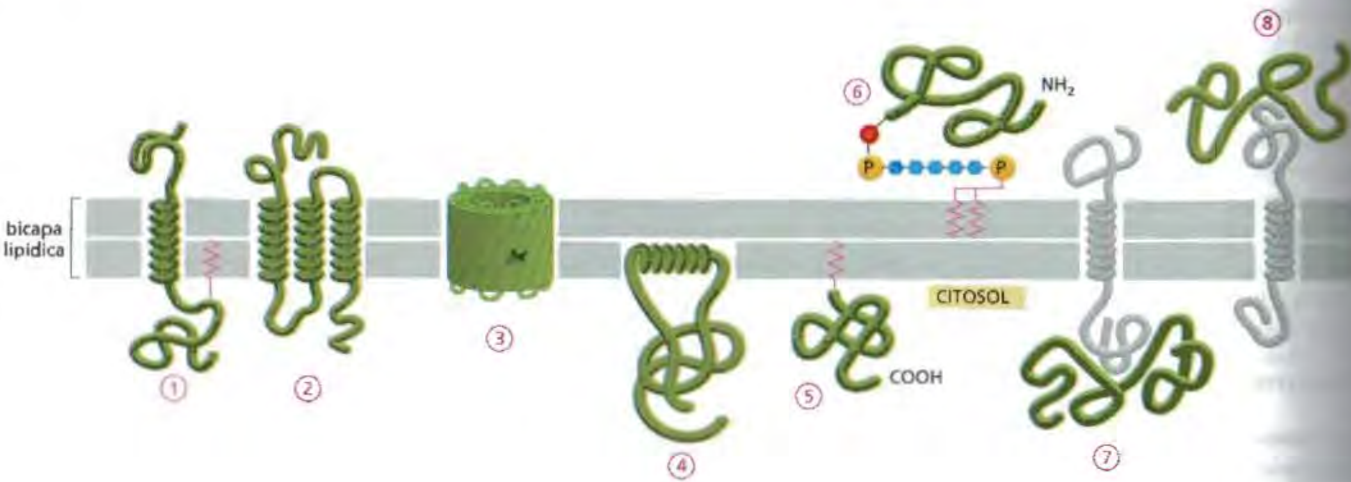
PROTEÍNAS DE MEMBRANA

...que la estructura básica de las membranas biológicas está determinada por la bicapa li-..., la mayoría de sus funciones específicas están desempeñadas por proteínas. Así pues, ... las proteínas las que confieren a cada uno de los tipos de membrana celular sus propie-... funcionales características. De acuerdo con este hecho, la cantidad y el tipo de pro-... de una membrana son muy variables. En la vaina de mielina, cuya función principal ...te en aislar los axones nerviosos, la proteína constituye menos de un 25% de la masa ... membrana. Por el contrario, en las membranas implicadas en la producción de ATP ... como las membranas internas de las mitocondrias y de los cloroplastos) aproximada-... un 75% de su masa es proteína. Una membrana plasmática normal está situada entre ... extremos, siendo las proteínas cerca de la mitad de su masa.

Debido a que las moléculas lipídicas son pequeñas en comparación con las proteicas, ... las membranas celulares hay más moléculas lipídicas que proteicas –una membra-... que contenga un 50% de proteína en masa tiene una proporción aproximada de 50 mo-... de lípidos por cada molécula de proteína. Las proteínas de membrana son muy ...bles en cuanto a estructura y en cuanto a la manera en la que se asocian con la bicapa ...ca, lo cual refleja la variedad de sus funciones.

... proteínas de membrana se asocian a la bicapa lipídica ... varias maneras

... la **Figura 10–19** se muestran las diferentes formas de asociación de las proteínas a las ...branas. Muchas proteínas de membrana atraviesan la bicapa lipídica, de forma que ... de su masa se sitúa a cada lado de la membrana (ejemplos 1, 2 y 3 de la Figura 10–19). ... sus vecinas lipídicas, estas **proteínas transmembrana** son anfifílicas, ya que tienen ...es que son hidrofóbicas y regiones hidrofílicas. Las regiones hidrofóbicas se sitúan en ...rior de la membrana y se relacionan con las colas hidrofóbicas de las moléculas lipídi-



cas del interior de la bicapa, donde quedan protegidas del agua. Las regiones hidrofílicas se hallan expuestas al medio acuoso de ambos lados de la membrana. La unión covalente de una cadena de ácido graso que se encuentra insertada en la mitad citosólica de la bicapa incrementa la hidrofobicidad de algunas de estas proteínas transmembrana (véase el ejemplo 1 de la Figura 10–19).

Otras proteínas de membrana se localizan por completo en el citosol y se asocian con la monocapa citosólica de la bicapa lipídica mediante una hélice α anfifílica expuesta en la superficie de la proteína (véase el ejemplo 4 de la Figura 10–19) o a través de una o más cadenas lipídicas a las que están unidas covalentemente, que pueden ser ácidos grasos o *grupos prenilo* (ejemplo 5). Existen otras proteínas completamente expuestas en la superficie celular externa, ancladas a la bicapa por medio de una unión covalente (vía un oligosacárido específico) al fosfatidilinositol de la monocapa lipídica externa de la membrana plasmática (véase el ejemplo 6 de la Figura 10–19).

Las proteínas unidas a lípidos del ejemplo 5 de la Figura 10–19 se han generado como proteínas solubles en el citosol y posteriormente se han anclado a la membrana, uniéndose de forma covalente a un grupo lipídico. Sin embargo, las proteínas del ejemplo 6 se sintetizan como proteínas transmembrana de "paso único" en el retículo endoplasmático (ER). Mientras permanecen en el ER, el segmento transmembrana de la proteína se escinde y se le añade un **glucosilfosfatidilinositol (GPI) de anclaje**; la proteína queda unida a la superficie no citosólica de la membrana sólo por medio de este anclaje (se trata en el Capítulo 12). Finalmente, las vesículas de transporte descargan la proteína en la membrana plasmática (se trata en el Capítulo 13). Las proteínas que se unen a la membrana a través de un GPI de anclaje, se distinguen fácilmente utilizando una enzima denominada fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol. Esta enzima separa de forma específica estas proteínas de sus anclajes, liberándolas así de la membrana.

Algunas proteínas de membrana que no atraviesan en su totalidad el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica están unidas a una u otra cara de la membrana mediante interacciones no-covalentes con otras proteínas de membrana (véanse los ejemplos 7 y 8 de la Figura 10–19). Muchas de las proteínas de este tipo pueden ser liberadas de la membrana mediante procedimientos de extracción suaves, como la exposición a soluciones de muy alta o baja fuerza iónica o de un pH extremo, que interfieren con las interacciones proteicas pero mantienen intacta la bicapa lipídica. A estas proteínas se les denomina **proteínas periféricas de membrana**. Por el contrario, las proteínas transmembrana y muchas proteínas unidas a la bicapa por cadenas de ácidos grasos o por regiones polipeptídicas hidrofóbicas que se insertan en el corazón hidrofóbico de la bicapa lipídica no pueden ser liberadas por estos métodos, por lo que se les denomina **proteínas integrales de membrana.**

Figura 10–19 Varios sistemas de asociación de las proteínas con la membrana lipídica. Se cree que la mayoría de las proteínas transmembrana atraviesan la bicapa como (1) una sola hélice α, (2) en forma de varias hélices α o (3) en forma de una lámina β enrollada (un barril β). Algunas de estas proteínas de "paso único" y de "paso múltiple" están unidas covalentemente a cadenas de ácidos grasos insertados en la monocapa citoplasmática (1). Otras proteínas de membrana sólo están expuestas a un lado de la membrana. (4) Algunas de ellas se unen a la superficie citosólica mediante una hélice α anfifílica que se une a la monocapa citosólica a través de la superficie hidrofóbica de la hélice α. (5) Otras se encuentran unidas a la bicapa únicamente a través de su unión covalente a una cadena de lípido –a una cadena de ácido graso o a un grupo prenilo (véase la Figura 10–20)– de la monocapa citosólica o, (6) a través de una unión mediante un oligosacárido, a un fosfatidil-inositol en la monocapa no-citosólica denominado anclaje GPI. (7, 8) Finalmente, muchas proteínas están unidas a la membrana tan sólo mediante interacciones no-covalentes con otras proteínas de membrana. En la Figura 10–20 se ilustra cómo se forma la estructura de (5), mientras que en la Figura 12–56 se ilustra cómo se forma el anclaje GPI que se muestra en (6). Los detalles de cómo se asocian las proteínas de membrana con la bicapa lipídica, se describen en el Capítulo 12.

Los anclajes lipídicos controlan la localización en la membrana de algunas proteínas señalizadoras

Por lo general, la manera en que una proteína de membrana se asocia a la bicapa lipídica indica su función. Así, sólo las proteínas transmembrana pueden actuar en ambos lados de la

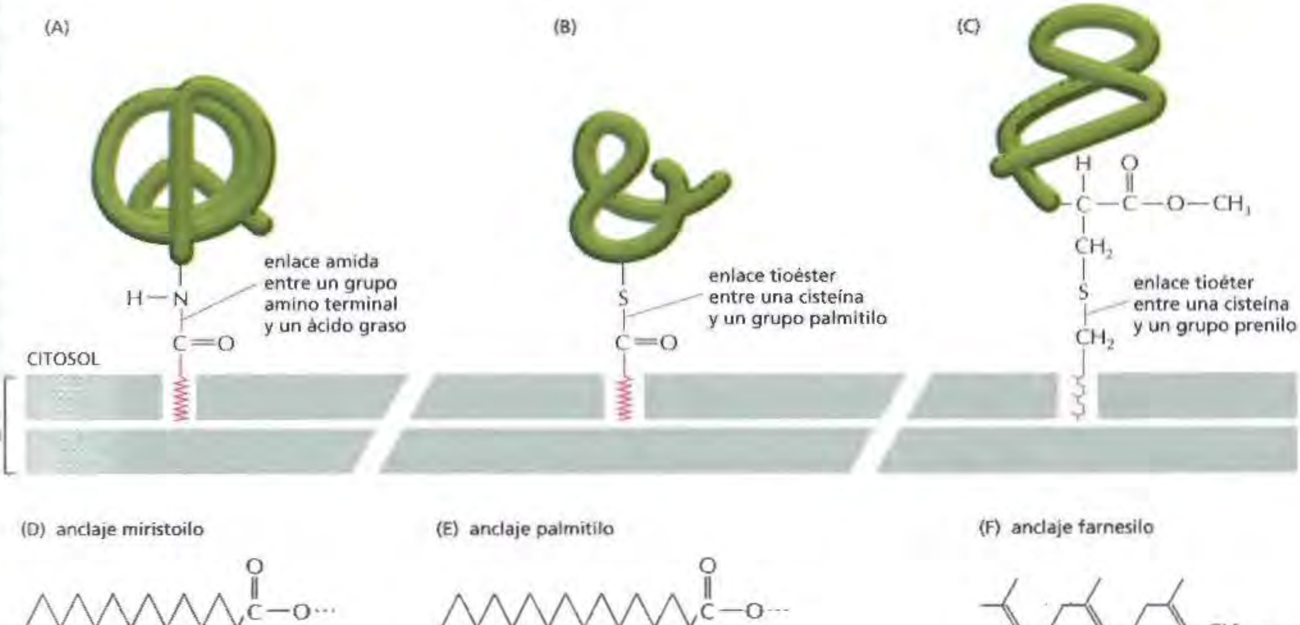
bicapa o transportar moléculas a través de ella. Por ejemplo, algunos receptores celulares de superficie son proteínas transmembrana que se unen a las moléculas señal en el espacio extracelular y generan diferentes señales intracelulares en el lado opuesto de la membrana plasmática. Para transferir pequeñas moléculas hidrofílicas a través de la membrana, una proteína de transporte puede proporcionar un camino para que la molécula atraviese la barrera de la bicapa lipídica; la arquitectura molecular de las proteínas multipaso a través de la membrana resulta ideal para conseguir esta función, como describiremos en el Capítulo 11.

Por el contrario, las proteínas que sólo actúan en un lado de la bicapa lipídica generalmente están asociadas a la monocapa lipídica o al dominio proteico de aquel lado de la membrana. Por ejemplo, algunas de las proteínas relacionadas con la señalización intracelular, que participan en la transformación de señales extracelulares en señales intracelulares, están unidas a la cara citosólica de la membrana plasmática por uno o más grupos lipídicos a los que están unidos de forma covalente. Estos grupos pueden ser ácidos grasos o *grupos prenilo* (**Figura 10–20**). En algunos casos, el ácido mirístico, un ácido graso saturado de 14 carbonos, se añade al grupo amino terminal de la proteína durante su síntesis en el ribosoma. Todos los miembros de la *familia Src* de las proteínas tirosina quinasa citoplasmáticas (se describe en el Capítulo 15) están miristoiladas de esta forma. Sin embargo, la unión a la membrana a través de un solo anclaje lipídico no es muy fuerte y, a menudo, se añade un segundo grupo lipídico para anclar las proteínas con más firmeza a la membrana. En el caso de la mayoría de las quinasas Src, la segunda modificación lipídica consiste en la unión de ácido palmítico, un ácido graso saturado de 16 carbonos, a la cadena lateral de una cisteína de la proteína. Esta modificación ocurre en respuesta a una señal extracelular y ayuda a reclutar las quinasas hacia la membrana plasmática. Cuando la vía señalizadora se apaga, el ácido palmítico es eliminado de la proteína y la quinasa vuelve al citosol. Otras proteínas señalizadoras intracelulares, como las pequeñas GTPasas de la familia Raf (se trata en el Capítulo 15) utilizan una combinación de unión a grupo prenilo y a ácido palmítico para reclutar las proteínas en la membrana plasmática.

En la mayoría de las proteínas transmembrana, las regiones de la cadena polipeptídica que atraviesan la bicapa lipídica presentan una conformación en hélice α

Una proteína transmembrana se orienta siempre en un único sentido dentro de la membrana. Este hecho refleja tanto la asimetría del sistema mediante el cual la proteína ha sido insertada en la bicapa lipídica en el ER durante su biosíntesis (se explica en el Capítulo 12), como la diferencia entre las funciones que desempeñan los dominios citoplasmático y no

Figura 10–20 Anclaje de una proteína de membrana mediante una cadena de ácido graso o un grupo prenilo. La unión covalente de cualquiera de los dos tipos de grupos lipídicos puede ayudar a situar una proteína soluble dentro de una membrana después de su síntesis en el citosol. (A) Una cadena de ácido graso (ácido mirístico) se une a un grupo amino terminal de una glicina por medio de un enlace amida. (B) Una cadena de ácido graso (ácido palmítico) se une a una cisteína mediante un enlace tioéster. (C) Un grupo prenilo (farnesilo o geranilgeranilo, más largo) se halla unido, mediante un enlace tioéter, a un residuo cisteína situado inicialmente a cuatro residuos del extremo C. Tras la prenilación, los tres aminoácidos terminales son separados de la cadena y el nuevo extremo C se metila antes de la inserción del anclaje en la membrana (no se muestra). En la parte inferior se muestran las estructuras de los anclajes lipídicos: (D) un anclaje miristoilo (una cadena de ácido graso saturado de 14 carbonos), (E) un anclaje palmitilo (una cadena de ácido graso saturado de 16 carbonos) y (F) un anclaje farnesilo (una cadena de ácido graso insaturado de 15 carbonos).



citoplasmático de la proteína. Estos dominios están separados por segmentos de la cadena polipeptídica que atraviesan la membrana, se hallan en contacto con el ambiente hidrofóbico de la bicapa lipídica y están formados, en gran parte, por aminoácidos de cadena lateral no polar. Debido a que las uniones peptídicas son, en sí mismas, polares y dado que el agua no está presente en este ambiente, todas las uniones peptídicas pertenecientes a la porción de la cadena embebida en la bicapa tienden a formar puentes de hidrógeno entre sí. El número de este tipo de uniones se maximiza si la cadena polipeptídica forma una hélice α regular al cruzar la bicapa; en efecto, así es como la mayoría de los segmentos transmembrana de las cadenas polipeptídicas atraviesan la membrana (**Figura 10–21**).

En las **proteínas transmembrana de paso único**, la cadena polipeptídica cruza una sola vez (véase el ejemplo 1 de la Figura 10–19), mientras que en las **proteínas transmembrana de paso múltiple,** la cadena polipeptídica cruza múltiples veces la bicapa (véase el ejemplo 2 de la Figura 10–19). Una manera alternativa de que las uniones peptídicas puedan satisfacer sus requerimientos de enlaces de hidrógeno es que las múltiples hebras transmembrana de la cadena polipeptídica se dispongan en láminas β enrolladas formando un "barril cerrado" (denominado por ello, *barril β;* véase el ejemplo 3 de la Figura 10–19). Esta estructura de paso múltiple transmembrana se observa en las *porinas*, de las que trataremos más adelante.



Figura 10–21 Segmento de una cadena polipeptídica que atraviesa la bicapa lipídica en forma de hélice α. <GTAG> En la figura sólo se ha dibujado el esqueleto del carbono α de la cadena polipeptídica, con los aminoácidos hidrofóbicos en *verde* y *amarillo*. El segmento polipeptídico que se muestra en la figura es una parte del centro de reacción fotosintético bacteriano que se ilustra en la Figura 10–34, cuya estructura fue determinada por análisis de difracción de rayos X. (Basado en datos de J. Deisenhofer et al., *Nature* 318:618-624, 1985, y H. Michel et al., *EMBO J.* 5:1149-1158, 1986. Todo con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

Un rápido progreso en el estudio por cristalografía de rayos X de las proteínas de membrana ha permitido observar las estructuras tridimensionales de muchas de ellas. Las estructuras confirman que a menudo resulta posible a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína predecir qué partes de la cadena polipeptídica atraviesan la bicapa lipídica. Los segmentos que contienen cerca de 20-30 aminoácidos, con un alto grado de hidrofobicidad, son suficientemente largos para atravesar la membrana formando una hélice α y a menudo pueden ser identificados en un *gráfico de hidropatía* (**Figura 10–22**). A partir de este tipo de gráficos se sabe que cerca del 20% de las proteínas de un organismo son proteínas transmembrana, lo cual subraya su importancia. Los gráficos de hidropatía no permiten identificar los segmentos transmembrana de un barril β, ya que 10 residuos o menos son suficientes para atravesar una bicapa lipídica a modo de una hebra β extendida y sólo uno de cada dos aminoácidos debe ser hidrofóbico.

El impulso potente que significa aumentar al máximo posible el número de enlaces de hidrógenos en ausencia de agua significa que es fácil que una cadena polipeptídica que entra en la bicapa la atraviese por completo antes de cambiar de dirección, ya que al doblarse la cadena se produce una pérdida del número de interacciones regulares de enlaces de hidrógeno. Sin embargo, las proteínas multipaso también pueden tener regiones que se pliegan dentro de la membrana por cada lado apretándose en los espacios entre las hélices α transmembrana sin entrar en contacto con el núcleo hidrofóbico de la bicapa lipídica. Dado que estas regiones de cadena polipeptídica interaccionan con otras regiones polipeptídicas, no deben aumentar al máximo la formación de enlaces de hidrógeno, por lo que pueden presentar una gran variedad de estructuras secundarias, incluyendo hélices α que en parte se extienden a través de la bicapa lipídica (**Figura 10–23**). Estas regiones son importantes para la función de algunas proteínas de membrana, incluyendo los canales de K^+ y de agua; las regiones contribuyen a formar las paredes de los poros que atraviesan la membrana y confieren la especificidad de sustrato de los canales, como se explicará en el Capítulo 11. Estas regiones no pueden ser identificadas en gráficos de hidropatía y sólo se pueden revelar mediante cristalografía de rayos X, difracción electrónica (una técnica similar a la difracción de rayos X, pero realizada sobre distribuciones bidimensionales de proteínas) o estudios NMR de las estructuras tridimensionales características de las proteínas.

A menudo las hélices α transmembrana interactúan entre sí

Las hélices α transmembrana de muchas proteínas de un solo paso no contribuyen al plegamiento de los dominios de la proteína a cada lado de la membrana. Como consecuencia de ello, a menudo es posible modificar de forma artificial a las células para conseguir que produzcan los dominios citosólico o extracelular de estas proteínas en forma de proteína soluble en agua. Esta proteína no ha servido para estudiar la estructura y la función de estos dominios, especialmente en el caso de las proteínas receptoras transmembrana (se describe en el Capítulo 15). Sin embargo, una hélice α transmembrana, incluso en una proteína de un solo paso, no hace más que anclar la proteína en la bicapa lipídica. Muchas proteínas de un solo paso a través de membrana forman homodímeros, que se mantienen unidos me-

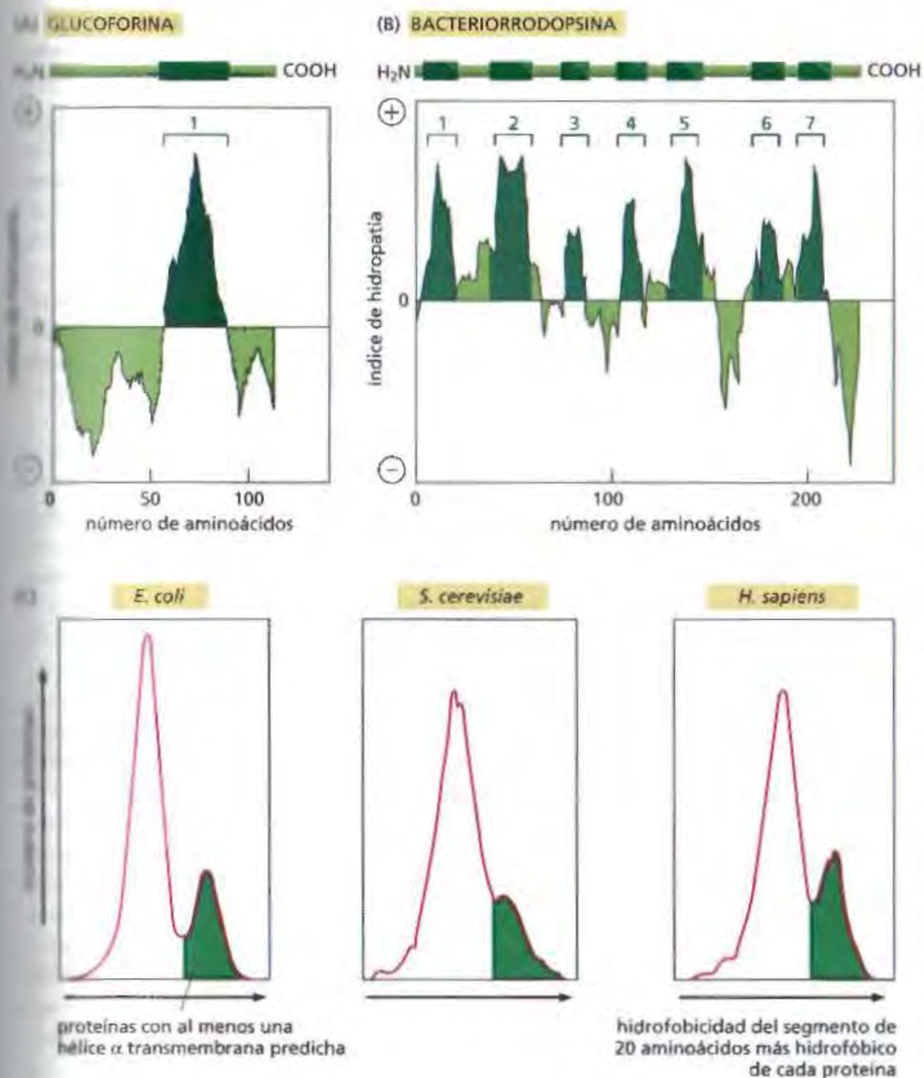


Figura 10–22 Utilización de gráficos de hidropatía para localizar, en una cadena polipeptídica, potenciales segmentos de hélice α que atraviesan la membrana. La energía libre necesaria para transferir segmentos sucesivos de una cadena polipeptídica de un solvente no polar al agua se calcula a partir de la composición de aminoácidos de cada segmento, utilizando los datos obtenidos a partir de compuestos modelo. Estos cálculos se realizan para segmentos de un tamaño fijo (por lo general, alrededor de 10-20 aminoácidos), comenzando con cada aminoácido sucesivo de la cadena. El "índice de hidropatía" del segmento se esquematiza en el eje Y como función de su localización en la cadena. Un valor positivo indica que se necesita energía libre para la transferencia hacia el agua (es decir, que el segmento es hidrofóbico) y el valor asignado es un índice de la cantidad de energía que se necesita. Los picos del índice de hidropatía aparecen en la posición de los segmentos hidrofóbicos de la secuencia de aminoácidos. (A y B) Se ilustran dos ejemplos de las proteínas de membrana que se tratan posteriormente en este capítulo. La glucoforina (A) tiene un único segmento que atraviesa la membrana en hélice α y un pico correspondiente en el test de hidropatía. La bacteriorrodopsina (B) tiene siete segmentos que atraviesan la membrana en forma de hélice α y siete picos correspondientes en el gráfico de hidropatía. (C) Proporción de proteínas de membrana predichas codificadas por los genomas de *E. coli*, *S. cerevisiae* y en humanos. El área sombreada en *verde* indica la fracción de proteínas que contienen al menos una hélice transmembrana predicha. Los datos para *E. coli* y *S. cerevisiae* representan el genoma completo; los datos para humanos representan sólo una parte del genoma; en cada caso el área bajo la curva es proporcional al número de genes analizados (A, adaptado de D. Eisenberg, *Annu. Rev. Biochem.* 53:595-624, 1984. Con la autorización de Annual Reviews; C, adaptado de D. Boyd et al, *Protein Sci.* 7:201-205, 1998. Con la autorización de The Protein Society.)

...nte fuertes interacciones específicas entre las dos hélices α transmembrana; la secuencia de los aminoácidos hidrofóbicos de estas hélices contienen la información que dirige la interacción proteína-proteína.

De forma similar, las hélices α transmembrana de las proteínas multipaso ocupan posiciones específicas en la estructura plegada de una proteína, que está determinada por interacciones entre las hélices vecinas. Estas interacciones son cruciales para la estructura y la función de muchos canales y transportadores que desplazan moléculas a través de la bicapa lipídica. En muchos casos, podemos utilizar proteasas para cortar las asas de cadena polipeptídica que, a cada lado de la membrana, unen las hélices α transmembrana; estas hélices permanecen unidas y funcionan con normalidad. En algunos casos, incluso podemos expresar en células vivas genes modificados artificialmente que codifican piezas de proteínas multipaso, y se constata que estas piezas separadas se ensamblan de forma adecuada formando una proteína transmembrana funcional (**Figura 10–24**), lo cual pone de manifiesto la exquisita especificidad con la que interactúan entre sí las hélices α transmembrana.



Figura 10–23 Dos hélices α en el canal de agua de la acuaporina, cada una de las cuales sólo atraviesa la mitad de la bicapa lipídica. En la membrana, la proteína forma un tetrámero de cuatro de estos segmentos de dos hélices α que, como los que se muestran coloreados, se hallan escondidos en una interfase formada por interacciones proteína-proteína. El mecanismo a través del cual los canales dejan pasar las moléculas de agua a través de la bicapa se describe con más detalle en el Capítulo 11.

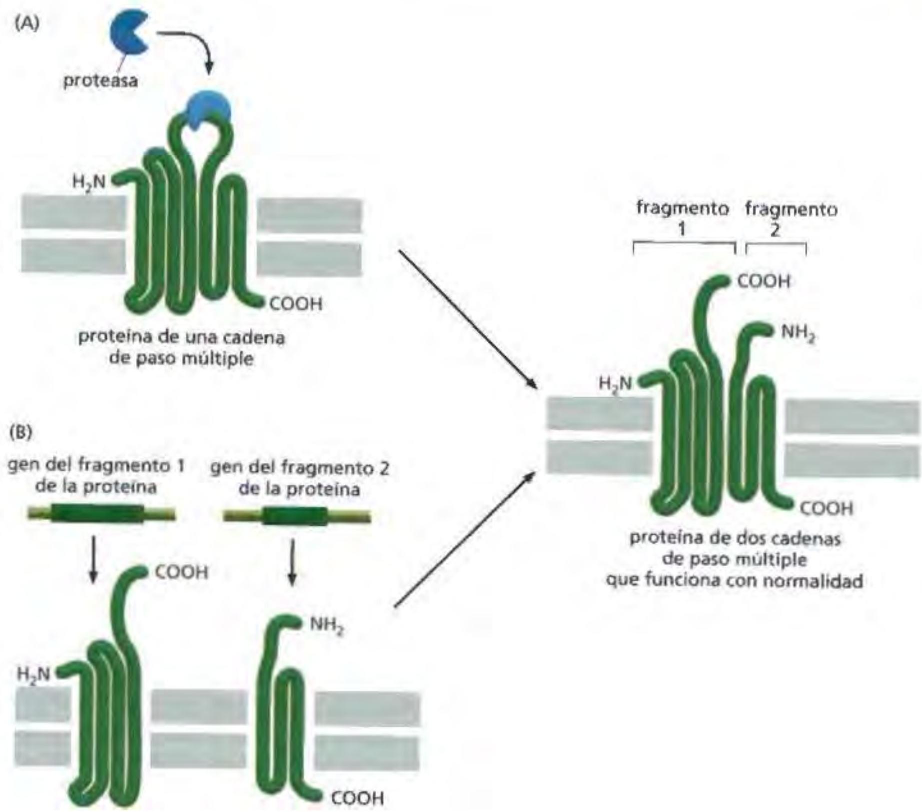


Figura 10–24 Transformación de una proteína de una cadena de paso múltiple en una proteína de dos cadenas de paso múltiple. (A) Corte proteolítico de un bucle, que da lugar a dos fragmentos que permanecen unidos y funcionan con normalidad. (B) La expresión de los mismos dos fragmentos a partir de dos genes distintos produce una proteína similar que funciona con normalidad.

En las proteínas multipaso, las hélices transmembrana vecinas en la estructura plegada de la proteína protegen a muchas de las hélices transmembrana de los lípidos de membrana. ¿Por qué, entonces, estas hélices protegidas están formadas primariamente a pesar de todo por aminoácidos hidrofóbicos? La respuesta radica en la manera a través de la que estas proteínas se integran en la membrana durante su biosíntesis. Como se expondrá en el Capítulo 12, las hélices α transmembrana se insertan en la bicapa lipídica de forma secuencial mediante un translocador proteico. Después de abandonar el translocador, cada hélice queda rodeada de forma transitoria por los lípidos de la bicapa, lo cual requiere que la hélice sea hidrofóbica. Cuando la proteína se pliega en su estructura final, se forman los contactos entre las hélices adyacentes; estos contactos proteína-proteína reemplazan algunos de los contactos proteína-lípido (**Figura 10–25**).

Algunos barriles β forman grandes canales transmembrana

Algunas proteínas transmembrana de paso múltiple cuyos segmentos transmembrana están plegados como *barriles β* (no como hélices α) son considerablemente rígidos y tienden a cristalizar con facilidad. Así, algunas de ellas fueron las primeras proteínas transmembrana de paso múltiple que se determinaron mediante cristalografía de rayos X. El número de hebras β de un barril β es muy variable, y oscila desde 8 hasta 22 (véase **Figura 10–26**).

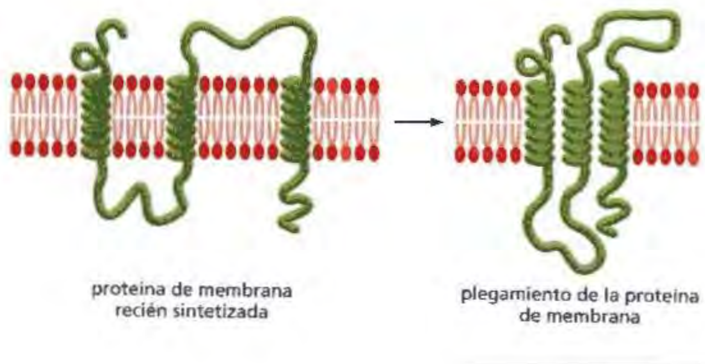


Figura 10–25 Pasos en el plegamiento de una proteína transmembrana de paso múltiple. Las hélices α transmembrana recién sintetizadas, que se liberan a la bicapa lipídica, son rodeadas inicialmente por moléculas de lípidos. Y cuando se pliegan las proteínas, las hélices entran en contacto entre sí, desplazando a la mayoría de los lípidos que las rodeaban.

Las proteínas en barril β son abundantes en la membrana mitocondrial externa, en cloroplastos y en muchas especies de bacterias. Algunas son proteínas formadoras de poros, las cuales generan canales llenos de agua que permiten que algunas pequeñas moléculas hidrofílicas atraviesen de forma específica la bicapa lipídica de la membrana externa bacteriana. Las porinas son ejemplos bien estudiados (ejemplo 3 de la Figura 10–26). El barril de las porinas está formado por una lámina β de 16 cadenas antiparalelas y es suficientemente grande como para organizarse en forma de una estructura cilíndrica. Los aminoácidos cuyas cadenas laterales son polares se alinean en el interior del canal acuoso, mientras que las cadenas laterales apolares se sitúan en el exterior, interactuando con el núcleo hidrofóbico de la bicapa lipídica. Con frecuencia algunos bucles de la cadena polipeptídica se proyectan hacia el lumen del canal, estrechándolo de forma que sólo algunos solutos pueden atravesarlo. Así pues, algunas porinas son muy selectivas: por ejemplo, la *maltoporina* permite el paso preferentemente de maltosa y de sus oligómeros a través de la membrana de *E. coli*.

La *proteína FepA* es un ejemplo más complejo de una proteína de transporte de este tipo (véase el ejemplo 4 de la Figura 10–26). Transporta iones hierro a través de la membrana bacteriana externa. Su gran barril está formado por 22 hebras β y un gran dominio globular que llena por completo el interior del barril. Los iones hierro se unen a este dominio, que al parecer realiza un gran cambio conformacional transportando el ion hierro a través de la membrana.

No todas las proteínas de estructura en barril β son proteínas de transporte. Algunas forman pequeños barriles que están llenos de cadenas laterales de aminoácidos que se proyectan hacia el centro del barril. Estas proteínas actúan como receptores o enzimas (véanse los ejemplos 1 y 2 de la Figura 10–26); en este caso el barril actúa fundamentalmente como un anclaje rígido que mantiene a la proteína en la membrana y orienta los bucles citosólicos que forman las regiones de unión específica para moléculas intracelulares.

Los barriles β pueden cumplir diferentes funciones, pero las proteínas de este tipo casi sólo se presentan en las membranas exteriores de bacterias, cloroplastos y mitocondrias. La mayoría de las proteínas transmembrana de paso múltiple de las células eucariotas y de la membrana plasmática bacteriana presentan hélices α transmembrana. Las hélices α pueden deslizarse unas sobre otras, permitiendo cambios conformacionales de la proteína que pueden abrir y cerrar canales iónicos, transportar solutos o transducir señales extracelulares a señales intracelulares. Por el contrario, en las proteínas con estructura de barril β cada una de las hebras β está unida rígidamente a las vecinas mediante enlaces de hidrógeno, haciendo improbables los cambios conformacionales del barril.

Muchas proteínas de membrana están glucosiladas

La mayoría de las proteínas transmembrana de las células animales se hallan glucosiladas. En el caso de los glucolípidos, los residuos de azúcar se añaden en el lumen del ER y del complejo de Golgi (se describe en los Capítulos 12 y 13). Por esta razón, las cadenas de oligosa-

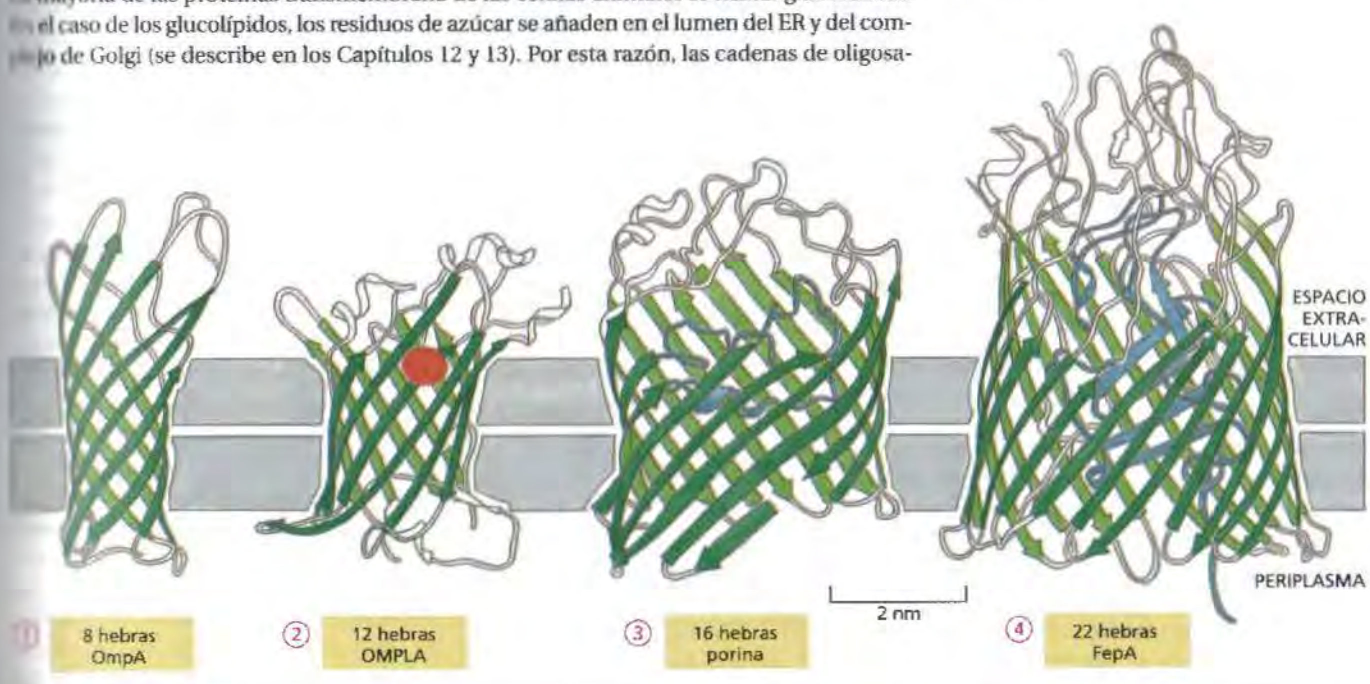


Figura 10–26 Barriles β formados por diferentes números de hebras β. <TGCT> (1) La proteína OmpA de *E. coli* actúa como receptor para un virus bacteriano. (2) La proteína OMPLA de *E. coli* es una enzima (una lipasa) que hidroliza moléculas lipídicas. Los aminoácidos que catalizan la reacción enzimática (mostrados en *rojo*) se proyectan desde la superficie externa del barril. (3) Una porina de la bacteria *Rhodobacter capsulatus* forma poros acuosos a través de la membrana externa. El diámetro del canal está limitado por bucles (mostrados en *azul*) que se proyectan hacia el canal. (4) La proteína FepA de *E. coli* transporta iones hierro. El interior del barril está por completo lleno por un dominio proteico globular (mostrado en *azul*) que contiene el sitio de unión del hierro (no mostrado). Se cree que este dominio cambia de conformación al transportar el hierro unido, aunque se desconocen los detalles moleculares.

cárido están presentes siempre en el lado no citosólico de la membrana. Otra importante diferencia entre las proteínas (o partes de proteínas) de uno y otro lados de la membrana es consecuencia del ambiente reductor del citosol. Este ambiente disminuye la probabilidad de que se formen enlaces disulfuro (S–S) inter o intracatenarios entre las cisteínas, en el lado citosólico de la membrana. Sin embargo, estos enlaces se forman en el lado no citosólico de la membrana, donde pueden ayudar a estabilizar tanto la estructura plegada de la cadena polipeptídica como su asociación con otras cadenas polipeptídicas (**Figura 10–27**).

Dado que la mayoría de las proteínas de la membrana plasmática están glucosiladas, los carbohidratos recubren la superficie de todas las células eucariotas. Estos carbohidratos se encuentran en forma de cadenas de oligosacáridos unidas covalentemente a las proteínas de membrana (glucoproteínas) y a lípidos (glucolípidos). También se encuentran como cadenas de polisacáridos de moléculas de *proteoglucanos* integrales de membrana. Los proteoglucanos, que consisten en largas cadenas de polisacáridos unidas covalentemente a un núcleo proteico, se encuentran sobre todo en el exterior celular como parte de la matriz extracelular (descrita en el Capítulo 19). Pero, para algunos proteoglucanos, el núcleo proteico se extiende a través de la bicapa lipídica o está anclado a la bicapa mediante un anclaje glucosilfosfatidilinositol (GPI).

El término cubierta celular o glucocáliz se utiliza a menudo para describir la zona de la superficie celular rica en carbohidratos. Esta **capa de carbohidratos** puede ser visualizada por medio de diversos colorantes, como el rojo de rutenio (**Figura 10–28A**), o también gracias a su afinidad a ciertas proteínas, las llamadas **lectinas,** que se unen a carbohidratos y que pueden ser marcadas con una tinción fluorescente u otro marcador visible. A pesar de que la mayoría de los carbohidratos están unidos a moléculas intrínsecas de la membrana plasmática, la capa de carbohidratos contiene además glucoproteínas y proteoglucanos que han sido secretados al espacio extracelular y que luego son adsorbidos en la superficie celular (Figura 10–28B). Muchas de estas macromoléculas adsorbidas son componentes de la matriz extracelular, de modo que el límite donde termina la membrana plasmática y donde se inicia la matriz extracelular es sólo una cuestión semántica. Una de las funciones probables de la cubierta celular es proteger a las células ante agresiones químicas y mecánicas, y mantener a distancia tanto objetos extraños como otras células para evitar interacciones proteína-proteína indeseables.

Las cadenas laterales de oligosacáridos de las glucoproteínas y de glucolípidos son muy diversas en cuanto a la organización de sus azúcares. A pesar de que habitualmente contienen menos de 15 residuos glucídicos, éstos suelen estar ramificados y los azúcares pueden estar unidos entre sí mediante diversos enlaces covalentes –a diferencia de los residuos de aminoácidos de una cadena polipeptídica, que están todos unidos por uniones peptídicas idénticas. Tres residuos glucídicos pueden formar cientos de trisacáridos diferentes. En principio, la diversidad y la posición expuesta de los oligosacáridos en la superficie celular les hace en especial indicados para participar en procesos de reconocimiento celular. Durante muchos años han existido pocas evidencias de esta sospechada función. Sin embargo, recientemente, se ha determinado que las lectinas unidas a la membrana plasmática reconocen de forma específica algunos oligosacáridos de glucolípidos de la superficie celular y glucoproteínas. Como se describe en el Capítulo 19, en la actualidad se sabe que estas lectinas están implicadas en una gran variedad de procesos de reconocimiento y adhesión célula-célula, entre los cuales se cuentan los que ocurren en las interacciones espermatozoide-óvulo, en la coagulación sanguínea, en la recirculación de linfocitos y en respuestas inflamatorias.



Figura 10–27 Una típica proteína transmembrana de "paso único". Obsérvese que la cadena polipeptídica atraviesa la bicapa lipídica en forma de hélice α dextrógira y que tanto las cadenas de oligosacárido como los puentes disulfuro se hallan en la superficie no citosólica de la membrana. Los grupos sulfhidrilo en el dominio citosólico no forman habitualmente puentes disulfuro debido a que el ambiente reductor del citosol mantiene estos grupos en su forma reducida (–SH).

Las proteínas de membrana pueden ser solubilizadas y purificadas mediante detergentes

En general, únicamente los agentes que rompen las asociaciones hidrofílicas y destruyen la bicapa lipídica pueden solubilizar las proteínas transmembrana (y algunas otras proteínas unidas con fuerza a la membrana). De entre estos compuestos los más útiles son los **detergentes**, que son pequeñas moléculas anfifílicas que presentan una estructura muy variada. Los detergentes son mucho más solubles en agua que en lípidos. Sus extremos polares (hidrofílicos) pueden estar cargados (iónicos), como es el caso del *dodecil sulfato sódico* (*SDS: sodium dodecyl sulfate*), o no estar cargados (no-iónicos), como es el caso del *octoglucósido* y del Tritón (**Figura 10–29A**). A baja concentración, los detergentes son monoméricos en solución, pero cuando su concentración se aumenta hasta valores superiores a un límite, de-

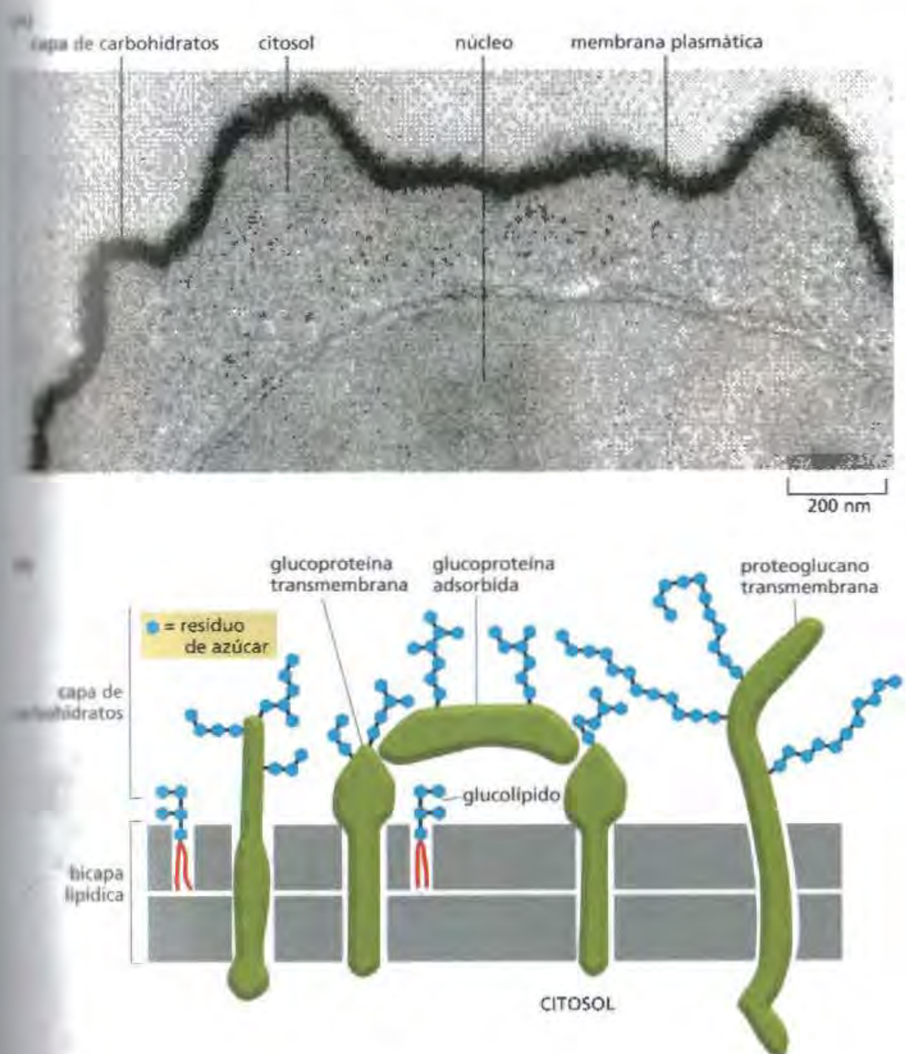


Figura 10–28 La capa de carbohidratos en la superficie de la célula. Esta electromicrografía de la superficie de un linfocito contrastado con rojo de rutenio destaca la gruesa capa rica en carbohidratos que envuelve la célula. (B) La capa de carbohidratos está formada por las cadenas laterales de oligosacáridos de los glucolípidos y de glucoproteínas integrales de membrana y por cadenas de polisacáridos de proteoglucanos integrales de membrana. Además, en muchas células los proteoglucanos y las glucoproteínas adsorbidos (no mostrados aquí) contribuyen a la formación de la capa de carbohidratos. Obsérvese que todos los carbohidratos se hallan en la superficie no citosólica de la membrana. (A, cortesía de Audrey M. Glauert y G.M.W. Cook.)

...nado *concentración micelar crítica* o CMC, se agregan formando micelas (Figura ...B-C). Las moléculas de detergente difunden rápidamente hacia adentro y hacia fuera ... micelas, manteniendo constante la concentración del monómero en la solución con ...pendencia del número de micelas presentes. Tanto el CMC como el número medio de ...culas de detergente de una micela son propiedades características de cada detergente, ... dependen de la temperatura y del pH de la concentración de sales. Por ello, las solucio... detergentes son sistemas complejos y resultan difíciles de estudiar.

Cuando se mezclan con membranas, las cabezas hidrofóbicas de los detergentes se ... a las regiones hidrofóbicas de las proteínas de membrana, donde desplazan moléculas ...cas con un collar de moléculas de detergente. Dado que el otro extremo de la molécu... polar, esta unión tiende a mantener las proteínas de membrana en la solución como ...plejos detergente-proteína (**Figura 10–30**). Por lo general algunas moléculas lipídicas ...bién quedan unidas a la proteína.

Con detergentes iónicos fuertes como el SDS pueden solubilizarse incluso las proteínas ...membrana más hidrofóbicas. Este hecho permite su análisis mediante *electroforesis en ... de poliacrilamida SDS* (véase Capítulo 8), un procedimiento que ha revolucionado el ...dio de las proteínas de membrana. Al unirse a sus "núcleos hidrofóbicos", estos deter... fuertes despliegan (desnaturalizan) las proteínas, inactivándolas y, por tanto, hacién... no utilizables para estudios funcionales. No obstante, las proteínas pueden ser ...mente separadas y purificadas en su forma desnaturalizada por el SDS. En algunos ca... la eliminación del detergente permite a la proteína purificada, renaturalizarse y recupe... su actividad funcional.

Muchas proteínas hidrofóbicas de membrana pueden ser solubilizadas y poste...mente purificadas en forma activa, a veces completamente normal, mediante el uso de

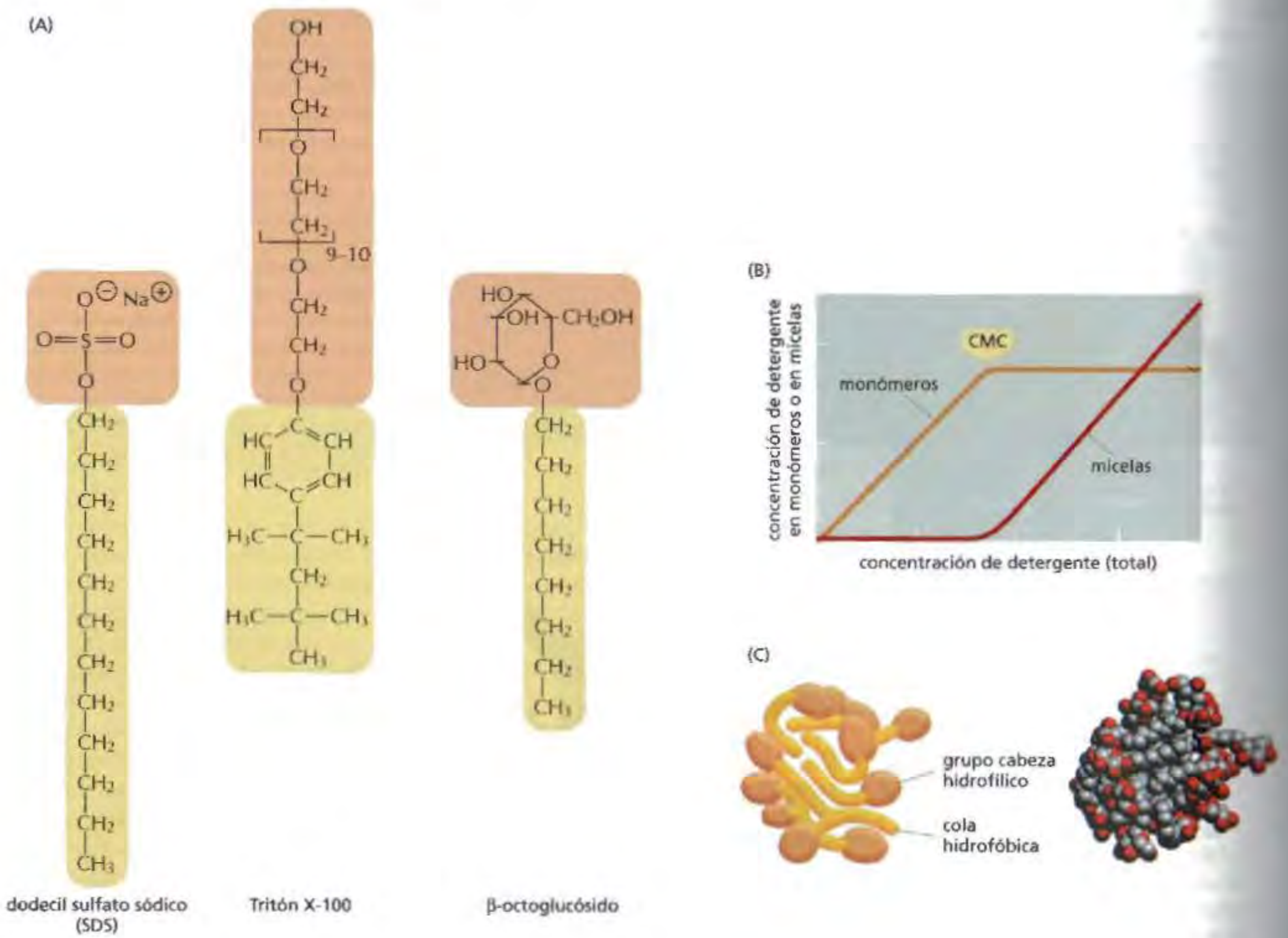


Figura 10–29 Estructura y función de las micelas de detergente. <GCGA> (A) Tres detergentes utilizados frecuentemente son el dodecil sulfato sódico (SDS), un detergente aniónico, el Tritón X-100 y el β-octoglucósido; estos dos últimos son detergentes no iónicos. El Tritón X-100 es una mezcla de compuestos en los que la región marcada entre corchetes se repite entre 9 y 10 veces. La porción hidrofóbica de cada detergente se muestra en *amarillo* y la porción hidrofílica en *naranja*. (B) A bajas concentraciones, las moléculas de detergente son monómeros en solución. Cuando aumenta su concentración más allá de la concentración micelar crítica (CMC), algunas moléculas de detergente forman micelas. Obsérvese que la concentración de monómeros de detergente permanece constante por encima de la CMC. (C) Las moléculas de detergente son anfifílicas debido a que tienen un extremo polar y otro extremo no-polar; debido a su forma en cuña, tienen más tendencia a formar micelas que bicapas (véase la Figura 10–7). Las micelas de detergente tienen formas irregulares y, como consecuencia de su empaquetamiento, las colas hidrofóbicas quedan parcialmente expuestas al agua. El modelo espacial muestra la estructura de una micela compuesta por 20 moléculas de β-octoglucósido, predichos mediante cálculos moleculares dinámicos. (B, adaptado de G. Gunnarsson, B. Jönsson y H. Wennerström, *J. Phys. Chem.* 84:3114-3121, 1980; C, de S. Bogusz, R.M. Venable y R.W. Pastor, *J. Phys. Chem.* B. 104:5462-5470, 2000. Con la autorización de la American Chemical Society.)

detergentes suaves. Estos detergentes recubren las regiones hidrofóbicas de los segmentos de la proteína que atraviesan la membrana y que aparecen expuestos después de eliminar los lípidos sin desplegar las proteínas. Si la concentración de detergente de una solución de proteínas de membrana solubilizadas se hace disminuir (p. ej. mediante dilución), las proteínas de membrana no permanecen solubles. En presencia de un exceso de moléculas de fosfolípido en una solución de este tipo, las proteínas de membrana se incorporan en los pequeños liposomas que se forman espontáneamente. De esta manera se pueden reconstruir sistemas de proteínas de membrana activos a partir de sus componentes purificados, lo que proporciona un poderoso medio de analizar la actividad de transportadores de membrana, canales iónicos, receptores de señal, etc. (**Figura 10–31**). Por ejemplo, una reconstrucción funcional de este tipo constituye una prueba a favor de la hipótesis de que la ATPasa transmembrana para sintetizar ATP utiliza gradientes de H^+ en las membranas de las mitocondrias, los cloroplastos y las bacterias.

Los detergentes también han desempeñado un papel crucial en la purificación y cristalización de las proteínas de membrana. El desarrollo de nuevos detergentes y de nuevos sis-

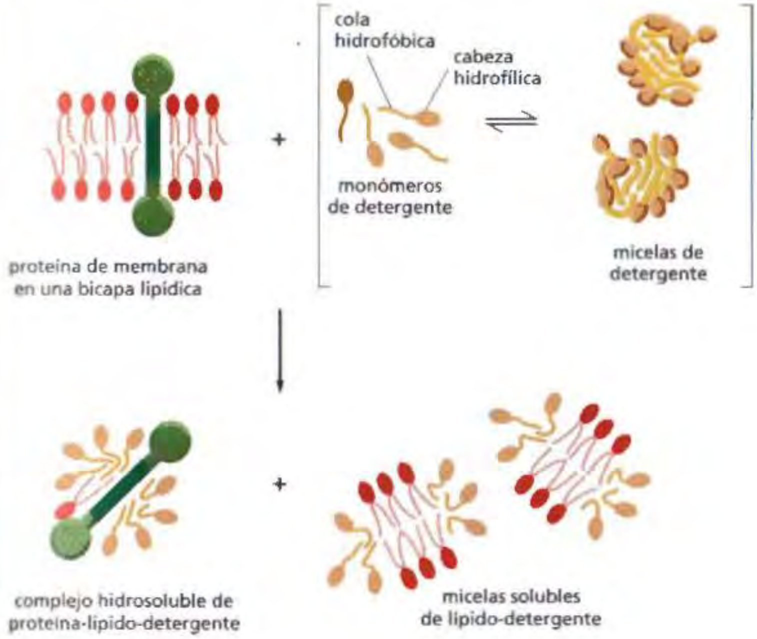


Figura 10-30 Solubilización de proteínas de membrana con un detergente no iónico suave. El detergente desorganiza la estructura de la bicapa lipídica y coloca las proteínas en solución en forma de complejos proteína-lípido-detergente. Los fosfolípidos de la membrana también se solubilizan con el detergente.

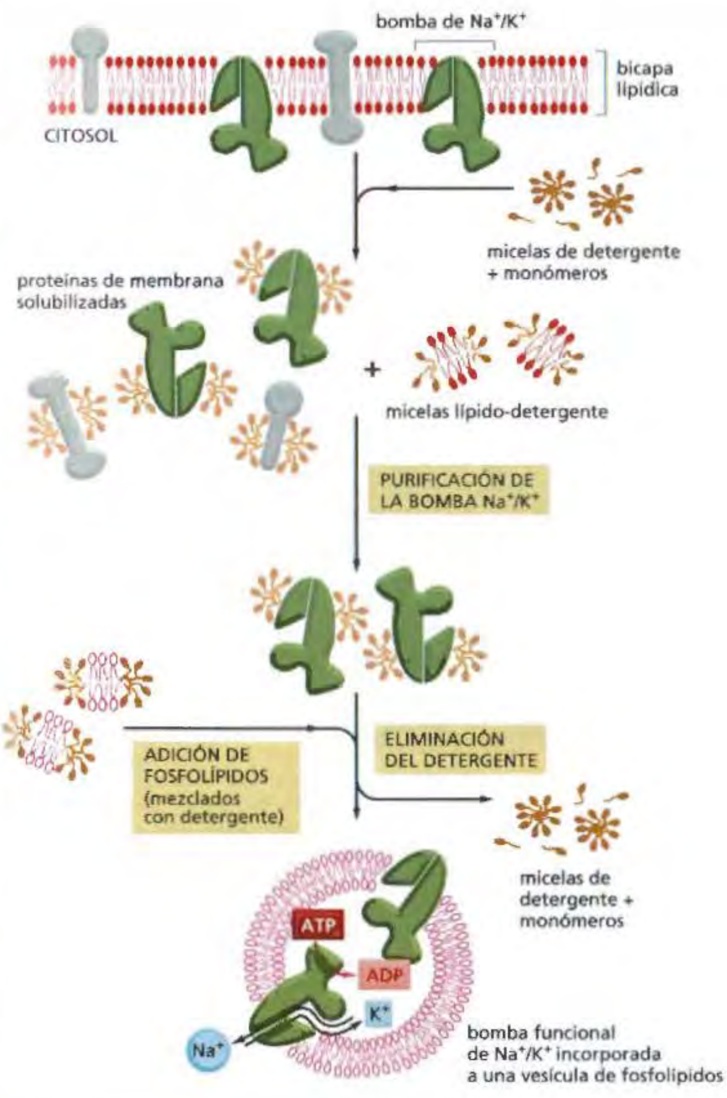


Figura 10-31 Uso de detergentes suaves no iónicos para solubilizar, purificar y reconstruir sistemas funcionales de proteínas de membrana. En este ejemplo se purifican moléculas funcionales de la bomba de Na^+/K^+ y se incorporan a vesículas de fosfolípidos. La bomba de Na^+/K^+ es una bomba iónica presente en la membrana plasmática de la mayoría de las células animales; utiliza la energía de hidrólisis del ATP para bombear Na^+ hacia fuera de la célula y K^+ hacia el interior, como se describe en el Capítulo 11.

temas de expresión que ban producido grandes cantidades de proteínas de membrana a partir de clones de cDNA ha incrementado rápidamente el número de estructuras conocidas de proteínas de membrana y de complejos proteicos.

La bacteriorrodopsina es una bomba de protones conducida por la luz, que atraviesa la bicapa en forma de siete hélices α

En el Capítulo 11 consideraremos de qué forma las proteínas de membrana de paso múltiple median el transporte selectivo de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de las membranas celulares. Pero para comprender con detalle cómo trabaja en realidad una proteína de transporte a través de membrana, es necesario tener una información precisa sobre su estructura tridimensional cuando está situada en la bicapa. La *bacteriorrodopsina* fue la primera proteína de transporte transmembrana de la que se determinó la estructura. Ha seguido siendo el prototipo de las proteínas de membrana de paso múltiple de estructura similar, por lo que merece que tratemos de ella brevemente.

La "membrana púrpura" de la arquea *Halobacterium salinarum* es una región especializada de la membrana plasmática que contiene un único tipo de molécula proteica, la **bacteriorrodopsina** (**Figura 10–32**). Cada molécula de bacteriorrodopsina contiene un único grupo que absorbe la luz, o cromóforo (denominado *retinal*), que confiere a la proteína su color púrpura. El retinal es la forma aldehído de la vitamina A y es idéntico al cromóforo encontrado en la *rodopsina* de las células fotorreceptoras del ojo de los vertebrados (se describe en el Capítulo 15). El retinal está unido covalentemente a una cadena lateral de lisina de la proteína bacteriorrodopsina. Cuando es activado por un solo fotón de luz, el cromóforo excitado cambia inmediatamente de forma y provoca una serie de pequeños cambios conformacionales en la proteína, lo que da lugar a la transferencia de un H^+ desde el interior hacia el exterior de la célula (**Figura 10–33**). Bajo luz brillante, cada molécula de bacteriorrodopsina puede bombear varios cientos de protones por segundo. La transferencia de protones impulsada por la luz genera un gradiente de H^+ a través de la membrana plasmática, que a su vez impulsa la síntesis de ATP por una segunda proteína de la membrana plasmática de la célula. La energía almacenada en el gradiente de H^+ también impulsa otros procesos celulares que necesitan energía. Así, la bacteriorrodopsina transforma energía solar en un gradiente de protones que proporciona energía a las células de la arquea.

Las numerosas moléculas de bacteriorrodopsina de la membrana púrpura están ordenadas en forma de un cristal bidimensional plano. Este empaquetamiento regular ha permitido determinar su estructura tridimensional y la orientación de la bacteriorrodopsina en la membrana con una resolución moderada (3 Å), por medio de una aproximación alterna-

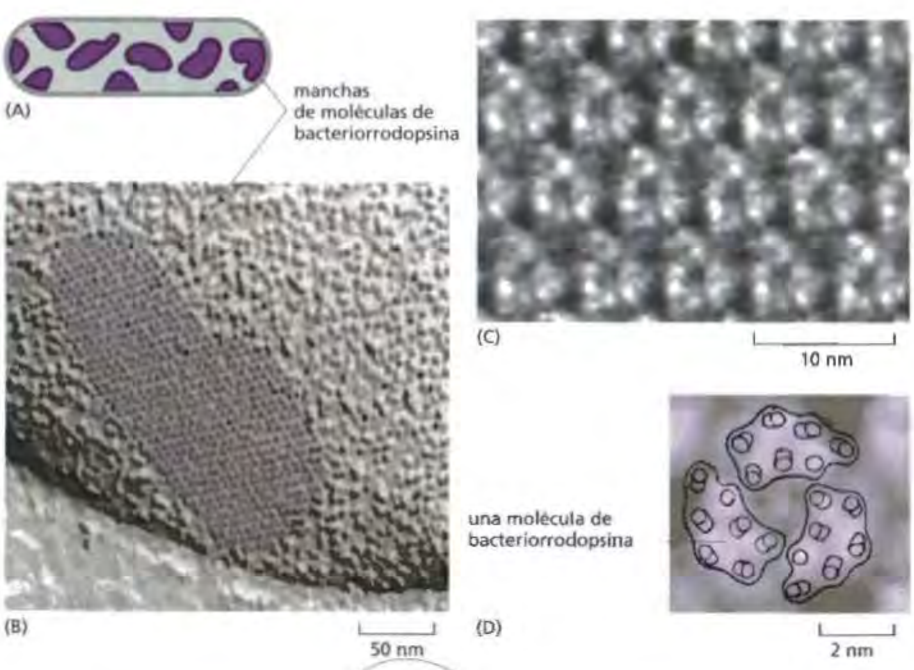


Figura 10–32 Manchas de membrana púrpura que contienen bacteriorrodopsina en la arquea *Halobacterium salinarum*. (A) Estas arqueas viven en aguas salobres, donde se hallan expuestas a la luz solar. Han desarrollado una gran cantidad de proteínas activadas por la luz, incluyendo la bacteriorrodopsina, que es una bomba de protones activada por la luz presente en su membrana plasmática. (B) Las moléculas de bacteriorrodopsina en las manchas púrpura de la membrana están fuertemente empaquetadas en secciones cristalinas bidimensionales. (C) Detalles de la superficie molecular observados con el microscopio de fuerzas atómicas. Con esta técnica se pueden ver moléculas de bacteriorrodopsina. (D) Contorno de la posición aproximada de tres monómeros de bacteriorrodopsina mostrados en (B) y su hélice α individual. (B-D, cortesía de Dieter Oesterhelt.)

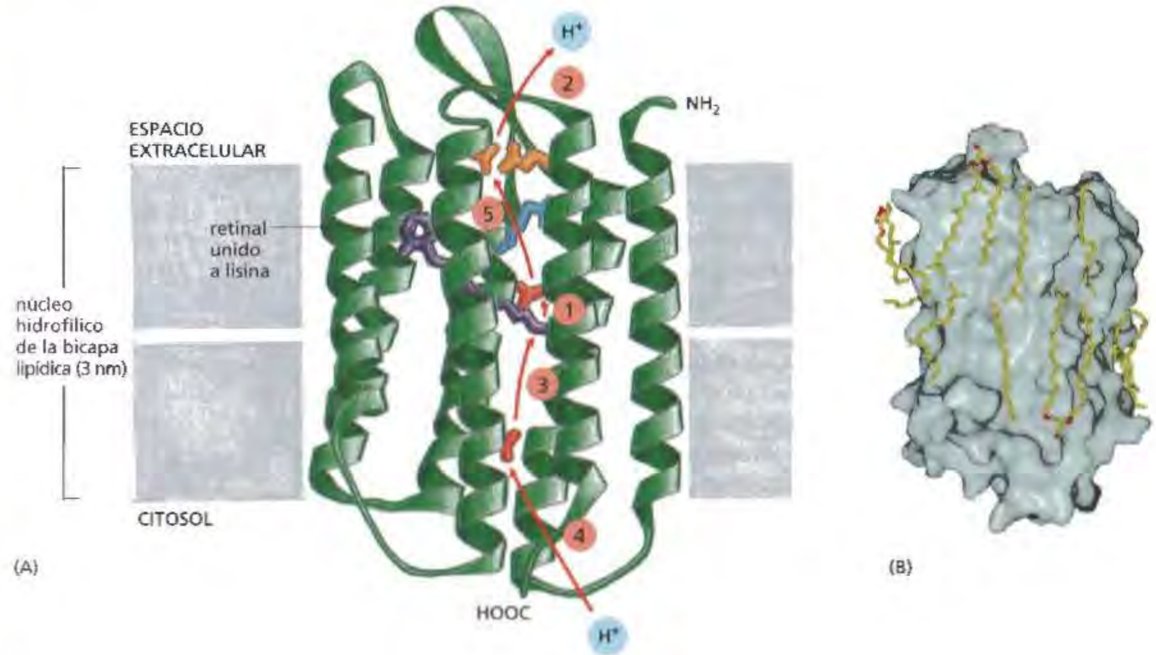


Figura 10–33 Estructura tridimensional de una molécula de bacteriorrodopsina. <TTAA> (A) La cadena polipeptídica cruza la bicapa en forma de siete hélices α. Se muestra la localización del cromóforo retinal (*violeta*) y el probable camino que siguen los protones durante el ciclo de bombeo activado por la luz. La primera etapa, y la más crítica, es el paso de un H^+ del cromóforo a la cadena lateral del ácido aspártico 85 (en *rojo*, situado al lado del cromóforo) como consecuencia de la captura de un fotón por el cromóforo. Posteriormente, otras transferencias de H^+ –en el orden numérico indicado y utilizando las cadenas laterales de aminoácidos hidrofílicos que delimitan una vía de paso a través de la membrana– completan el ciclo de bombeo y devuelven la enzima a su estado inicial. Código de colores: ácido glutámico (*naranja*), ácido aspártico (*rojo*), arginina (*azul*). (B) La estructura cristalina de alta resolución de la bacteriorrodopsina, muestra muchas molécula lipídicas (*amarillo* con grupos de cabeza *rojos*) que están fuertemente unidas a lugares específicos de la superficie de las proteínas. (A, adaptado de H. Luecke et al., *Science* 286:255-260, 1999. Con la autorización de AAAS; B, de H. Luecke et al., *J. Mol. Biol*. 291:899-911, 1999. Con la autorización de Academic Press.)

...ca que utiliza una combinación de microscopía electrónica y análisis de difracción electrónica. Este procedimiento, denominado **cristalografía electrónica**, es análogo al estudio de los cristales tridimensionales de proteínas solubles mediante el análisis con difracción de rayos X y ha proporcionado las primeras imágenes estructurales de muchas proteínas de membrana que fueron difíciles de cristalizar a partir de soluciones de detergente. En el caso de la bacteriorrodopsina, la estructura obtenida mediante cristalografía electrónica fue posteriormente confirmada y completada a mucho mayor resolución mediante difracción de rayos X. Cada molécula de bacteriorrodopsina está plegada en siete hélices α densamente empaquetadas (de unos 25 aminoácidos cada una) que atraviesan la bicapa lipídica en ángulos ligeramente distintos. Mediante la obtención de cristales muy bien ordenados de la proteína y congelándolos a temperaturas muy bajas, ha sido posible resolver las estructuras de algunas de las conformaciones intermedias que adopta la proteína a lo largo de su ciclo de bombeo de H^+.

La bacteriorrodopsina es un miembro de una gran superfamilia de proteínas de membrana, de estructuras similares entre sí pero con funciones diferentes. Por ejemplo, la rodopsina de los bastones de la retina de vertebrados y muchas proteínas receptoras de la superficie celular, que se unen a moléculas mensajeras extracelulares, también están formadas por siete hélices α transmembrana. Estas proteínas actúan como transductores de señal más que como transportadores: cada una de ellas responde a una señal extracelular activando una proteína de unión a GTP (proteína G) dentro de la célula, por lo que se han denominado *receptores acoplados a proteína G* (*GPCR*: ***G-protein-coupled receptors***), como se describe en el Capítulo 15. Aunque las estructuras de la bacteriorrodopsina y de los GPCR son muy similares, no presentan homología de secuencia por lo que probablemente pertenecen a dos ramas evolutivas distantes de una misma antigua familia de proteínas.

La estructura de alta resolución de los cristales de la bacteriorrodopsina revela muchas moléculas lipídicas unidas sobre la superficie de la proteína (Figura 10–33B). Se cree que las interacciones específicas con lípidos ayudan a estabilizar muchas proteínas de membrana, las cuales trabajan mejor y cristalizan más fácilmente si durante la extracción con detergente algunos de los lípidos quedan unidos a la proteína o si estos lípidos se añaden de nuevo a las proteínas en la solución de detergente. La especificidad de estas interacciones lípido-proteína ayudan a explicar por qué las membranas eucariotas contienen tal variedad de lípidos, con grupos de cabeza diferentes en tamaño, forma y carga. Podemos pensar que los lípidos de membrana constituyen el solvente bidimensional de las proteínas de membrana, como el agua constituye el solvente tridimensional de las proteínas que se hallan en una solución acuosa. Algunas proteínas de membrana sólo funcionan en presencia de determinados grupos de cabeza lipídicos, de la misma forma que muchas enzimas en soluciones acuosas requieren un determinado ion para presentar actividad enzimática.

Con frecuencia las proteínas de membrana actúan en forma de grandes complejos

Muchas proteínas de membrana forman parte de complejos formados por varios componentes, algunos de los cuales han sidn estudiados mediante cristalografla con rayos X. Uno de ellos es el *centro de reacción fotosintético* de bacterias, el primer complejo proteico transmembrana en ser cristalizado y resuelto mediante difracción de rayos X. Esto ha permitido comprender la biología de las membranas, ya que mostró cómo se asocian varios polipéptidos en una membrana formando una compleja máquina proteica (**Figura 10-34**). En el Capítulo 14 se describe cómo actúan estos complejos fotosintéticos capturando energía luminosa y empleándola para bombear protones a través de la membrana. Muchos de los complejos de proteínas de membrana que participan en la fotosíntesis, el bombeo de protones y el transporte electrónico son aún mayores que el centro de reacción fotosintético. Por ejemplo, el enorme complejo fotosistema II de la cianobacteria contiene 19 subunidades proteicas y más de 60 hélices transmembrana. Las proteínas de membrana se organizan formando grandes complejos no sólo para capturar diversas formas de energía sino también para convertir señales extracelulares en intracelulares (véase el Capítulo 15).

Muchas proteínas de membrana difunden en el plano de la membrana

Como ocurre con la mayoría de los lípidos de membrana, las proteínas no saltan (*flip-flop*) a través de la bicapa lipídica, sino que giran alrededor de un eje perpendicular al plano de la bicapa (*difusión rotacional*). Además, muchas proteínas de membrana pueden desplazarse lateralmente por la membrana (*difusión lateral*). Un experimento en el que se fusionaron artificialmente células de ratón con células humanas, produciendo células híbridas (*heterocariontes*), evidenció que algunas proteínas de membrana plasmática se desplazan en el plano de la membrana. Se utilizaron dos anticuerpos con distinto marcaje para distinguir deter-

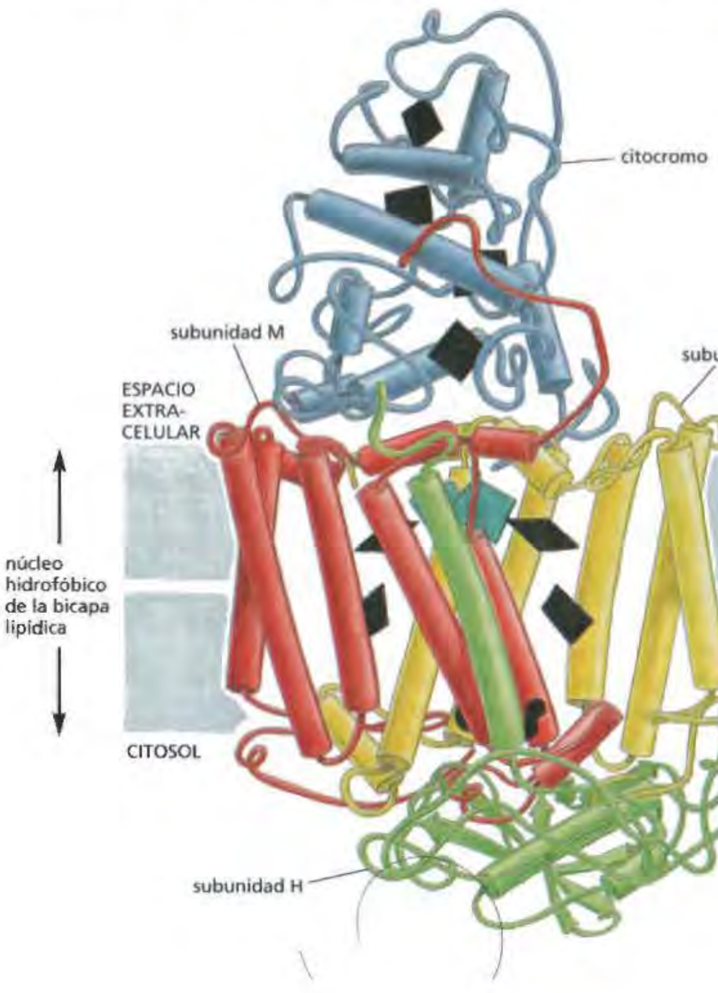


Figura 10-34 Estructura tridimensional del centro de reacción fotosintético de la bacteria *Rhodopseudomonas viridis*. <ATCA> La estructura fue determinada mediante difracción de rayos X de cristales de este complejo de proteínas transmembrana. El complejo está formado por cuatro subunidades L, M, H y un citocromo. Las subunidades L y M forman el núcleo del centro de reacción, cada uno de los cuales contiene cinco hélices α que atraviesan la bicapa lipídica. En negro se muestran las posiciones de varias coenzimas transportadoras de electrones. Obsérvese que las coenzimas se encuentran situadas en los espacios entre las hélices. El *par especial* de moléculas de clorofila (explicado en el Capítulo 14) se muestra en *turquesa*. (Adaptado de un esquema de J. Richardson basado en datos de J. Deisenhofer et al., *Nature* 318:618-626, 1985. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

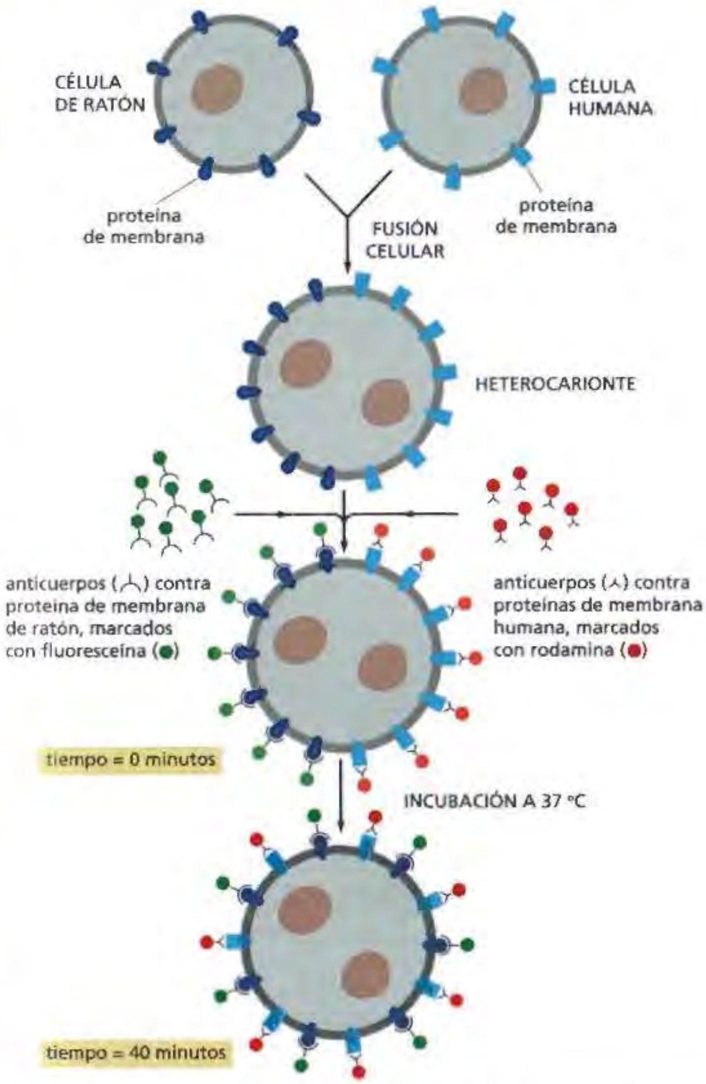


Figura 10–35 Experimento que demuestra la difusión de proteínas en la membrana plasmática de células híbridas ratón-humanas. Inicialmente las proteínas de ratón y las proteínas humanas están confinadas a sus propias mitades de la membrana plasmática del heterocarionte recién formado, pero con el tiempo se van entremezclando. Los dos anticuerpos que se utilizan para visualizar las proteínas se pueden distinguir en un microscopio de fluorescencia dado que la fluoresceína es verde y la rodamina es roja. (Basado en observaciones de L.D. Frye y M. Edidin, *J. Cell Sci.* 7:319-335, 1970. Con la autorización de The Company of Biologists.)

das proteínas de membrana plasmática de ratón de otras humanas. Aunque al principio las proteínas de ratón y las humanas estaban confinadas a su propia mitad del heterocarionte recién formado, las dos clases de proteínas difundieron y se mezclaron, ocupando, a la media hora, toda la superficie del heterocarionte (**Figura 10–35**).

La velocidad de difusión lateral de las proteínas de membrana puede medirse utilizando la técnica de *recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueado* (*FRAP: **fluorescence recovery after** photobleaching*). Este método comporta el marcaje, con un grupo fluorescente, de la proteína de superficie que se pretende estudiar. Esto puede hacerse tanto con un ligando fluorescente como con un anticuerpo marcado con un fluoróforo que se una a la proteína o mediante tecnología de DNA recombinante expresando la proteína fusionada a la proteína fluorescente verde (GFP: ***green fluorescent protein***) (descrita en el Capítulo 9). El grupo fluorescente es blanqueado en una pequeña área de la membrana con un rayo láser y se mide el tiempo que tardan en difundir al área blanqueada las proteínas de membrana adyacentes que contienen moléculas de ligando o GFP no blanqueadas (**Figura 10–36**A). Una técnica complementaria es la *fluorescencia perdida tras fotoblanqueado* (*FLIP: **fluorescence loss in** photobleaching*). En este caso, un haz láser irradia continuamente una pequeña área de membrana para blanquear todas las moléculas fluorescentes que difunden hacia ella, reduciendo de forma gradual el contenido de moléculas fluorescentes en las áreas adyacentes de la membrana (Figura 10–36B). A partir de estas mediciones de FRAP y FLIP podemos calcular los coeficientes de difusión de la proteína de superficie celular marcada. Los valores de los coeficientes de difusión de las diferentes proteínas de membrana en células diferentes son diversos, debido a que las diferentes interacciones de cada proteína con otras proteínas impiden en medida diferente la difusión de las proteínas. Las mediciones de las proteínas que tienen pocos impedimentos para la difusión indican que las membranas celulares tienen una viscosidad como la del aceite de oliva.

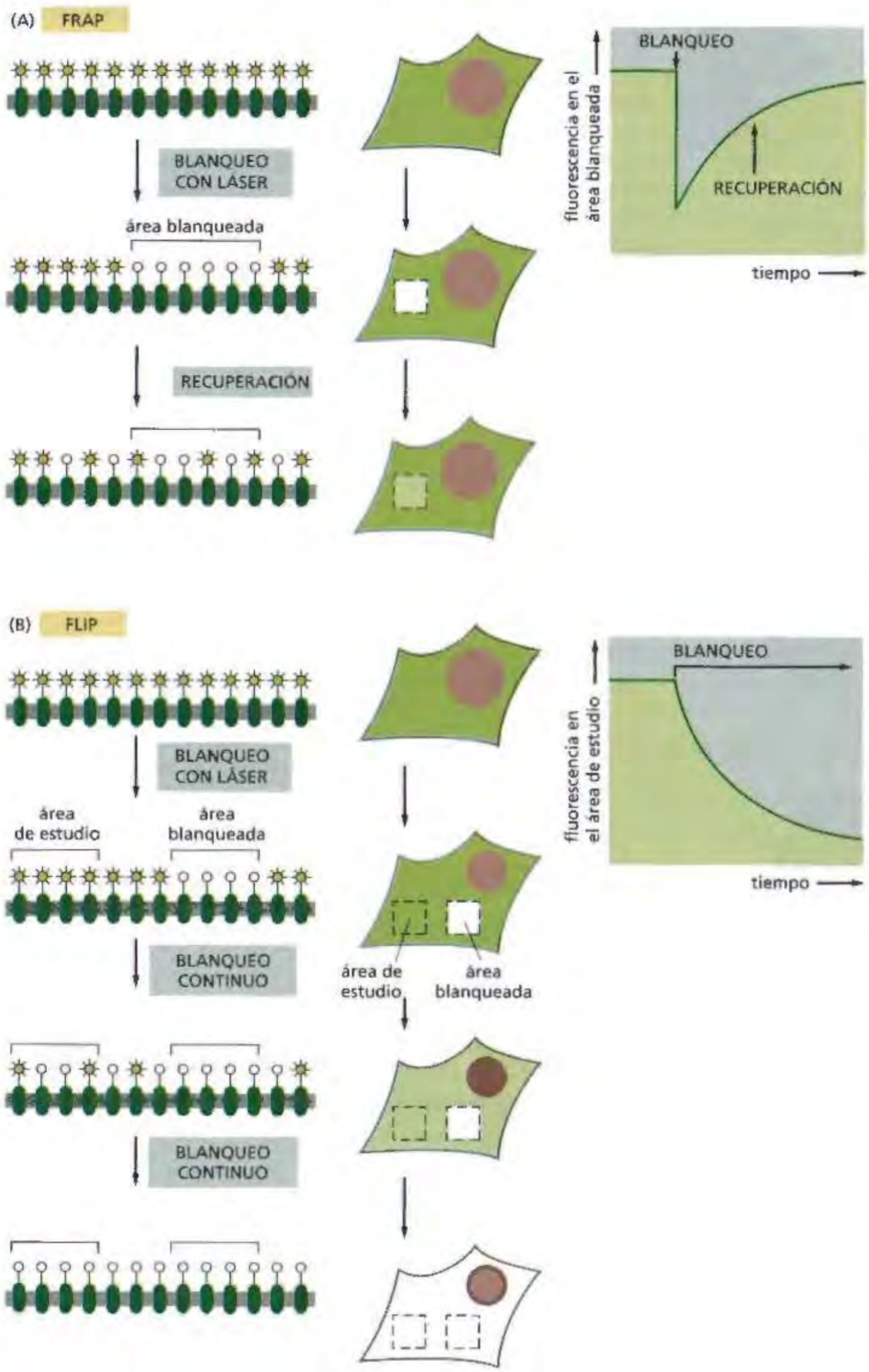


Figura 10–36 Medición de la velocidad de difusión lateral de una proteína de membrana mediante la técnica de fotoblanqueado. <ATGT> Una determinada proteína de interés se puede expresar como una proteína de fusión con la proteína fluorescente verde (GFP: *green fluorescent protein*), que es fluorescente intrínsecamente. (A) En la técnica FRAP, las moléculas fluorescentes son decoloradas en un área pequeña mediante un haz láser. Se sigue la intensidad de fluorescencia a medida que las moléculas blanqueadas difunden fuera del área blanqueada y las moléculas no blanqueadas difunden al interior del área irradiada (se muestra en vistas superior y lateral). El coeficiente de difusión se calcula a partir de una gráfica de la tasa de recuperación: a mayor coeficiente de difusión más rápida será la recuperación. (B) En la técnica FLIP, una pequeña área de la membrana se irradia continuamente y se mide la fluorescencia de otra área diferente. La fluorescencia de la segunda área se reduce de forma progresiva a medida que las moléculas fluorescentes difunden hacia fuera y las moléculas blanqueadas difunden hacia dentro; en algunos casos, todas las moléculas proteicas fluorescentes son decoloradas, siempre que sean móviles y que no se encuentren permanentemente ancladas al citoesqueleto o a la matriz extracelular.

Un inconveniente de las técnicas FRAP y FLIP es que siguen el desplazamiento de grandes poblaciones de moléculas en un área de membrana relativamente grande; no podemos medir las moléculas de proteína de forma individual. Por ejemplo, si una proteína no migra en un área blanqueada no podemos determinar si lo que ocurre es que la molécula está inmóvil o tiene su desplazamiento restringido a una región muy reducida de la membrana, quizá a través de proteínas del citoesqueleto. Las técnicas de *desplazamiento de partículas individuales* superan este problema marcando moléculas individuales de la membrana con anticuerpos acoplados a marcadores fluorescentes o a pequeñas partículas de oro coloidal y siguiendo sus desplazamientos mediante videomicroscopía. Utilizando estas técnicas podemos grabar las vías de difusión de una sola proteína de membrana a lo largo del tiempo. Los resultados de todas estas técnicas indican que las proteínas de la membrana plasmática tienen velocidades de difusión muy variadas, como expondremos a continuación.

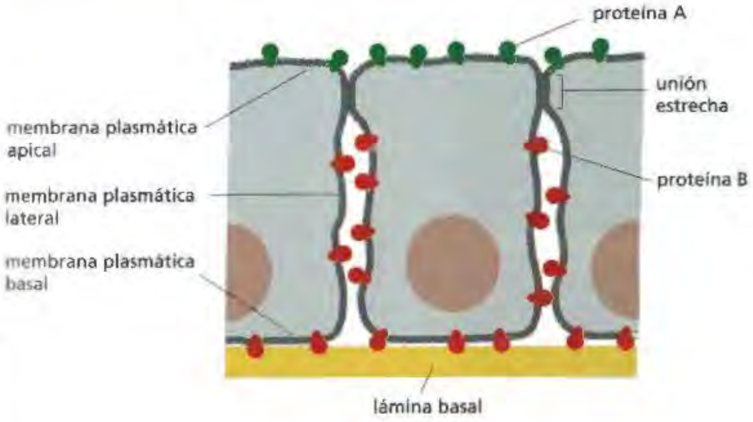


Figura 10–37 **De qué forma se confinan las moléculas de la membrana.** En este esquema de una célula epitelial, la proteína A (en la membrana apical) y la proteína B (en la basal y lateral) pueden difundir lateralmente en sus dominios respectivos, pero son incapaces de entrar en el otro dominio, en parte debido a la unión celular especial, denominada unión estrecha. De la misma forma, las moléculas lipídicas de la monocapa exterior (no-citosólica) situadas en la membrana plasmática tampoco pueden difundir entre ambos dominios, pero los lípidos de la monocapa interior (citosólica) sí que pueden hacerlo (no se muestra en la figura). La lámina basal es un fino tapete de la matriz extracelular que separa la capa epitelial de otros tejidos. (Explicado en el Capítulo 19.)

Las células pueden confinar a lípidos y a proteínas en dominios específicos de la membrana

El reconocimiento de que las membranas biológicas son fluidos bidimensionales constituyó un gran avance en la comprensión de la estructura y de la función de la membrana. Ha quedado claro, sin embargo, que la representación de la membrana como un mar lipídico en el cual todas las proteínas flotan libremente es una simplificación excesiva. Muchas células confinan sus proteínas de membrana en regiones específicas de la bicapa lipídica continua. Como se ha descrito, las moléculas de bacteriorrodopsina en la membrana púrpura de *Halobacterium* parecen grandes cristales bidimensionales en los que cada molécula proteica está fijada en relación a las demás (véase Figura 10–32); los grandes agregados de este tipo difunden muy lentamente.

En las células epiteliales, como las que revisten el intestino o los túbulos del riñón, ciertas enzimas de la membrana plasmática y algunas proteínas de transporte sólo se encuentran en la cara apical de la células mientras que otras proteínas se hallan confinadas en las caras basal y lateral (**Figura 10–37**). A menudo esta distribución asimétrica de las proteínas es esencial para la función del epitelio, como se expone en los Capítulos 11 y 19. La composición lipídica de estos dos dominios de membrana también es diferente; este hecho demuestra que las células epiteliales pueden evitar la difusión de las moléculas lipídicas y proteicas entre los dominios. Sin embargo, experimentos con lípidos marcados sugieren que sólo están confinadas de esta manera las moléculas lipídicas que están situadas en la monocapa externa. Las barreras formadas por un tipo determinado de uniones intercelulares (llamadas *uniones estrechas*, descritas en el Capítulo 19) mantienen la separación tanto de las moléculas de proteína como de las de lípido. Las proteínas de membrana que forman estas uniones intercelulares no pueden difundir lateralmente entre las membranas que están interaccionando

Una célula también puede generar dominios de membrana sin utilizar uniones intercelulares. El espermatozoide de los mamíferos, por ejemplo, es una célula aislada que presenta varias zonas estructural y funcionalmente distintas delimitadas por una membrana plasmática continua. Cuando se observa un espermatozoide con un microscopio de fluorescencia, utilizando diferentes anticuerpos cada uno de los cuales reacciona de forma específica con una molécula de la superficie celular, se constata que la membrana plasmática presenta al menos tres dominios diferentes (**Figura 10–38**). Algunas de las moléculas de membrana son capaces de difundir libremente dentro de los límites de su propio dominio. Se desconoce la naturaleza molecular de las "vallas" que impiden a las moléculas salir de su dominio. Muchas otras células tienen vallas similares en las membranas que confinan la difusión de las proteínas de membrana a ciertos dominios de membrana. Por ejemplo, en la membrana de las células nerviosas se distingue un dominio que comprende el soma celular y las dendritas y otro que corresponde al axón. En este caso parece que parte de la valla está constituida por un cinturón de filamentos de actina estrechamente asociados a la membrana en la unión del soma celular y el axón.

La **Figura 10–39** muestra cuatro sistemas habituales para inmovilizar y limitar la movilidad lateral de determinadas proteínas de la membrana plasmática a través de interacciones proteína-proteína.

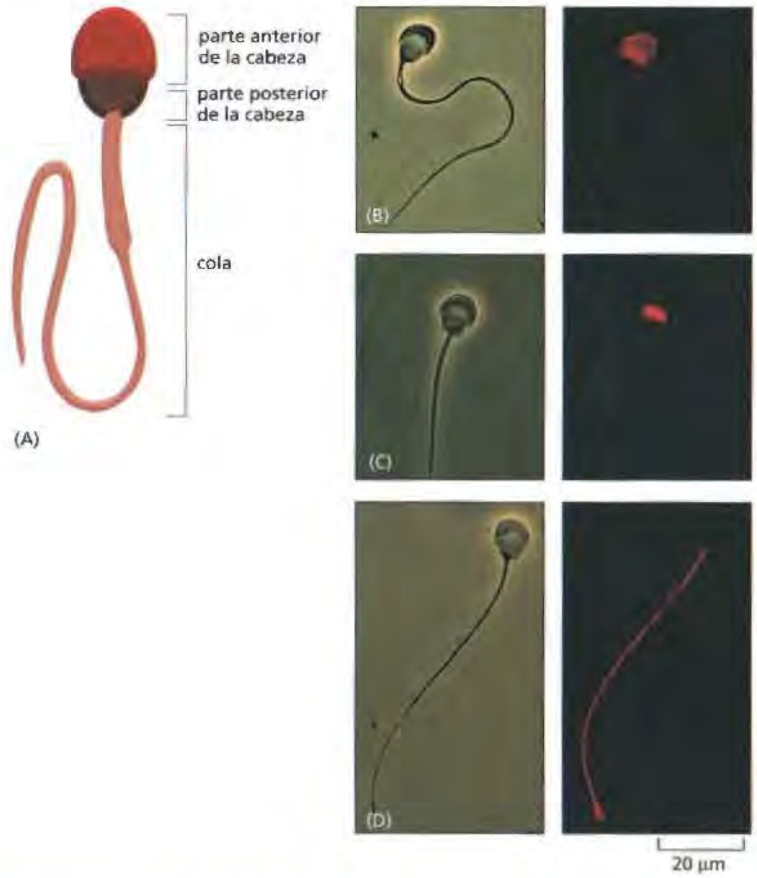


Figura 10–38 Tres dominios de la membrana plasmática de espermatozoide de cobaya. (A) Dibujo de espermatozoide de cobaya. En los tres pares de micrografías, las de contraste de fases están a la *izquierda*. A la *derecha* se muestra, para la misma célula, una tinción inmunofluorescente de la superficie celular. Diferentes anticuerpos monoclonales marcan selectivamente moléculas de la superficie celular de la parte anterior de la cabeza (B), la parte posterior de la cabeza (C) y la cola (D). (Micrografías cortesía de Selena Carroll y Diana Myles.)

El citoesqueleto cortical proporciona a la membrana fuerza mecánica y restringe la difusión de las proteínas de membrana

Como se muestra en la Figura 10–39B y C, un sistema habitual a través del cual una célula restringe la movilidad lateral de determinadas proteínas de membrana consiste en trabarlas a ensamblajes macromoleculares a cada lado de la membrana. La forma bicóncava característica de un eritrocito (**Figura 10–40**), por ejemplo, es el resultado de las interacciones entre sus proteínas de membrana con un *citoesqueleto* subyacente, que consiste fundamentalmente en una red de filamentos de la proteína **espectrina**. La espectrina es una barra larga, delgada y flexible, de aproximadamente 100 nm de longitud. Siendo el principal componente del citoesqueleto de los glóbulos rojos de la sangre (eritrocitos), mantiene la integridad estructural y la forma bicóncava de su membrana plasmática, que es la única membrana de estas células, ya que los eritrocitos no tienen ni núcleo ni orgánulos. El citoesqueleto de espectrina está unido a la membrana mediante varias proteínas de membrana. El resultado final es un entramado deformable que recubre toda la superficie citosólica de la membrana de los eritrocitos (**Figura 10–41**). Este citoesqueleto basado en espectrina le permite al eritrocito resistir el estrés de su membrana cuando se les fuerza a pasar a través de los estrechos capilares. Los ratones y los humanos que tienen anormalidades genéticas en la espectrina son anémicos, ya que tienen eritrocitos esféricos (en lugar de cóncavos) y frágiles; la gravedad de la anemia se incrementa con el grado de deficiencia de la espectrina.

Por debajo de la membrana plasmática de la mayoría de las células de nuestro cuerpo existe una red de citoesqueleto análoga a la descrita, pero mucho más elaborada y compleja. Esta red, que constituye la región cortical (o **córtex**) del citoplasma, es rica en filamentos de actina que se unen a la membrana plasmática de muchas formas. El córtex de células nucleadas contiene proteínas estructuralmente homólogas a la espectrina y a otros componentes del citoesqueleto de los eritrocitos. El citoesqueleto cortical de células nucleadas y su interacción con la membrana plasmática se describen en el Capítulo 16.

La red de citoesqueleto cortical subyacente a la membrana plasmática restringe la difusión no sólo de las proteínas que están directamente ancladas a él. Como los *filamentos del citoesqueleto* se hallan íntimamente superpuestos a la superficie citosólica de la membrana, pueden formas barreras mecánicas que parten la membrana en pequeños dominios o *co-*

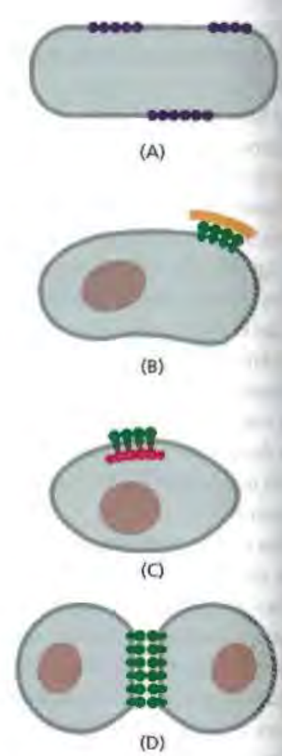


Figura 10–39 Cuatro sistemas mediante los cuales se puede limitar la movilidad lateral de determinadas proteínas de membrana plasmática. (A) Las proteínas se autoensamblan y forman grandes agregados (como en el caso de la bacteriorrodopsina en la membrana púrpura de *Halobacterium*); están trabadas por interacciones con agregados macromoleculares del exterior (B) o del interior (C) de la célula; o interactúan con proteínas de la superficie de otra célula (D).



Figura 10–40 Electromicrografía de barrido de un eritrocito humano. <GTAC> Las células tienen una sombra bicóncava y carecen de núcleo y de los otros orgánulos. (Cortesía de Bernadette Chailley.)

(**Figura 10–42**) permanentes como en el caso del espermatozoide (véase Figura 10–38) o transitorios. Estas barreras se pueden detectar cuando se sigue la difusión de proteínas individuales de membrana mediante una sistema de alta velocidad. Las proteínas difunden rápidamente, pero están confinadas a un corral; sin embargo, en ocasiones los desplazamientos térmicos hacen que algunos filamentos corticales se desenganchen transitoriamente de la membrana, permitiendo que la proteína se escape a un corral adyacente.

La intensidad con la que una proteína transmembrana está confinada en un corral depende de su asociación con otras proteínas y del tamaño de su dominio citoplasmático;

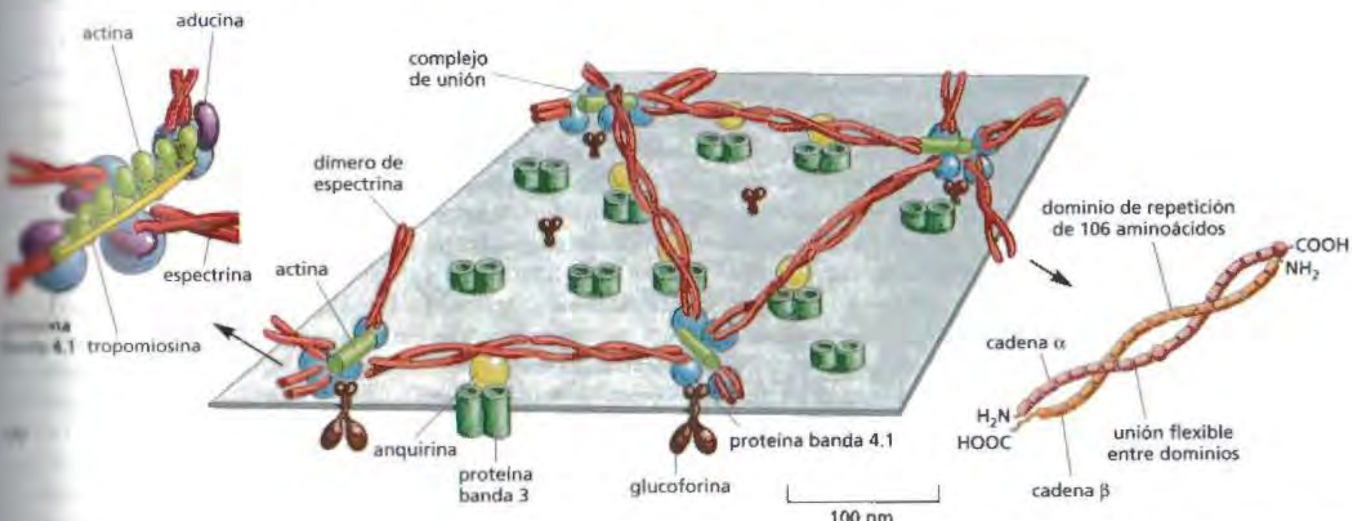
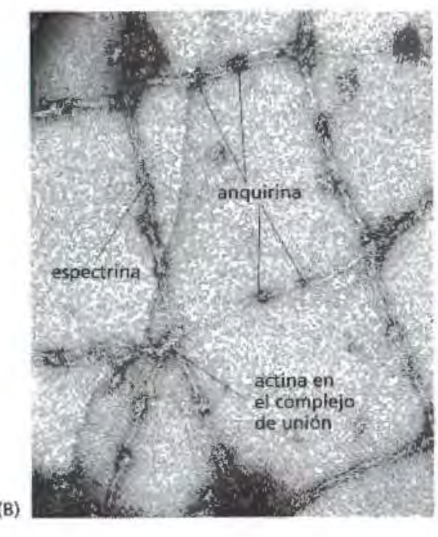


Figura 10–41 El citoesqueleto basado en la espectrina, en el lado citosólico de la membrana plasmática del eritrocito humano. (A) La disposición que se muestra en el esquema se ha deducido principalmente a partir de estudios sobre las interacciones *in vitro* de proteínas purificadas. Los dímeros de espectrina (aumentados en la figura de la *derecha*) se hallan unidos formando una red por medio de complejos de unión (aumentados en la figura de la *izquierda*). Cada heterodímero de espectrina está formado por dos cadenas polipeptídicas flexibles antiparalelas, entrelazadas de forma laxa, llamadas α y β. Las dos cadenas están unidas entre sí de manera no-covalente en múltiples puntos, incluyendo los dos extremos terminales. Ambas cadenas, α y β, están formadas por largos dominios repetidos. Los complejos de unión están compuestos por cortos filamentos de actina (que contienen 13 monómeros de actina), *banda 4.1*, *aducina* y una molécula de *tropomiosina*, que probablemente determina la longitud de los filamentos de actina. El citoesqueleto está unido a la membrana mediante dos proteínas transmembrana: una proteína de paso múltiple llamada *banda 3* y una proteína de un solo paso llamada *glucoforina*. Los tetrámeros de espectrina se unen a algunas proteínas banda 3, a través de moléculas de *anquirina* y a glucoforina y banda 3 (no mostrado) a través de las proteínas banda 4.1. (B) La electromicrografía muestra el citoesqueleto de la cara citosólica de la membrana del eritrocito después de fijación y tinción negativa. La red de espectrina se ha estirado a propósito para permitir observar los detalles de su estructura. En una célula normal, la trama mostrada sería mucho más densa y ocuparía únicamente alrededor de una décima parte de esta área. (B, cortesía de T. Byers y D. Branton, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 82:6153–6157, 1985. Con la autorización de National Academy of Sciences.)



(B)

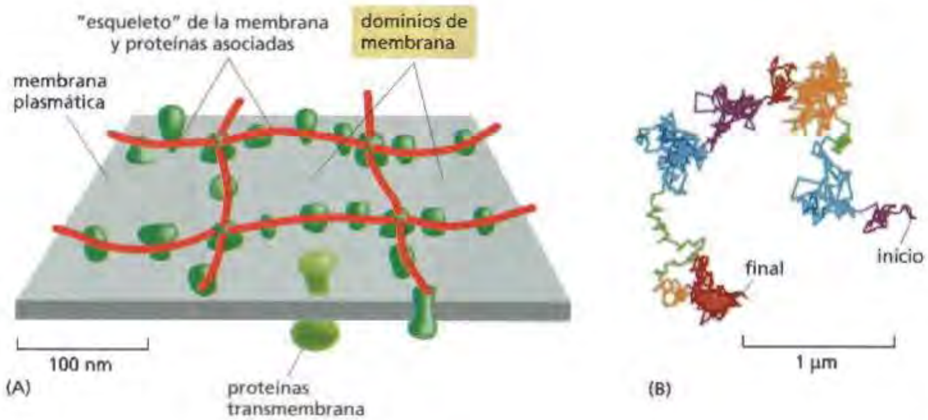


Figura 10–42 Acorralamiento de las proteínas de membrana por filamentos del citoesqueleto cortical. (A) De qué manera se supone que los filamentos del citoesqueleto proporcionan barreras de difusión que dividen la membrana en pequeños dominios o corrales. (B) Se ha utilizado el trazado de alta velocidad de una sola partícula para seguir el marcaje fluorescente de las proteínas de la membrana a lo largo del tiempo. El rastro muestra que las proteínas de membrana difunden dentro de un dominio de membrana claramente delimitado (mostrado en diferentes colores del trazo) y que sólo en raras ocasiones escapan a dominios vecinos. (Adaptado de A. Kusumi et al., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34:351-378, 2005. Con la autorización de Annual Reviews.)

las proteínas que tienen un dominio citoplasmático grande tendrán más dificultades para atravesar las barreras. Por ejemplo, cuando un receptor de superficie celular se une a su molécula señal extracelular, a su dominio citosólico se le unen grandes complejos proteicos dificultando al receptor que escape del corral en el que se encuentra. Parece que este efecto de los corrales ayuda a concentrar los complejos señal activados, incrementando la velocidad y la eficiencia de los procesos de señalización (se trata en el Capítulo 15).

Resumen

La bicapa lipídica determina la estructura básica de las membranas biológicas; las proteínas son las responsables de la mayoría de las funciones de las membranas, actuando de receptores específicos, enzimas, proteínas de transporte, etc. Muchas proteínas de membrana atraviesan la bicapa lipídica. Algunas son de paso único: la cadena de polipéptidos cruza la bicapa como una sola hélice α. Otras son proteínas de paso múltiple: su cadena polipeptídica cruza la bicapa varias veces, en series de hélices α o como láminas β en forma de barril. Todas las proteínas responsables del transporte transmembrana de iones y de otras pequeñas moléculas solubles en agua son proteínas de paso múltiple. Algunas proteínas asociadas a la membrana no atraviesan la bicapa y están unidas a una u otra cara de la membrana. Muchas de ellas se unen a proteínas transmembrana mediante interacciones no-covalentes, pero otras están unidas a la membrana por medio de enlaces covalentes a grupos lipídicos. En la membrana plasmática de todas las células eucariotas, la mayoría de las proteínas expuestas sobre la superficie celular y algunas de las moléculas lipídicas de la monocapa lipídica externa tienen cadenas de oligosacáridos unidas a ellas covalentemente. Como las moléculas lipídicas de la bicapa, muchas proteínas de membrana son capaces de difundir con rapidez en la membrana. Sin embargo, las células tienen sistemas para inmovilizar determinadas proteínas de membrana así como sistemas para confinar tanto proteínas de membrana como moléculas lipídicas o dominios particulares.

PROBLEMAS

¿Qué afirmaciones son ciertas? Explicar por qué sí o por qué no

10–1 A pesar de que las moléculas lipídicas son libres de difundir libremente en el plano de la bicapa, no pueden saltar (flip-flop) a través de ella a no ser que en la membrana haya catalizadores enzimáticos denominados translocadores de fosfolípidos.

10–2 Mientras que todos los carbohidratos de la membrana plasmática se encuentran de cara al exterior de la superficie externa de la célula, todos los carbohidratos de las membranas intracelulares se hallan de cara al citosol.

10–3 A pesar de que se conocen bien dominios de membrana con una composición diferente de proteínas, por ahora no hay ejemplos de dominios de membrana que se diferencien en su composición lipídica.



Figura P10–1 Una bicapa rota, con los bordes sellados mediante hipotéticas semimicelas (Problema 10–4).

Resolver los siguientes problemas

10–4 Cuando una bicapa lipídica está rota, ¿por qué no se suelda sola formando una "semimicela" en los extremos rotos, como se muestra en la **Figura P10–1**?



Figura P10–2 Estructuras de los dos lípidos marcados con nitróxido (Problema 10–7). El radical nitróxido se muestra en la parte *superior* y su posición de unión sobre el fosfolípido se muestra en la parte *inferior* de la figura.

10–5 La margarina está fabricada a base de aceites vegetales mediante un proceso químico. ¿Este proceso transforma los ácidos grasos saturados en insaturados o viceversa? Explicar la respuesta.

10–6 Si una balsa lipídica tiene típicamente 70 nm de diámetro y cada molécula lipídica tiene un diámetro de 0,5 nm, ¿cuántas moléculas tendría aproximadamente una balsa lipídica compuesta sólo de lípidos? A una relación de 50 moléculas de lípidos por cada molécula de proteína (un 50% de proteína en masa), ¿cuántas moléculas de proteína puede tener una balsa lipídica? (No tener en cuenta la pérdida de lípidos de la balsa que sería necesaria para poder acomodar las proteínas.)

10–7 Una publicación clásica estudia el comportamiento de lípidos en las dos monocapas de una membrana, marcando moléculas individuales con grupos nitróxido, que son radicales libres estables (**Figura P10–2**). Estos lípidos marcados con espín se pueden detectar con espectroscopia de resonancia de espín electrónica (ESR: *electron spin-resonance*), una técnica que no altera las células vivas. Los lípidos marcados con espín son introducidos en pequeñas vesículas lipídicas, que se funden con las células transfiriendo así los lípidos marcados a la membrana plasmática.

Los dos fosfolípidos marcados mostrados en la Figura P10–2 se incorporaron de esta forma a eritrocitos humanos intactos. Para determinar si se introdujeron en la misma cantidad en las dos monocapas de la bicapa, se añadió al medio ácido ascórbico (vitamina C), que es un agente reductor soluble en agua que no atraviesa las membranas, para que destruyera cualquier radical nitróxido expuesto al exterior de la célula. Se siguió la señal de ESR en función del tiempo en presencia y ausencia de ácido ascórbico, como se indica en la **Figura P10–3**A y B.

A. Ignorando por el momento la cantidad de señal ESR perdida, dar una explicación sobre por qué el fosfolípido 1 (Figura P10–3A) reacciona más rápidamente con el ascorbato que el fosfolípido 2 (Figura P10–3B). Tener en cuenta que la intensidad de la señal del fosfolípido 1 se estabiliza hacia los 15 minutos mientras que la del fosfolípido 2 necesita más de una hora.

B. Para investigar la diferencia cuantitativa de pérdida de señal ESR con los dos fosfolípidos, se repitieron los experimentos utilizando fantasmas de eritrocito que se habían vuelto a sellar para que fuesen impermeables al ascorbato (Figura P10–3 C y D). Los fantasmas resellados de eritrocito han perdido todo su citoplasma pero en cambio conservan intacta la membrana plasmática. En estos experimentos, la pérdida de señal ESR para ambos fosfolípidos fue negligible en ausencia de ácido ascórbico y se estabilizaba hacia el 50% en presencia de ácido ascórbico. ¿Cuál es el factor que puede ser el responsable de la diferencia de pérdida de señal ESR en los experimentos realizados con los fantasmas de eritrocito (Figura P10–3C y D) respecto a los realizados con las células intactas (Figura P10–3A y B)?

C. Los fosfolípidos marcados, ¿se introdujeron igualmente en las dos monocapas de la bicapa lipídica?

10–8 Los monómeros de las proteínas transmembrana de paso único atraviesan la membrana con una sola hélice α, la cual tiene unas propiedades químicas características en la región de la bicapa. ¿Cuál de las 3 secuencias de 20 aminoácidos mostradas más abajo es la candidata más probable de constituir un segmento transmembrana de este tipo? Explicar las razones de la elección. (Al final del libro aparece el código de aminoácidos de una letra; una regla nemotécnica para los aminoácidos hidrofóbicos es FAMILY VW.)

A. I T L I Y F G V M A G V I G T I L L I S
B. I T P I Y F G P M A G V I G T P L L I S
C. I T E I Y F G R M A G V I G T D L L I S

10–9 En un estudio sobre la unión de proteínas a la cara citoplasmática de células en cultivo de neuroblastoma, se utiliza un método que da una buena recuperación de vesículas invertidas (con la cara de la membrana plasmática, que al inicio era la interna, ahora hacia el exterior). Por desgracia, las preparaciones están contaminadas con cantidades variables de vesículas que no están invertidas (con las caras de la membrana en el mismo sentido que en la célula). Ningún procedimiento parece solucionar este problema. Alguien sugiere pasar las vesículas a través de una columna de afinidad fabricada a base de lectina acoplada a una matriz sólida. ¿Cuál es la base científica que sustenta esta sugerencia?

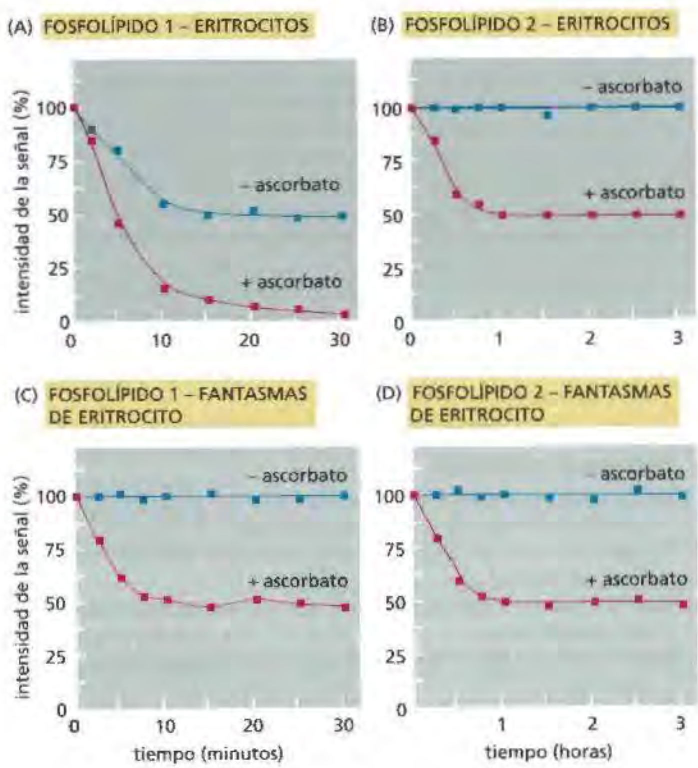


Figura P10–3 Disminución de la intensidad de la señal ESR en función del tiempo en eritrocitos intactos y en fantasmas de eritrocito, en presencia y en ausencia de ascorbato (Problema 10–7).
(A y B) fosfolípido 1 y fosfolípido 2 en células intactas.
(C y D) fosfolípido 1 y fosfolípido 2 en fantasmas de eritrocito.

10–10 **La glucoforina, una proteína de la membrana plasmática de los eritrocitos, por lo general se presenta como un homodímero que se mantiene gracias a las interacciones entre sus dominios transmembrana. Dado que los dominios transmembrana so[illegible] drofóbicos, ¿qué es lo que puede asociar uno con otro de una [illegible] ma tan específica?**

BIBLIOGRAFÍA

General

Bretscher MS (1973) Membrane structure:some general principles. *Science* 181:622–629.

Edidin M (2003) Lipids on the frontier:a century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:414–418.

Jacobson K et al (1995) Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* 268:1441–1442.

Lipowsky R & Sackmann E (eds) (1995) The structure and dynamics of membranes. Amsterdam: Elsevier.

Singer SJ & Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720–731.

La bicapa lipídica

Bevers EM, Comfurius P & Zwaal RF (1999) Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1439:317–330.

Devaux PF (1993) Lipid transmembrane asymmetry and flip-flop in biological membranes and in lipid bilayers. *Curr Opin Struct Biol* 3:489–494.

Dowhan W (1997) Molecular basis for membrane phospholipid diversity:why are there so many lipids? *Annu Rev Biochem* 66:199–232.

Hakomori Si SI (2002) Inaugural Article:The glycosynapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:225–232.

Harder T & Simons K (1997) Caveolae, DIGs, and the dynamics of s phingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* 9:534–542.

Hazel JR (1995) Thermal adaptation in biological membranes:is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu Rev Physiol* 57:19–42.

Ichikawa S & Hirabayashi Y (1998) Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol* 8:198–202.

Kornberg RD & McConnell HM (1971) Lateral diffusion of phospholipids in a vesicle membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:2564–2568.

Mansilla MC, Cybulski LE & de Mendoza D (2004) Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *J Bacteriol* 186:6681–6688.

McConnell HM & Radhakrishnan A (2003) Condensed complexes of cholesterol and phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 1610:159–73.

Pomorski T & Menon AK (2006) Lipid flippases and their biological functions. *Cell Mol Life Sci* 63:2908–2921.

Rothman JE & Lenard J (1977) Membrane asymmetry. *Science* 195:743–53.

Simons K & Vaz WL (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 33:269–95.

Tanford C (1980) The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes. New York: Wiley.

van Meer G (2005) Cellular lipidomics. *EMBO J* 24:3159–3165.

Proteínas de membrana

Bennett V & Baines AJ (2001) Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev* 81:1353–1392.

Bijlmakers MJ & Marsh M (2003) The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol* 13:32–42.

Branden C & Tooze J (1999) Introduction to Protein Structure, 2nd ed. New York: Garland Science.

Bretscher MS & Raff MC (1975) Mammalian plasma membranes. *Nature* 258:43–49.

Buchanan SK (1999) Beta-barrel proteins from bacterial outer membran[illegible] structure, function and refolding. *Curr Opin Struct Biol* 9:455–461.

Chen Y, Lagerholm BC & Jacobson K (2006) Methods to measure the la[illegible] diffusion of membrane lipids and proteins. *Methods* 39:147–153.

Curranb AR & Engelman DM (2003) Sequence motifs, polar interaction[illegible] conformational changes in helical membrane proteins. *Curr Opin Str[illegible]* 13:412

Deisenhofer J & Michel H (1991) Structures of bacterial photosynthetic reaction centers. *Annu Rev Cell Biol* 7:1–23.

Drickamer K & Taylor ME (1993) Biology of animal lectins. *Annu Rev Cell [illegible]* 9:237–64.

Drickamer K & Taylor ME (1998) Evolving views of protein glycosylatio[illegible] *Biochem Sci* 23:321–324.

Frye LD & Edidin M (1970) The rapid intermixing of cell surface antigen[illegible] formation of mouse-human heterokaryons. *J Cell Sci* 7:319–335.

Helenius A and Simons K (1975) Solubilization of membranes by deter[illegible] *Biochim Biophys Acta* 415:29–79.

Henderson R & Unwin PN (1975) Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* 257:28–32.

Kyte J & Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropa[illegible] character of a protein. *J Mol Biol* 157:105–132.

le Maire M, Champeil P et al (2000) Interaction of membrane proteins an[illegible] lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta* 1508:86–111

Lee AG (2003) Lipid-protein interactions in biological membranes:a struc[illegible] perspective. *Biochim Biophys Acta* 1612:1–40.

Marchesi VT, Furthmayr H et al (1976) The red cell membrane. *Annu Rev Biochem* 45:667–698.

Nakada C, Ritchie K & Kusumi A (2003) Accumulation of anchored protei[illegible] forms membrane diffusion barriers during neuronal polarization. *Nat C[illegible] Biol* 5:626–632.

Oesterhelt D (1998) The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea. *Curr Opin Struct Biol* 8:489–500.

Reig N & van der Goot FG (2006) About lipids and toxins. *FEBS Lett* 580:5572–5579.

Reithmeier RAF (1993) The erythrocyte anion transporter (band 3) *Curr O[illegible] Cell Biol* 7:707–714.

Rodgers W & Glaser M (1993) Distributions of proteins and lipids in the erythrocyte membrane. *Biochemistry* 32:12591–12598.

Sharon N & Lis H (2004) History of lectins:from hemagglutinins to biolog[illegible] recognition molecules. *Glycobiology* 14:53R–62R.

Sheetz MP (2001) Cell control by membrane-cytoskeleton adhesion. *Nat [illegible] Mol Cell Biol* 2:392–396.

Silvius JR (1992) Solubilization and functional reconstitution of biomemb[illegible] components. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 21:323–348.

Steck TL (1974) The organization of proteins in the human red blood cell membrane. A review. *J Cell Biol* 62:1–19.

Subramaniam S (1999) The structure of bacteriorhodopsin:an emerging consensus. *Curr Opin Struct Biol* 9:462–468.

Viel A & Branton D (1996) Spectrin:on the path from structure to function. [illegible] *Opin Cell Biol* 8:49–55.

Wallin E & von Heijne G (1998) Genome-wide analysis of integral membra[illegible] proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein S[illegible]* 7:1029–1038.

White SH & Wimley WC (1999) Membrane protein folding and stability:physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28:319–365.

Transporte de moléculas pequeñas a través de la membrana y las propiedades eléctricas de las membranas

11

Debido a su interior hidrofóbico, la bicapa lipídica de una célula impide el paso a la mayoría de las moléculas polares. Esta función de barrera permite a la célula mantener en su citosol ciertos solutos a concentraciones diferentes a las que están en el fluido extracelular y en cada uno de los compartimientos intracelulares delimitados por una membrana. Sin embargo, para aprovecharse de esta barrera las células han tenido que desarrollar sistemas para transportar moléculas hidrosolubles e iones a través de sus membranas de forma específica y así poder incorporar los nutrientes esenciales, excretar los productos residuales del metabolismo y regular las concentraciones intracelulares de iones. Las células utilizan proteínas transmembrana para transportar iones inorgánicos y pequeñas moléculas orgánicas hidrosolubles a través de la bicapa. También pueden transferir macromoléculas e incluso grandes partículas a través de sus membranas, pero los mecanismos que intervienen en estos casos son muy diferentes de los utilizados para transferir pequeñas moléculas, por lo que se estudian en los Capítulos 12 y 13. La importancia del transporte a través de las membranas queda reflejada en el elevado número de genes que en todos los organismos codifican proteínas transportadoras, las cuales llegan a representar entre el 15 y el 30% de las proteínas de membrana de las células. Algunas células de mamífero muy especializadas pueden llegar a destinar hasta los dos tercios de su consumo total de energía metabólica a los procesos de transporte a través de la membrana.

Iniciamos este capítulo describiendo algunos principios generales sobre la manera en que las pequeñas moléculas cruzan las membranas celulares. A continuación, se consideran las dos clases principales de proteínas de membrana que median el tráfico de moléculas hacia un lado y otro de las bicapas lipídicas: los *transportadores*, los cuales tienen partes móviles que les permiten transportar moléculas de forma específica a través de la membrana, y los *canales*, que forman un estrecho poro hidrofóbico que permite el desplazamiento pasivo de pequeños iones inorgánicos a través de la membrana. Los transportadores pueden acoplarse a una fuente de energía y catalizar un transporte activo; la combinación de una permeabilidad selectiva pasiva y un transporte activo genera grandes diferencias de composición del citosol respecto al fluido extracelular (**Tabla 11–1**) o al fluido del interior de los orgánulos delimitados por membrana. Generando diferencias de concentración iónica a través de la bicapa lipídica, las membranas celulares son capaces de almacenar energía potencial en forma de gradientes electroquímicos, que dirigen varios procesos de transporte, transportan señales eléctricas en células excitables eléctricamente y fabrican la mayor parte del ATP celular en mitocondrias, cloroplastos y bacterias. La descripción se centra en el transporte a través de la membrana plasmática, pero en las otras membranas de la célula eucariota actúan mecanismos similares, como se expondrá en capítulos posteriores.

En la última parte de este capítulo, la atención se focaliza en las funciones de los canales iónicos de las neuronas (las células nerviosas). En estas células, los canales adquieren su máximo nivel de sofisticación y se desarrollan las extraordinarias características del cerebro.

En este capítulo

PRINCIPIOS DEL TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA MEMBRANA	651
TRANSPORTADORES Y TRANSPORTE ACTIVO A TRAVÉS DE LA MEMBRANA	655
CANALES IÓNICOS Y PROPIEDADES ELÉCTRICAS DE LAS MEMBRANAS	667

PRINCIPIOS DEL TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA MEMBRANA

Al inicio de esta sección se describen las propiedades de permeabilidad de bicapas lipídicas sintéticas, libres de proteína. A continuación, introducimos algunos términos utilizados

Tabla 11–1 Comparación de las concentraciones de iones dentro y fuera de una célula de mamífero típica

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN INTRACELULAR (mM)	CONCENTRACIÓN EXTRACELULAR (mM)
Cationes		
Na^+	5-15	145
K^+	140	5
Mg^{2+}	0,5	1-2
Ca^{2+}	10^{-4}	1-2
H^+	7×10^{-5} ($10^{-7,2}$ M o pH 7,2)	4×10^{-5} ($10^{-7,4}$ M o pH 7,4)
Aniones*		
Cl^-	5-15	110

* La célula debe contener cantidades iguales de cargas positivas y negativas, es decir, ha de ser neutra desde un punto de vista eléctrico. Así, además del Cl^-, la célula contiene muchos otros aniones que no figuran en esta tabla; de hecho, la mayoría de los constituyentes de la célula están cargados negativamente (HCO_3^-, PO_4^{3-}, proteínas, ácidos nucleicos, metabolitos con grupos fosfato o carbonilo, etc.). Las concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} que se proporcionan se refieren al ion libre. La concentración en la célula de Mg^{2+} es de unos 20 mM y la de Ca^{2+} de 1-2 mM, pero ambos iones están mayoritariamente unidos a las proteínas y a otras moléculas y, en el caso del Ca^{2+}, almacenado en diferentes orgánulos.

para describir los diversos tipos de transporte a través de la membrana y algunas estrategias para caracterizar las proteínas y los procesos que participan en ellos.

Las bicapas lipídicas libres de proteína tienen un alto grado de impermeabilidad a los iones

Con tiempo suficiente, casi cualquier molécula acabará difundiendo a través de una bicapa lipídica libre de proteína a favor de su gradiente de concentración. Sin embargo, la velocidad de difusión varía en gran medida, dependiendo en parte del tamaño de la molécula y, sobre todo, de su solubilidad relativa en aceite. En general, cuanto menor es la molécula y cuanto más soluble en aceite (es decir, cuanto más hidrófoba o no polar es) más rápidamente difunde a través de una bicapa. Las moléculas pequeñas no polares, como el O_2 y el CO_2, se disuelven con facilidad en las bicapas lipídicas y, por lo tanto, difunden con rapidez a través de ellas. Las moléculas pequeñas polares pero no cargadas, como el agua o la urea, también difunden a través de una bicapa, aunque mucho más despacio (**Figura 11–1**). Por el contrario, las bicapas lipídicas son muy impermeables a todas las moléculas *cargadas* (iones), por muy pequeñas que sean: la carga y el elevado grado de hidratación de tales moléculas les impiden penetrar en la fase hidrocarbonada de la bicapa. Así, las bicapas lipídicas sintéticas son 10^9 veces más permeables al agua que a los iones, incluso a los de tamaño tan reducido como el Na^+ o el K^+ (**Figura 11–2**).

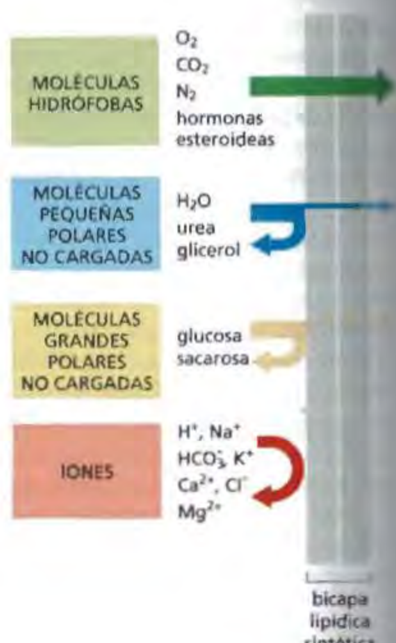


Figura 11–1 Permeabilidad relativa de una bicapa lipídica sintética a diferentes clases de moléculas. Cuanto menor es la molécula y, lo que es más importante, cuanto menos se asocia al agua, más rápidamente difunde a través de la bicapa.

Existen dos clases principales de proteínas de transporte a través de la membrana: transportadores y canales

Como las bicapas lipídicas sintéticas, las membranas celulares permiten el paso por simple difusión del agua y de las moléculas no polares. Sin embargo, las membranas celulares también son permeables a diversas moléculas polares que atraviesan con gran lentitud las bicapas lipídicas sintéticas, tales como iones, azúcares, aminoácidos, nucleótidos y muchos metabolitos celulares. Unas proteínas de membrana especiales transfieren estos solutos a través de las membranas celulares. Estas proteínas, que reciben el nombre de **proteínas de transporte a través de la membrana**, se presentan en muchas formas y en todos los tipos de membranas biológicas. Cada proteína está destinada al transporte de una clase particular de moléculas (como iones, azúcares o aminoácidos) y con frecuencia únicamente de una cierta especie molecular de la clase. Estudios realizados a mediados de de la década de 1950 encontraron que unas bacterias con una sola mutación en un solo gen eran incapaces de transportar azúcares a través de su membrana plasmática, demostrando así la especificidad

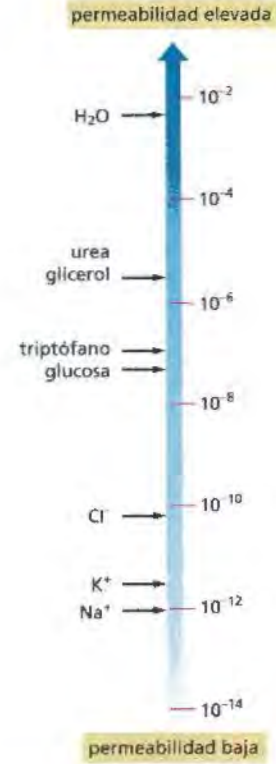


Figura 11–2 Coeficientes de permeabilidad para el paso de diferentes moléculas a través de bicapas lipídicas sintéticas. La velocidad de flujo de un soluto a través de la bicapa es directamente proporcional a la diferencia de concentración a ambos lados de la membrana. Multiplicando esta diferencia de concentración (en mol/cm^3) por el coeficiente de permeabilidad (en cm/seg), se obtiene el flujo del soluto en moles por segundo y por centímetro cuadrado de membrana. Por ejemplo, una diferencia de concentración del triptófano de 10^{-4} mol/cm^3 ($10^{-4}/10^{-3}$ L = 0,1 M) generaría un flujo de 10^{-4} mol/cm$^3 \times 10^{-7}$ cm/seg = 10^{-11} mol/seg a través de 1 cm^2 de membrana o 6×10^4 moléculas por segundo a través de 1 μm^2 de membrana.

de las proteínas transportadoras de membrana. Actualmente sabemos que los humanos que presentan mutaciones similares a ésta sufren diversas enfermedades hereditarias, las cuales afectan al transporte de un soluto determinado en el riñón, en el intestino o en otros tipos celulares. Por ejemplo, los individuos que presentan la enfermedad genética *cistinuria* no pueden transportar ciertos aminoácidos (incluyendo la cistina, el dímero formado por la unión mediante un enlace disulfuro de dos cisteínas) tanto desde la orina como desde el intestino hacia la sangre; la acumulación de cistina en la orina provoca la formación de piedras de cistina en los riñones.

Todas las proteínas de transporte a través de la membrana, que han sido estudiadas con detalle suficiente para poder establecer su orientación en la membrana, son proteínas transmembrana multipaso, es decir, cuya cadena polipeptídica atraviesa la membrana varias veces. Estas proteínas forman una vía continua de proteína a través de la membrana, permitiendo el transporte de solutos hidrófilos específicos a través de la membrana sin que lleguen a entrar en contacto directo con el interior hidrófobo de la bicapa lipídica.

Existen dos clases mayoritarias de proteínas de transporte de membrana: los transportadores y los canales (**Figura 11–3**). Los **transportadores** (también denominados *carriers* o *permeasas*) se unen al soluto que va a ser transportado específicamente y sufren una serie de cambios conformacionales que permiten la transferencia del soluto a través de la membrana. Por otro lado, los **canales** interactúan con el soluto que va a ser transportado de una forma mucho más débil. Forman poros acuosos que atraviesan la bicapa lipídica; cuando estos poros se abren, permiten que determinados solutos (por lo general, iones inorgánicos de tamaño y carga apropiados) puedan pasar a su través y, por lo tanto, atravesar la membrana. No sorprende que el transporte a través de los canales se produzca a una velocidad mucho mayor que a través de los transportadores. A pesar de que el agua puede difundir a través de las bicapas lipídicas sintéticas, todas las células contienen proteínas canal específicas (llamadas *canales de agua* o *acuaporinas*) que aumentan notablemente la permeabilidad de estas membranas al agua, como veremos más adelante.

El transporte activo está mediado por transportadores acoplados a una fuente energética

Todos los canales y muchos transportadores sólo permiten que los solutos atraviesen la membrana de forma pasiva ("cuesta abajo"), un proceso llamado **transporte pasivo** o **difusión facilitada**. Si la molécula transportada carece de carga, la dirección del transporte pasivo sólo depende de la diferencia de concentración a los dos lados de la membrana (su *gradiente de concentración*) (**Figura 11–4A**).

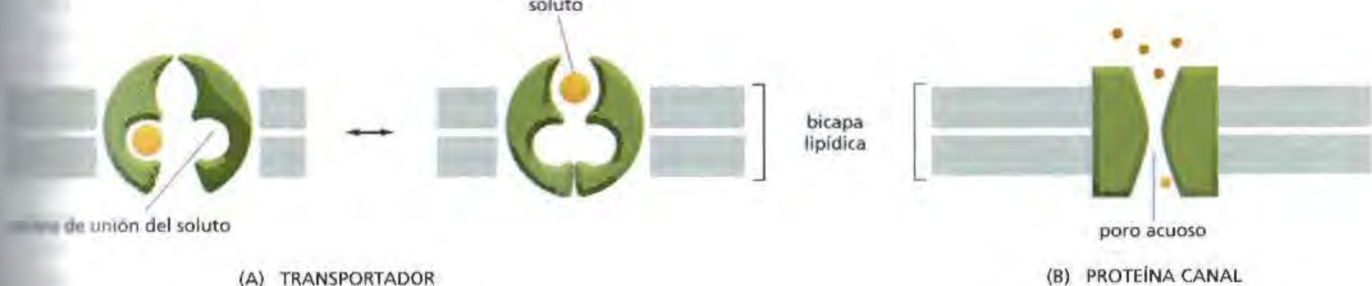


Figura 11–3 Transportadores y canales proteicos. (A) Los transportadores alternan dos conformaciones, de modo que el centro de unión al soluto queda accesible, de forma secuencial, a un lado y a otro de la bicapa. (B) Por el contrario, un canal forma un poro acuoso a través de la bicapa por el cual difunden los solutos específicos de ese canal.

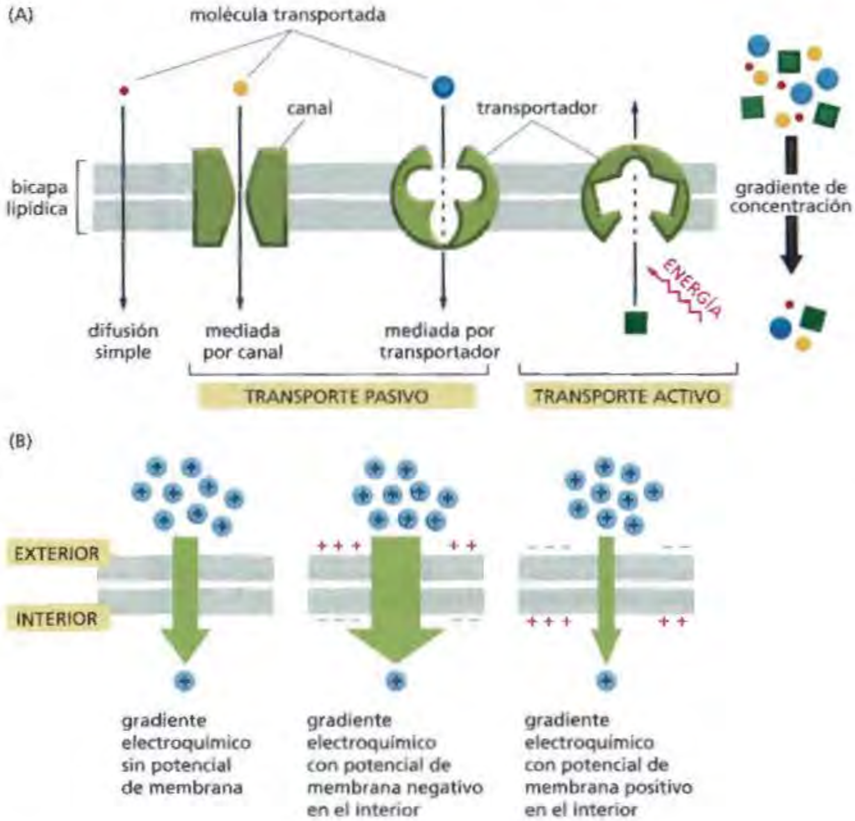


Figura 11–4 Comparación entre los procesos de transporte activo y pasivo. (A) El transporte pasivo que se desarrolla a favor del gradiente electroquímico tiene lugar espontáneamente, ya sea por difusión simple, a través de la bicapa lipídica, o por difusión facilitada mediante canales y transportadores pasivos. Por el contrario, el transporte activo requiere el aporte de energía metabólica y siempre tiene que ser realizado por transportadores que obtienen energía metabólica para bombear el soluto contra su gradiente electroquímico. (B) Un gradiente electroquímico combina el potencial de membrana y el gradiente de concentración que pueden actuar en el mismo sentido, incrementando la fuerza impulsora de un ion a través de la membrana (*centro*) o uno en contra del otro (*derecha*).

Sin embargo, si el soluto tiene una carga neta, su transporte se ve influido tanto por su gradiente de concentración como por el gradiente eléctrico a través de la membrana (el *potencial de membrana*). El gradiente de concentración y el gradiente eléctrico se combinan generando la fuerza neta de dirección de flujo, o **gradiente electroquímico**, para cada soluto cargado (Figura 11–4B). En el Capítulo 14 se tratan los gradientes electroquímicos más detalladamente. De hecho, casi todas las membranas plasmáticas tienen una diferencia de potencial (gradiente de voltaje) a través de ellas, siendo habitualmente el interior negativo con respecto al exterior. Esta diferencia de potencial favorece la entrada a las células de iones cargados positivamente y se opone a la entrada de iones cargados negativamente.

Las células también necesitan proteínas transportadoras que bombeen de forma activa ciertos solutos a través de la membrana en contra de sus gradientes electroquímicos ("cuesta arriba"); este proceso, conocido como **transporte activo**, está mediado por transportadores, también llamados *bombas*. En el transporte activo, la actividad bombeadora del transportador es direccional ya que, tal como explicaremos más adelante, está acoplada a una fuente de energía metabólica como la hidrólisis del ATP o a un gradiente iónico. Así pues, el desplazamiento transmembrana de pequeñas moléculas mediado por transportadores puede ser activo o pasivo, mientras que el transporte mediado por canales siempre es pasivo.

Resumen

Las bicapas lipídicas son altamente impermeables a la mayoría de moléculas polares. Para transportar pequeñas moléculas solubles en agua hacia el interior o hacia el exterior de las células o de los compartimientos intracelulares delimitados por membranas, las membranas celulares contienen varias proteínas de transporte, cada una de las cuales es responsable de transferir un determinado soluto o una clase de solutos a través de la membrana. Existen dos clases de proteínas de transporte a través de la membrana: transportadores y canales. Ambas forman vías continuas de transporte a través de la bicapa lipídica. Mientras que el desplazamiento a través de las membranas mediado por transportadores puede ser activo o pasivo, el mediado por canales es siempre pasivo.



Figura 11-5 Modelo de cómo un cambio conformacional en un transportador puede mediar el desplazamiento pasivo de un soluto. El transportador del ejemplo puede existir en dos conformaciones: en el estado A, los centros de unión al soluto están expuestos hacia el exterior de la bicapa lipídica; en el estado B, estos mismos centros están expuestos hacia el otro lado de la membrana. La transición entre ambos estados puede ocurrir de forma aleatoria. Es completamente reversible y no depende de si el centro de unión al soluto está ocupado o no. Así pues, si la concentración del soluto es mayor en el exterior de la bicapa, se unirán más moléculas de soluto al transportador en la conformación A que en la B y habrá un transporte neto del soluto a favor de su gradiente de concentración (o, si el soluto es un ion, a favor de su gradiente electroquímico).

TRANSPORTADORES Y TRANSPORTE ACTIVO A TRAVÉS DE LA MEMBRANA

El proceso por el cual un transportador transfiere una molécula de soluto a través de la bicapa lipídica se parece a una reacción enzima-sustrato y en muchos aspectos los transportadores se comportan como enzimas. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre con las reacciones enzima-sustrato habituales, el transporte no modifica el soluto transportado sino que es transferido, inalterado, al otro lado de la membrana.

Cada tipo de transportador tiene uno o más lugares de unión específicos para su soluto (sustrato). El transportador transfiere el soluto a través de la bicapa lipídica mediante una serie de cambios conformacionales reversibles que exponen de manera alterna el centro de unión al soluto, primero hacia un lado de la membrana,y luego hacia el otro lado de la membrana. En la **Figura 11-5** se muestra un modelo esquemático de cómo se cree que actúa un transportador. Cuando el transportador está saturado (es decir, cuando todos sus centros de unión están ocupados), la velocidad de transporte es máxima. Esta velocidad, indicada como V_{max} (*V* de velocidad) es característica del transportador. La V_{max} mide la velocidad a la que el transportador puede saltar entre sus dos estados conformacionales Además, cada transportador tiene una afinidad característica para su soluto, reflejada en la K_m de la reacción que es igual a la concentración de soluto necesaria para que la velocidad de transporte sea la mitad del valor máximo (**Figura 11-6**). Como con las enzimas, la unión del soluto puede ser bloqueada específicamente por inhibidores competitivos (que compiten por el mismo lugar de unión y que pueden ser transportados o no) o por inhibidores no competitivos (que se unen en algún otro lugar y que alteran específicamente la estructura del transportador).

Como se describirá más adelante, sólo se requiere una modificación relativamente pequeña del modelo mostrado en la Figura 11-5 para unir un transportador a una fuente de energía y poder bombear el soluto en contra de su gradiente electroquímico. Las células realizan este transporte activo de tres maneras principales (**Figura 11-7**):

1. Los *transportadores acoplados* acoplan el transporte en contra de gradiente de un soluto con el transporte a favor de gradiente de otro.
2. Las *bombas impulsadas por ATP* acoplan el transporte en contra de gradiente a la hidrólisis de ATP.
3. Las *bombas impulsadas por luz*, descritas principalmente en bacterias y arqueas, acoplan el transporte en contra de gradiente a la entrada de energía luminosa, como en el caso de la bacteriorrodopsina (descrito en el Capítulo 10).

Las comparaciones de las secuencias de aminoácidos sugieren que, en muchos casos, hay grandes semejanzas en el diseño molecular entre las proteínas que realizan un transporte activo y las que median un transporte pasivo. Por ejemplo, algunos transportadores bacterianos, que utilizan la energía almacenada en el gradiente de H^+ a través de la membrana plasmática para dirigir la captación activa de varios azúcares, son estructuralmente similares a los transportadores que median el transporte pasivo de glucosa en la mayoría de las células animales. Este hecho sugiere una relación evolutiva entre las diferentes proteínas transportadoras y, dada la importancia de los metabolitos de pequeño tamaño y los azúcares como fuentes de energía, no es sorprendente que la superfamilia de los transportadores sea muy antigua.

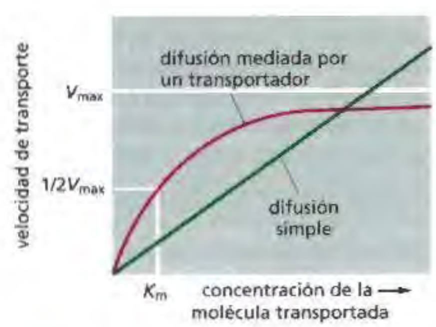


Figura 11-6 Cinética de la difusión simple y de la difusión mediada por un transportador. Mientras que la velocidad de la difusión simple es siempre proporcional a la concentración de soluto, la velocidad de la difusión mediada por un transportador alcanza un máximo (V_{max}) cuando el transportador está saturado. La concentración de soluto en el momento en que la velocidad de transporte es la mitad de su valor máximo se aproxima a la constante de unión (K_m) del transportador para el soluto y es análoga a la K_m de una enzima por su sustrato. La gráfica sólo se refiere a un transportador de un solo sustrato; la cinética del transporte acoplado de dos o más sustratos es más compleja.

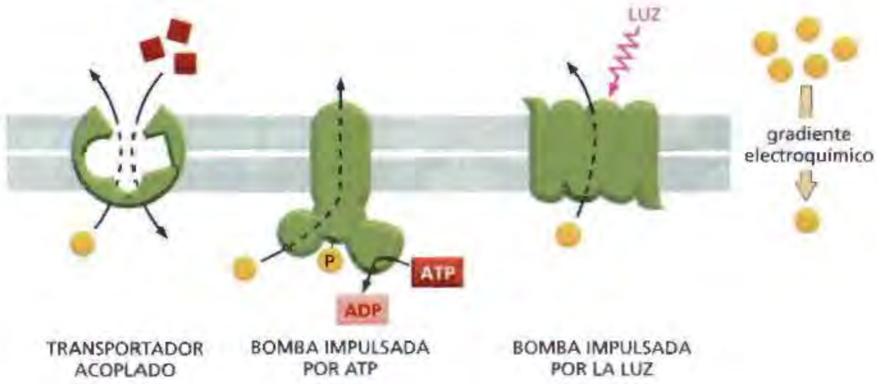


Figura 11–7 Tres maneras de impulsar el transporte activo. La molécula transportada activamente se muestra en *amarillo* y la fuente de energía, en *rojo*.

Vamos a empezar la exposición sobre el transporte activo considerando los transportadores que utilizan gradientes iónicos. Estas proteínas desempeñan en todas las células un papel crucial en el transporte de metabolitos de pequeño tamaño a través de las membranas. A continuación se describirán las bombas de ATP, incluyendo la bomba de Na^+ que se halla en la membrana plasmática de casi todas las células.

El transporte activo puede ser dirigido por gradientes iónicos

Algunos transportadores median el desplazamiento de un soluto de un lado a otro de la membrana a una velocidad determinada por su V_{max} y por la K_m. Reciben el nombre de **uniportadores.** Otros actúan como *transportadores acoplados*, en los que la transferencia de un soluto depende estrictamente del transporte de otro. El transporte acoplado supone la transferencia simultánea de un segundo soluto en la misma dirección, realizado por los **simportadores** (también llamados *cotransportadores*) o la transferencia de un segundo soluto en sentido contrario, como es el caso de los **antiportadores** (también llamados *intercambiadores*) (**Figura 11–8**).

El estrecho acoplamiento entre la transferencia de los dos solutos permite que estos transportadores acoplados utilicen la energía almacenada en el gradiente electroquímico de un soluto, típicamente un ion, para transportar el otro. De esta manera, la energía libre liberada durante el desplazamiento del ion inorgánico a favor de su gradiente electroquímico se utiliza como fuerza impulsora para bombear otros solutos en contra de sus gradientes electroquímicos. Este principio funciona en ambas direcciones; algunos transportadores acoplados actúan como simportadores, otros como antiportadores. En la membrana plasmática de las células animales, el ion cotransportado cuyo gradiente electroquímico proporciona la fuerza impulsora, que permite el transporte activo de la segunda molécula, suele ser el Na^+. El Na^+ que entra en la célula durante el transporte es posteriormente bombeado al exterior mediante una bomba de sodio impulsada por ATP, situada en la membrana plasmática (como explicaremos más adelante) la cual, al mantener el gradiente de Na^+, impulsa indirectamente el transporte de otras moléculas que se cotransportan con el Na^+. (Por esta razón se dice que los transportadores impulsados por iones median *transportes activos*

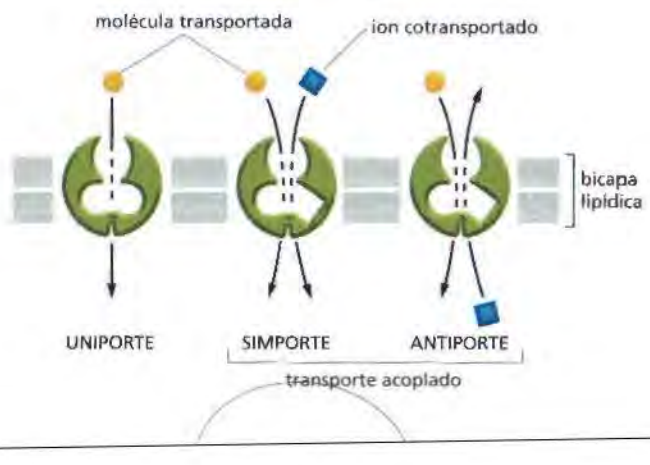


Figura 11–8 Tres tipos de desplazamiento mediado por transportador. <ACCC> Este esquema muestra transportadores que actúan como uniportadores (transportador sencillo), simportadores (transportador acoplado unidireccional) y como antiportadores (transportador acoplado de intercambio).

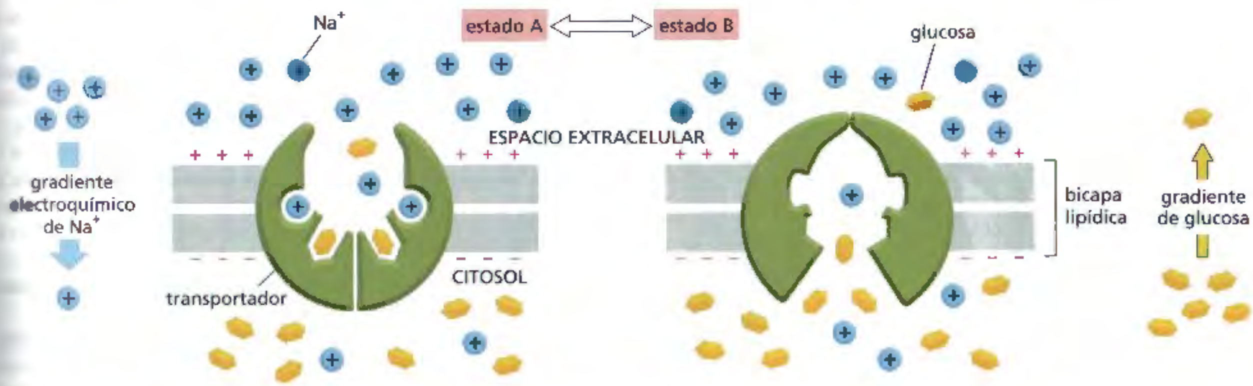


Figura 11–9 **Modelo de cómo el transportador de glucosa puede ser impulsado por el gradiente de Na^+.** Igual que en el modelo de la Figura 11–5, el transportador oscila entre dos estados alternos, A y B. En el estado A, la proteína está abierta hacia el espacio extracelular; en el estado B, está abierta hacia el citosol. Las uniones de Na^+ y de glucosa son cooperativas, es decir, la unión de cualquiera de los ligandos induce un cambio conformacional que incrementa la afinidad de la proteína por el otro ligando. Como la concentración de Na^+ es mucho mayor en el espacio extracelular que en el citosol, la glucosa tiene más probabilidades de unirse al transportador en el estado A. De esta manera, tanto el Na^+ como la glucosa entrarán en la célula (mediante una transición A → B) mucho más frecuentemente de lo que saldrán de ella (mediante una transición B → A). El resultado global es el transporte neto tanto del Na^+ como de la glucosa al interior de la célula. Hay que resaltar que, dado que la unión es cooperativa, la ausencia de uno de los ligandos impide que el otro se pueda unir al transportador. Así, el transportador sólo puede sufrir el cambio conformacional entre los dos estados si tiene unidos ambos solutos o ninguno.

secundarios, mientras que los transportadores impulsados por ATP median *transportes activos primarios*.)

Por ejemplo, las células epiteliales del intestino y del riñón contienen varios simportadores a través de la membrana plasmática que son impulsados por el gradiente de Na^+. Cada simportador dirigido por Na^+ es específico para el transporte de un pequeño grupo de azúcares o de aminoácidos relacionados entre sí. En estos sistemas, el soluto y el Na^+ se unen a diferentes lugares de la proteína transportadora; el Na^+ tiende a entrar en la célula a favor de su gradiente electroquímico por lo que, en cierto sentido, "arrastra" al azúcar o al aminoácido hacia el interior de la célula. Cuanto mayor sea el gradiente electroquímico de Na^+, mayor será la velocidad de entrada del soluto a la célula; por el contrario, si la concentración de Na^+ en el fluido extracelular se reduce, el transporte del soluto disminuye (**Figura 11–9**).

En bacterias y en levaduras, así como en muchos orgánulos delimitados por membranas de las células animales, la mayoría de los sistemas de transporte activo impulsados por gradientes iónicos dependen del gradiente de H^+ y no del de Na^+, lo cual refleja la predominancia en estas membranas de las bombas de H^+ y la práctica ausencia de bombas de Na^+. El gradiente electroquímico de H^+ dirige el transporte activo de muchos azúcares y aminoácidos a través de la membrana plasmática y hacia el interior de las células bacterianas. Un simportador impulsado por H^+ muy bien estudiado es la **permeasa de lactosa**, que transporta lactosa a través de la membrana plasmática de *E. coli*. Estudios biofísicos y estructurales de la permeasa así como de formas mutantes de la proteína han llevado a proponer un modelo detallado sobre cómo actúa este simportador. La permeasa está formada por 12 hélices α transmembrana empaquetadas de manera muy laxa. Durante el ciclo de transporte, algunas de las hélices sufren pequeños deslizamientos que les hacen colisionar. Estos movimientos permiten abrir y cerrar de forma alternativa una hendidura entre las hélices, exponiendo los centros de unión para la lactosa y los H^+, primero hacia un lado de la membrana y luego hacia el otro lado (**Figura 11–10**).

Los transportadores de la membrana plasmática regulan el pH citosólico

La mayoría de proteínas actúan de forma óptima a un pH determinado. Por ejemplo, las enzimas lisosomales actúan mejor a pH bajo (~5) de los lisosomas mientras que las enzimas citosólicas actúan mejor a pH casi neutro (~7,2) del citosol. Por lo tanto, resulta crucial que las células controlen el pH de sus compartimientos intracelulares.

La mayoría de las células tienen en su membrana plasmática uno o varios tipos de sistemas de transporte de intercambio impulsados por Na^+ que regulan el pH citosólico manteniéndolo alrededor de 7,2. Estos transportadores utilizan la energía almacenada en el gradiente de Na^+ para reducir la acidez eliminando el exceso de iones H^+ que se han filtrado al interior o que se han producido en la célula a consecuencia de las reacciones que generan H^+. Se utilizan dos mecanismos: los H^+ son transportados directamente al exterior de la célula o se importa HCO_3^- al interior de la célula para neutralizar los H^+ del citosol (según la reacción $HCO_3^- + H^+ \rightarrow H_2O + CO_2$).Uno de estos antiportadores que utiliza el primer mecanismo es el *intercambiador* Na^+/H^+, que acopla la entrada de Na^+ a la salida de H^+. Otro antiportador, que utiliza una combinación de ambos mecanismos, es el *intercambiador* $Na^+/Cl^-/HCO_3^-$ que acopla la entrada de Na^+ y de HCO_3^- a la salida de Cl^- y H^+ (de forma que

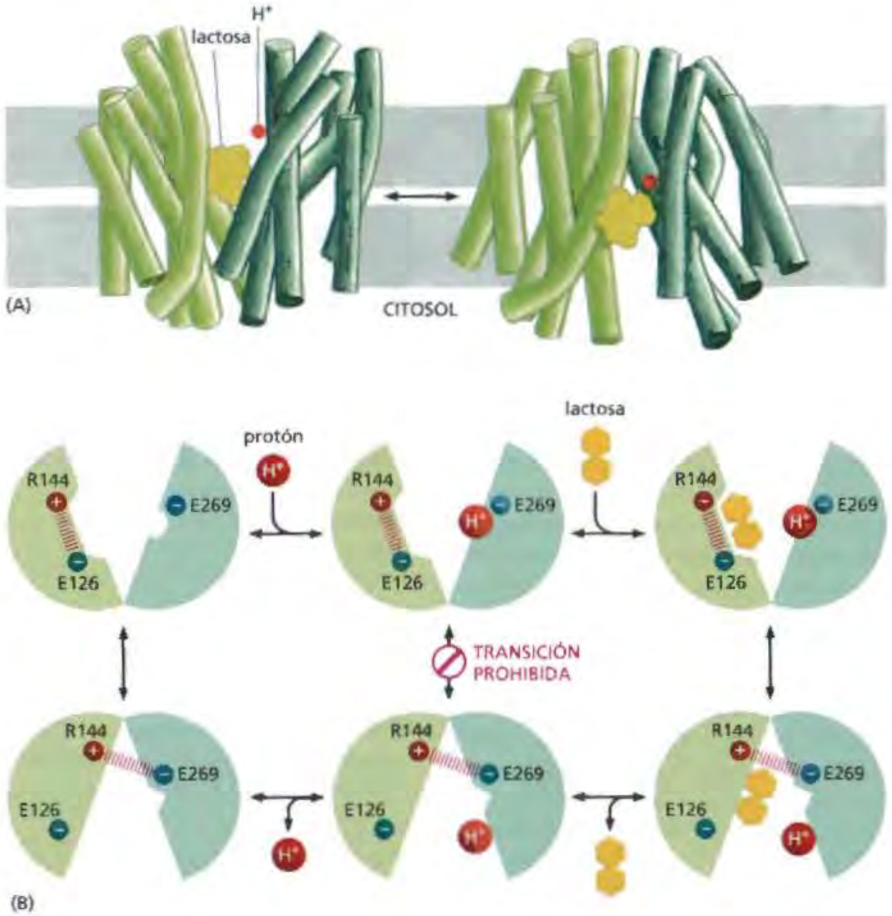


Figura 11–10 Mecanismo molecular de la permeasa de lactosa propuesto a partir de su estructura cristalina. (A) Las 12 hélices transmembrana de la permeasa se agrupan en dos lóbulos, dibujados en dos tonos de *verde*. Se han omitido los bucles que conectan las hélices en ambos lados de la membrana para mayor claridad. Durante el transporte, las hélices se desplazan e inclinan en la membrana, dejando expuestos los sitios de unión para el disacárido lactosa (*amarillo*) y H^+ a ambos lados de la membrana. (B) En un estado conformacional, los sitios de unión para los iones H^+ y para la lactosa son accesibles en el espacio extracelular (*fila superior*); en el otro, quedan expuestos en el citosol (*fila inferior*). La carga de solutos en la cara extracelular está favorecida porque la arginina (R) 144 forma un enlace con el ácido glutámico (E) 126, dejando libre el E269 para aceptar H^+. La descarga de los solutos en la cara citosólica está favorecida porque la R144 forma un enlace con el E269, que desestabiliza los H^+ unidos. Además, el lugar de unión de lactosa está parcialmente deteriorado debido a la reorganización de las hélices. Puesto que la transición entre los dos estados protonados (*centro*) está prohibida, los iones H^+ sólo pueden ser transportados junto con una lactosa. De esta forma, el gradiente electroquímico de H^+ dirige la importación de lactosa. (Adaptado de J. Abramson et al., *Science* 301: 610-615, 2003. Con la autorización de AAAS.)

entra $NaHCO_3$ y sale HCl). El intercambiador $Na^+/Cl^-/HCO_3^-$ es dos veces más efectivo que el intercambiador Na^+/H^+: por cada Na^+ que entra en la célula bombea hacia el exterior un H^+ y neutraliza otro. Si hay HCO_3^- asequible, como ocurre normalmente, este antiportador es el transportador más importante en la regulación del pH citosólico. Ambos intercambiadores están regulados por el pH del citosol y aumentan su actividad cuando el pH desciende.

Un *intercambiador Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+* ajusta el pH del citosol en sentido opuesto. Como en el caso de los transportadores dependientes de Na^+, el pH regula el intercambiador Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+, pero la actividad del intercambiador aumenta cuando el citosol se vuelve demasiado alcalino. En este caso, el desplazamiento de HCO_3^- es por lo general hacia el exterior de la célula, a favor de su gradiente electroquímico, que disminuye el pH del citosol. Un intercambiador Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+ de la membrana del eritrocito (denominado proteína banda 3; véase Figura 10–41) facilita la descarga rápida del CO_2 (en forma de HCO_3^-) cuando la célula pasa por los capilares del pulmón.

El pH intracelular no está regulado completamente por estos transportadores acoplados. Las bombas de H^+ impulsadas por ATP también se utilizan para controlar el pH de muchos compartimientos intracelulares. Como se explicará en el Capítulo 13, las bombas de H^+ mantienen el bajo pH de los lisosomas, así como el de los endosomas y el de las vesículas de secreción. Estas bombas de H^+ utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para bombear H^+ al interior de estos orgánulos desde el citosol.

En las células epiteliales, la distribución asimétrica de transportadores permite el transporte transcelular de solutos

En las células epiteliales, como las que absorben los nutrientes del intestino, los transportadores se hallan distribuidos de manera asimétrica en la membrana plasmática, gracias a lo

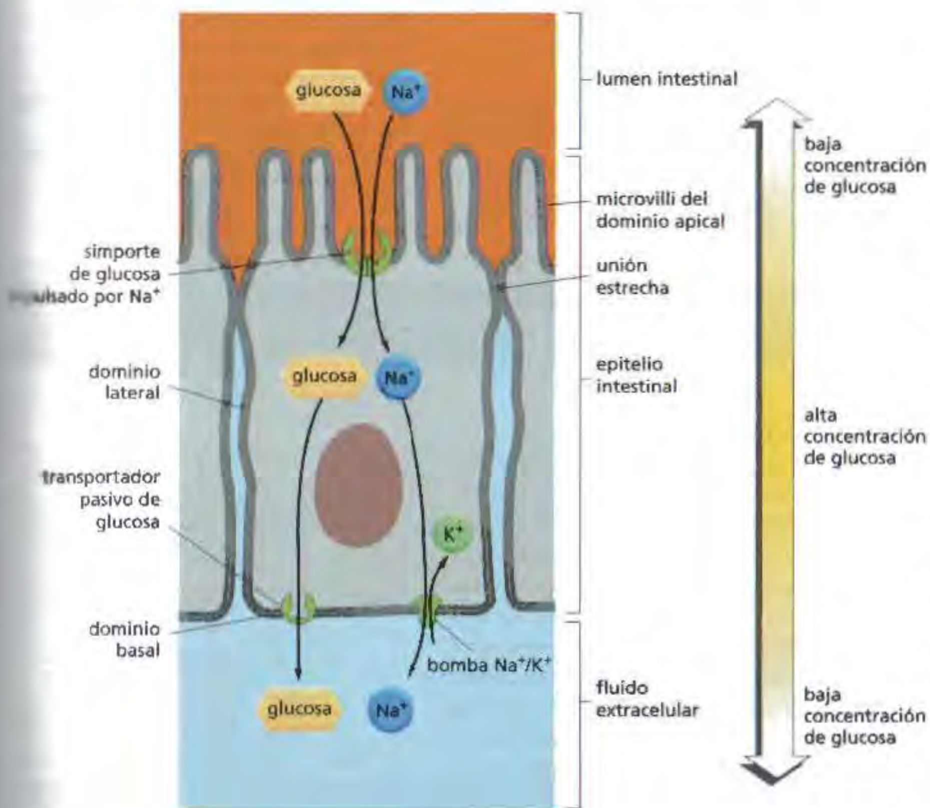


Figura 11–11 Transporte transcelular. <GGAT> El transporte transcelular de la glucosa a través de las células epiteliales del intestino depende de la distribución no uniforme de los transportadores en la membrana plasmática de la célula. El proceso que se muestra permite el transporte de glucosa desde el lumen intestinal hasta el fluido extracelular (de donde pasa a la sangre). La glucosa es bombeada al interior de la célula a través del dominio apical de la membrana gracias a un simportador de glucosa impulsado por el Na^+. La glucosa sale de la célula (a favor de su gradiente de concentración) mediante un desplazamiento pasivo mediado por un transportador de glucosa diferente presente en los dominios basal y lateral de la membrana. El gradiente de Na^+ que impulsa el simportador de glucosa se mantiene gracias a la bomba de Na^+ que se encuentra en los dominios lateral y basal de la membrana, que mantiene muy baja la concentración intracelular de Na^+. Las células adyacentes están conectadas por uniones estrechas impermeables, que tienen una doble función en el proceso de transporte ilustrado: evitan que los solutos crucen el epitelio entre las células, lo que permite mantener un gradiente de concentración de glucosa a través de la capa de células, y actúan como barreras de difusión de las proteínas de la membrana, lo que permite confinar las diferentes transportadores en sus respectivos dominios de membrana (véase la Figura 10–37).

...al contribuyen al **transporte transcelular** de los solutos absorbidos. En estas células, los ...sportadores facilitan que los solutos se desplacen a través de la capa celular epitelial has... el fluido extracelular para pasar a la sangre. Como muestra la **Figura 11–11**, los simpor...dores acoplados a Na^+ localizados en el dominio apical (absortivo) de la membrana plas...ática transportan nutrientes de forma activa hacia el interior de la célula, generando mar...dos gradientes de concentración, mientras que en el domino basal y lateral (basolateral) ...sten otras proteínas transportadoras, independientes de Na^+, que permiten que los nu...entes abandonen la célula a favor de su gradiente de concentración.

En muchas de estas células epiteliales, la superficie de la membrana plasmática es no...blemente elevada gracias a la formación de miles de microvilli, que se proyectan en forma de finas evaginaciones digitiformes de la superficie apical de cada célula. Estos microvilli pueden aumentar el área total de absorción de una célula más de 25 veces e incrementar así en gran medida su capacidad de transporte.

Como hemos visto, los gradientes iónicos desempeñan un papel crucial impulsando ...chos de los procesos de transporte esenciales para la célula. Las bombas iónicas que uti...an la energía de la hidrólisis del ATP establecen y mantienen estos gradientes, como se ...cribirá a continuación.

Existen tres clases de bombas impulsadas por ATP

A menudo, a las bombas impulsadas por ATP se les denomina *ATPasas de transporte* porque ...drolizan ATP a ADP y fosfato y utilizan la energía liberada para bombear iones u otros so...tos a través de la membrana. Existen tres clases principales de bombas impulsadas por ATP (**Figura 11–12**). En todas las células eucariotas y procariotas se encuentran represen...tes de cada una de ellas.

1. Las **bombas de tipo P** son proteínas transmembrana multipaso funcionalmente y estructuralmente relacionadas entre sí. Se denominan "de tipo P" porque se autofosforilan durante el ciclo de bombeo. Esta clase incluye muchas de las bombas iónicas responsables de generar y mantener gradientes de Na^+, K^+, H^+ y Ca^{2+} a través de la membrana.
2. Las **bombas de tipo F** son proteínas semejantes a turbinas, construidas a partir de diferentes subunidades. Se diferencian desde un punto de vista estructural de las

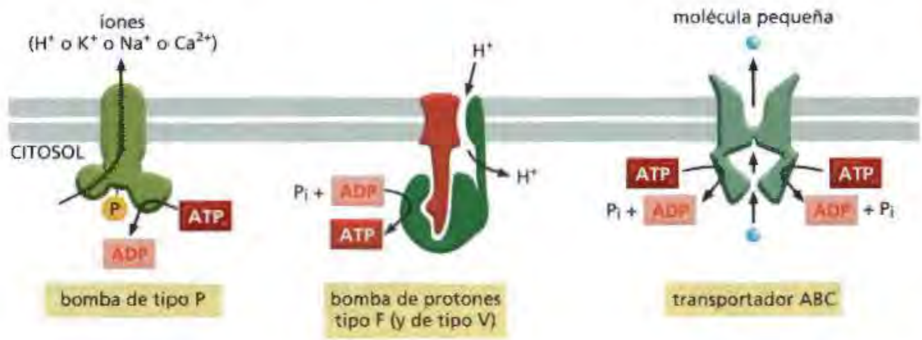


Figura 11–12 Tres tipos de bombas impulsadas por ATP. Se han representado los diferentes diseños moleculares de las bombas. Como ocurre con cualquier enzima, las bombas pueden trabajar en sentido inverso: cuando el gradiente electroquímico de los solutos se invierte y la relación ATP/ADP es baja, pueden sintetizar ATP a partir de ADP, como muestra la ATPasa de tipo F, que normalmente trabaja de este modo.

ATPasas de tipo P y se encuentran en la membrana plasmática de las bacterias, en la membrana interna de las mitocondrias y en la membrana tilacoidal de los cloroplastos. A menudo se denominan *ATP sintetasas* porque normalmente actúan en sentido opuesto: en lugar de utilizar la hidrólisis de ATP para impulsar un gradiente de H^+, utilizan un gradiente de H^+ a través de la membrana para impulsar la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato. El gradiente de H^+ está generado por el transporte electrónico de la fosforilación oxidativa (en las bacterias aeróbicas y en las mitocondrias), durante la fotosíntesis (en los cloroplastos) y por la bomba de H^+ activada por la luz (rodopsina bacteriana) de *Halobacterium*. En el Capítulo 14 se tratan con detalle estas proteínas.

Existe una familia de *ATPasas de tipo V*, estructuralmente relacionadas con las ATPasas F, que por lo general bombean H^+ en lugar de sintetizar ATP. Bombean H^+ hacia el interior de los orgánulos, como lisosomas, vesículas sinápticas y vacuolas de las plantas, para acidificar el interior de estos orgánulos (véase Figura 13–36).

3. Los **transportadores ABC** bombean sobre todo moléculas pequeñas a través de las membranas celulares, en contraste con las ATPasas de tipo P y de tipo F que exclusivamente transportan iones.

Para acabar esta sección, vamos a centrarnos en las bombas de tipo P y en los transportadores ABC.

La bomba de Ca^{2+} es la ATPasa mejor conocida

Las células eucariotas mantienen unas concentraciones de Ca^{2+} libre en su citosol muy bajas (~10^{-7} M), frente a unas concentraciones de Ca^{2+} extracelular muy superiores (~10^{-3} M). Cualquier entrada de Ca^{2+} en el citosol, por pequeña que sea, provoca un aumento en la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol. La entrada de Ca^{2+} a favor de su elevado gradiente de concentración, en respuesta a señales extracelulares, es uno de los mecanismos de transmisión de estas señales de manera rápida a través de la membrana plasmática (como se describe en el Capítulo 15). Por lo tanto, el mantenimiento de este gradiente de Ca^{2+} tan acusado es de gran importancia para la célula. El gradiente de Ca^{2+} se mantiene mediante unos transportadores de Ca^{2+} de la membrana plasmática que bombean activamente el Ca^{2+} fuera de la célula. Uno de estos transportadores es una ATPasa de Ca^{2+} de tipo P; el otro es un antiportador (llamado *intercambiador Na^+/Ca^{2+}*) impulsado por el gradiente electroquímico de Na^+ a través de la membrana (véase la Figura 15–41).

La ATPasa de transporte de tipo P mejor conocida es la **bomba de Ca^{2+}**, o **ATPasa de Ca^{2+}**, de la membrana del *retículo sarcoplasmático* (SR: *sarcoplasmic reticulum*) de las células del músculo esquelético. El SR es un tipo especializado de retículo endoplasmático que forma una red de túbulos en el citoplasma celular del músculo y actúa como un almacén intracelular de Ca^{2+}. (Cuando un potencial de acción despolariza la membrana de la célula muscular, el Ca^{2+} es liberado al citosol desde el retículo sarcoplasmático mediante unos *canales de Ca^{2+}*, lo que estimula la contracción muscular, como se explica en el Capítulo 16.) La bomba de Ca^{2+}, que supone aproximadamente el 90% de la proteína de la membrana del SR, desplaza el Ca^{2+} desde el citosol de nuevo al SR. El retículo endoplasmático de las células no musculares contiene una bomba de Ca^{2+} similar, pero en menores cantidades.

La estructura tridimensional de la bomba de Ca^{2+} del SR se ha determinado por cristalografía de rayos X. Esta estructura y el análisis de una bomba de H^+ fúngica relacionada con ella, han aportado las primeras imágenes de ATPasas de transporte de tipo P, de las que se

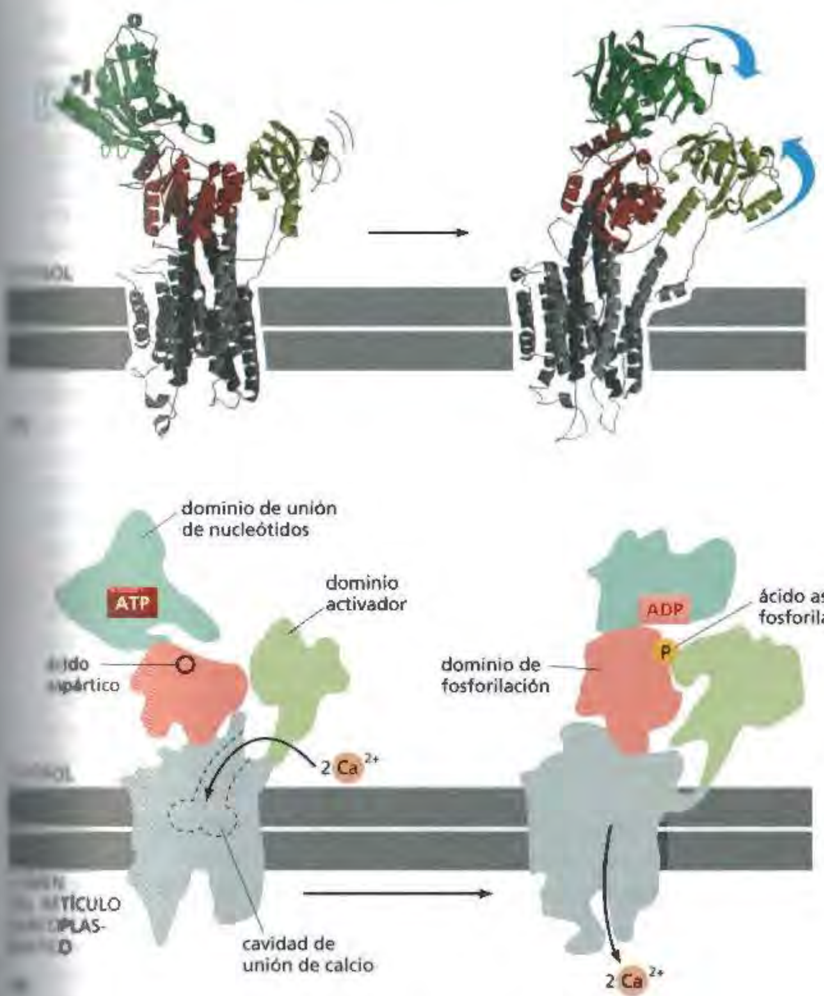


Figura 11–13 Un modelo de cómo la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático desplaza el Ca^{2+}. (A) Las estructuras del estado desfosforilado de la bomba de Ca^{2+} (*izquierda*) y del estado fosforilado libre de Ca^{2+} (*derecha*) fueron determinadas mediante cristalografía de rayos-X. (B) El modelo muestra cómo la unión y la hidrólisis del ATP provoca cambios conformacionales drásticos y, por tanto, aproxima dominios de unión de nucleótidos y dominios de fosforilación. Este cambio produce una rotación de 90º en el dominio activador, que conduce a una reordenación de las hélices transmembrana. El reordenamiento de las hélices altera la actividad de las uniones de Ca^{2+} y libera el Ca^{2+} al interior del lumen del retículo sarcoplasmático. (Adaptado de C. Toyoshima et al., *Nature* 405:647-655, 2000. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

supone que todas tienen la misma estructura. Contienen 10 hélices α transmembrana, tres de las cuales se alinean en un canal central que atraviesa la bicapa lipídica. En el estado desfosforilado de la bomba de Ca^{2+}, dos de estas hélices están truncadas y forman una cavidad accesible desde el lado citosólico de la membrana que permite la unión de dos iones Ca^{2+}. La unión de ATP a su centro de unión en el mismo lado de la membrana y la posterior transferencia del grupo fosfato del ATP a un ácido aspártico de un dominio adyacente hacen que las hélices transmembrana se reordenen drásticamente. Esta reordenación colapsa el centro de unión del Ca^{2+}, y libera los iones Ca^{2+} al otro lado de la membrana, hacia el lunen del SR (**Figura 11–13**). Una característica esencial de todas las bombas de tipo P es que durante el ciclo de bombeo la bomba se autofosforila de forma transitoria.

La bomba de Na^+/K^+ de tipo P de la membrana plasmática establece el gradiente de Na^+ a través de la membrana plasmática

La concentración de K^+ en el interior celular es típicamente de 10 a 30 veces más alta que en el exterior, mientras que para el Na^+ ocurre lo contrario (véase Tabla 11–1, p. 652). Una **bomba de Na^+/K^+**, o **bomba de Na^+**, que se halla en la membrana plasmática de casi todas las células animales, mantiene estas diferencias de concentración. La bomba actúa como un cotransportador de intercambio (antiportador), impulsado por ATP, bombeando de forma activa Na^+ hacia el exterior de la célula en contra de su gradiente electroquímico y K^+ hacia el interior (**Figura 11–14**). Dado que la bomba hidroliza ATP para bombear el Na^+ hacia afuera y el K^+ hacia adentro, también es conocido como la **ATPasa de Na^+/K^+**. La bomba pertenece a la familia de las ATPasas de tipo P y funciona de forma muy similar a como lo hace la bomba de Ca^{2+} (**Figura 11–15**).

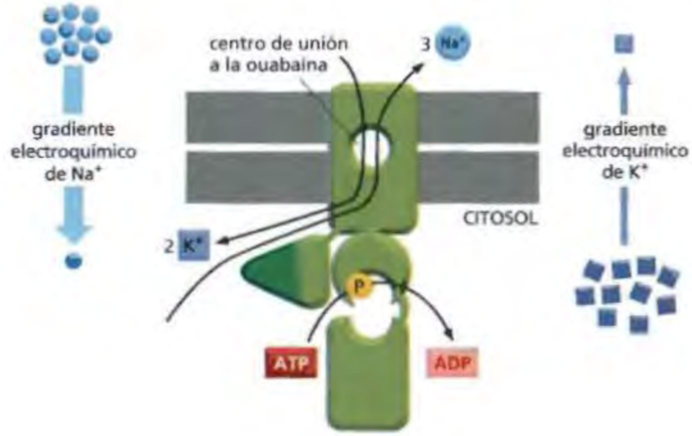


Figura 11–14 La bomba Na^+-K^+. <GAC
Este transportador bombea activamente el Na^+ hacia afuera y el K^+ hacia el interior de la célula en contra de sus gradientes electroquímicos. Por cada molécula de ATP hidrolizada en la célula, se bombean tres Na^+ hacia el exterior y dos K^+ hacia el interior. El inhibidor específico ouabaína y el K^+ compiten por el mismo centro de unión en la cara extracelular de la bomba.

Ya hemos mencionado que el gradiente de Na^+ producido por la bomba de Na^+/K^+ impulsa el transporte de la mayoría de los nutrientes al interior de las células animales y también desempeña un papel crucial en la regulación del pH citosólico. Una célula animal típica dedica cerca de una tercera parte de toda la energía que consume para impulsar esta bomba, e incluso más en las células nerviosas eléctricamente activas que, como veremos más adelante, durante la propagación del impulso nervioso ganan continuamente pequeñas cantidades de Na^+ y pierden pequeñas cantidades de K^+.

Como cualquier enzima, la bomba de Na^+/K^+ puede actuar en sentido opuesto, en este caso, produciendo ATP. Cuando los gradientes de Na^+ y K^+ se incrementan experimentalmente hasta el punto de que la energía almacenada en sus gradientes electroquímicos es mayor que la energía química de la hidrólisis de ATP, esos iones se desplazan a favor de sus gradientes electroquímicos y la bomba Na^+/K^+ sintetiza ATP a partir de ADP y fosfato. Así, la forma fosforilada de la bomba (el paso 2 de la Figura 11–15) puede relajarse ya sea cediendo su fosfato al ADP (paso 2 al paso 1) o cambiando su conformación (paso 2 al paso 3). El cam-

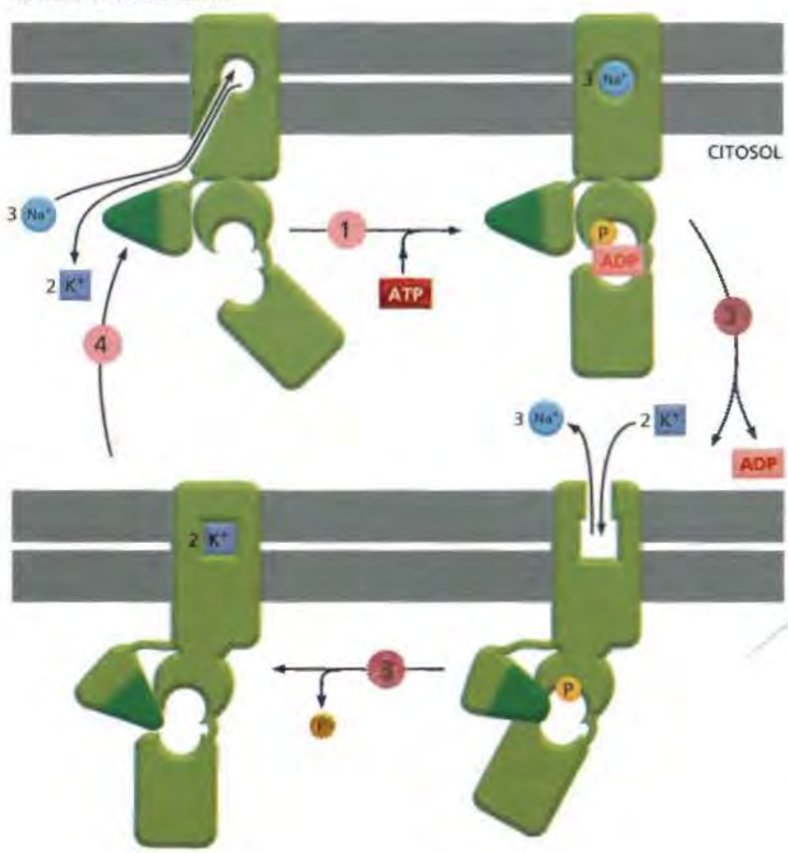


Figura 11–15 Modelo de funcionamiento de la bomba Na^+/K^+. (1) La unión intracelular del Na^+ y la posterior fosforilación de la cara citoplasmática de la bomba por ATP induce un cambio de conformación en la proteína que (2) transfiere el Na^+ a través de la membrana y lo libera en el exterior de la célula. (3) En esta situación, la unión de K^+ a la cara extracelular y la posterior desfosforilación de la bomba devuelven la proteína a su conformación original, que (4) transfiere el K^+ a través de la membrana y lo libera en el citosol. Estos cambios conformacionales son análogos a las transiciones A ↔ B de la Figura 11–5, excepto que aquí la fosforilación dependiente de Na^+ y la desfosforilación dependiente de K^+ hacen que las transiciones conformacionales se den de una forma ordenada, lo cual permite que la proteína realice un trabajo útil. Aunque para simplificar en la figura sólo se representa un centro de unión para el Na^+ y otro para el K^+, en la bomba real hay tres centros de unión de Na^+ y dos de K^+.

global de energía libre puede ser, pues, utilizado para sintetizar ATP o para bombear Na^+ fuera de la célula, dependiendo de las concentraciones relativas de ATP, ADP y fosfato, así como de los gradientes electroquímicos del Na^+ y el K^+.

La bomba de Na^+/K^+es *electrogénica* porque bombea tres iones cargados positivamente hacia el exterior de la célula por cada dos que bombea hacia el interior. Establece una corriente eléctrica neta a través de la membrana, contribuyendo a generar un potencial eléctrico, con el interior de la célula cargado negativamente con respecto al exterior. Sin embargo, este efecto electrogénico de la bomba rara vez contribuye en más de un 10% al potencial de membrana. El 90% restante, como veremos más adelante, sólo depende de forma indirecta de la bomba de Na^+/K^+.

Por otra parte, la bomba de Na^+/K^+ sí que tiene un papel directo en la regulación la concentración de solutos en el interior de la célula y, por tanto, colabora en la regulación de la **osmolaridad** (o *tonicidad*) del citosol. Todas las células contienen proteínas de canal especializados para el agua llamados *acuaporinas* (se describe en detalle en la p. 673) en su membrana plasmática que facilitan que el agua fluya a través de esta membrana. Así, el agua se desplaza hacia el interior o hacia el exterior de la célula, a favor de su gradiente de concentración, un proceso llamado *ósmosis*. Como se explica en el **Panel 11–1**, las células contienen una elevada concentración de solutos, incluyendo numerosas moléculas orgánicas cargadas negativamente que están confinadas en el interior de la célula (los denominados *aniones fijos*) y sus cationes acompañantes que son necesarios para mantener el balance de cargas. Esto tiende a generar un elevado gradiente osmótico que tiende a "arrastrar" agua hacia el interior de la célula. Las células animales contrarrestan este efecto por un gradiente osmótico en sentido opuesto debido a la elevada concentración de iones inorgánicos, principalmente Na^+ y Cl^- en el fluido extracelular. La bomba de Na^+/K^+ ayuda a mantener este balance osmótico bombeando al exterior el Na^+ que se filtra a favor de su gradiente electroquímico. El Cl^- se mantiene en el exterior gracias al potencial de membrana.

En el caso especial de los eritrocitos humanos, que no tienen núcleo ni otros orgánulos y tienen una membrana plasmática que tiene una elevada permeabilidad para el agua, el desplazamiento del agua puede influir notablemente en el volumen celular de forma que la bomba de Na^+/K^+ desempeña un papel importante manteniendo el volumen de estas células. Si estas células se colocan en una *solución hipotónica* (es decir, una solución con una baja concentración de solutos y, por tanto, una elevada concentración de agua), se producirá un desplazamiento neto de agua hacia el interior de las células, que se hincharán y llegarán a reventar (se lisarán); por el contrario, si las células se colocan en una *solución hipertónica*, se encogerán (**Figura 11–16**). El papel de la bomba de Na^+/K^+ en el control del volumen de los eritrocitos se pone de manifiesto por la observación de que las células se hinchan y pueden llegar a explotar si son tratadas con *ouabaína*, que inhibe la bomba de Na^+/K^+. Sin embargo, en la mayoría de células animales, la ósmosis y la bomba de Na^+/K^+ solamente tienen una importancia menor en el control del volumen celular porque la mayor parte del citoplasma está en un estado de tipo gel y resiste grandes cambios de volumen en respuesta a la osmolaridad.

Las células no animales hacen frente a sus problemas osmóticos de varias maneras. Las células vegetales y muchas bacterias están protegidas del riesgo de reventar por una pared celular semirrígida que envuelve su membrana plasmática. En las amebas, el exceso de agua que entra por efecto osmótico es recogido en vacuolas contráctiles que periódicamente vacían su contenido al exterior (Panel 11–1). Las bacterias también han desarrollado estrategias que les permiten perder iones, e incluso macromoléculas, de manera rápida cuando se ven sometidas a un shock osmótico.

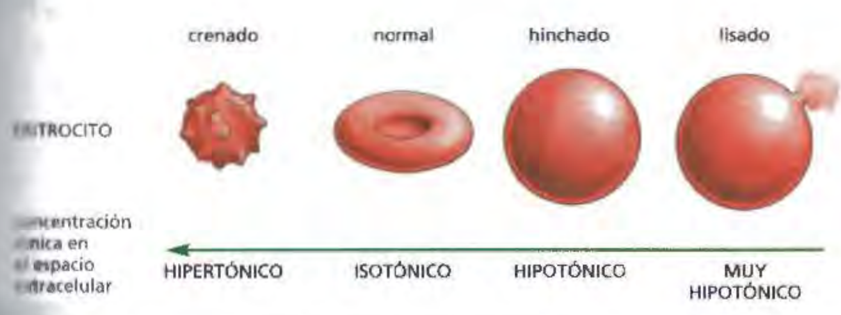


Figura 11–16 Respuesta de eritrocitos humanos a cambios de osmolaridad del fluido extracelular. <GTAC> La célula se hincha o se encoge según entre o salga agua a favor de su gradiente de concentración.

FUENTES DE OSMOLARIDAD INTRACELULAR



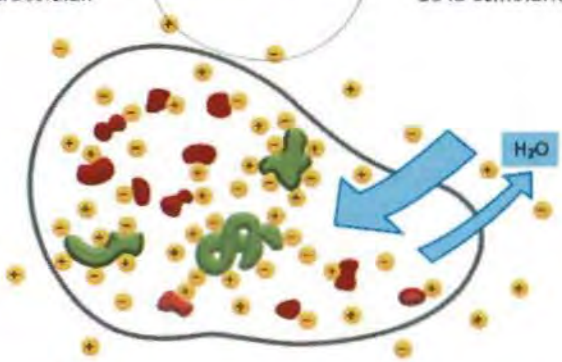
1 Las macromoléculas, a pesar de su gran tamaño, contribuyen muy poco a la osmolaridad intracelular, ya que cada una de ellas es una sola unidad y su número es relativamente bajo comparado con el número de pequeñas moléculas de la célula. Sin embargo, la mayoría de las macromoléculas biológicas están muy cargadas y atraen iones inorgánicos de carga contraria. Debido a su elevado número, estos contraiones contribuyen enormemente a la osmolaridad intracelular.



2 Como resultado del transporte activo y de los procesos metabólicos, la célula contiene una elevada concentración de pequeñas moléculas orgánicas, como azúcares, aminoácidos y nucleótidos, para los cuales la membrana plasmática es impermeable. Dado que muchos de estos metabolitos están cargados, también atraen contraiones. Tanto los metabolitos de pequeño tamaño como sus contraiones suponen una contribución importante de la osmolaridad intracelular.



3 La osmolaridad del fluido extracelular es debida, principalmente, a pequeños iones inorgánicos. Estos iones difunden poco a poco al interior de la célula a través de la membrana plasmática. Si no fueran bombeados al exterior y si no existieran otras moléculas en el interior de la célula que interactuasen con ellos alterando su distribución, llegarían finalmente a un equilibrio entre sus concentraciones dentro y fuera de la célula. Sin embargo, la presencia en la célula de macromoléculas y metabolitos cargados que atraen estos iones da lugar al efecto Donnan: en situación de equilibrio la concentración total de iones inorgánicos y, por tanto, su contribución a la osmolaridad es mayor dentro que fuera de la célula.

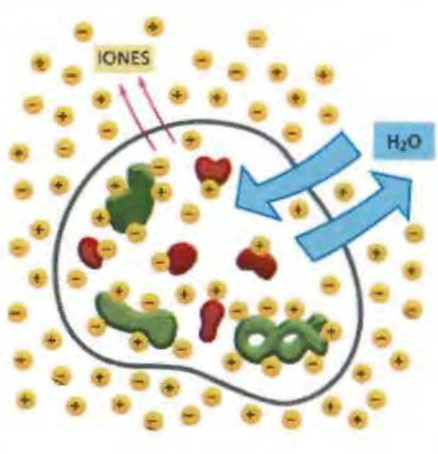


EL PROBLEMA

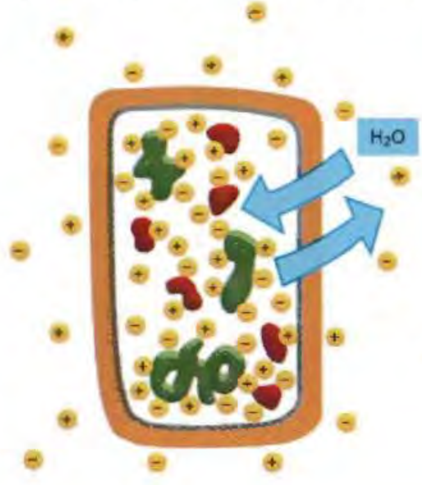
Debido a todos estos factores, una célula que no haga nada para controlar su osmolaridad tendrá una mayor concentración de solutos en su interior respecto del exterior. Como resultado de ello, el agua estará más concentrada fuera que dentro de la célula. Esta diferencia en la concentración de agua a ambos lados de la membrana plasmática hará que el agua entre continuamente en la célula por osmosis y provoque la rotura de la misma.

LA SOLUCIÓN

Las células animales y las bacterias controlan su osmolaridad intracelular bombeando fuera de la célula iones inorgánicos, como el Na^+, de manera que su citoplasma contenga una concentración total de iones inorgánicos menor que la del fluido extracelular, compensando su exceso de solutos.



Las células vegetales evitan la entrada excesiva de agua mediante sus paredes celulares y toleran una diferencia osmótica a ambos lados de su membrana; se genera una presión interna que, en equilibrio, expulsa tanta agua como entra.



Muchos protozoos evitan la entrada excesiva de agua, a pesar de la diferencia osmótica que hay a ambos lados de su membrana, expulsando agua periódicamente mediante unas vacuolas contráctiles especiales.



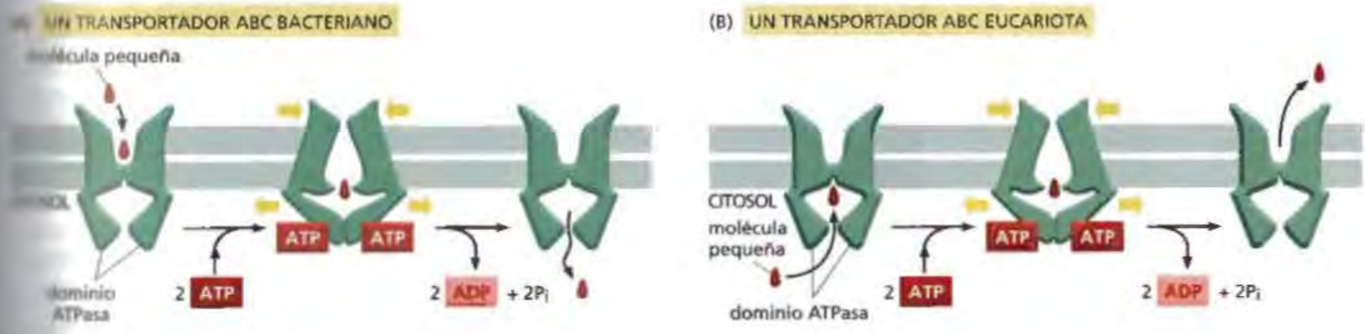


Figura 11-17 **Transportador ABC típico en procariotas (A) y eucariotas (B).** Los transportadores constan de varios dominios: normalmente dos dominios hidrofóbicos, cada uno de los cuales está formado por seis segmentos que atraviesan la membrana y que forman la vía de paso y proporcionan la especificidad del sustrato, y dos dominios ATPasa (también denominados casetes de unión a ATP) que sobresalen hacia el citosol. En algunos casos, las dos mitades del transportador están formadas por un solo polipéptido mientras que en otros casos están formados por dos o más polipéptidos que se ensamblan formando una estructura similar (véase la Figura 10-24). En ausencia de ATP unido, el transportador expone un lugar de unión al sustrato hacia el espacio extracelular (en procariotas) o hacia el espacio intracelular (en eucariotas o en procariotas). La unión de ATP induce un cambio conformacional que expone el bolsillo de unión al sustrato hacia la cara opuesta; la hidrólisis de ATP seguida de la disociación del ADP hace que el transportador recupere su conformación original. La mayoría de transportadores ABC individuales son unidireccionales. En bacterias se han encontrado transportadores ABC importadores y otros exportadores, pero en eucariotas todos los transportadores ABC exportan sustancias desde el citosol, tanto hacia el espacio extracelular como a un compartimiento rodeado por una membrana intracelular como el ER o las mitocondrias.

Los transportadores ABC constituyen la mayor familia de proteínas de transporte de membrana

El último tipo de proteínas transportadoras que se tratará es la familia de **transportadores ABC**, denominadas de este modo porque cada uno de sus miembros contiene dos motivos de unión al ATP (*ATP-binding "cassettes"*: "casetes" de unión a ATP) altamente conservados (**Figura 11-17**). La unión del ATP conduce a la dimerización de los dos dominios de unión al ATP y la hidrólisis del ATP provoca su disociación. Parece que estos cambios estructurales en los dominios citosólicos son transmitidos a los segmentos transmembrana, generando ciclos de cambios conformacionales que alternativamente exponen los centros de unión a los sustratos a uno u otro lado de la membrana. De esta manera, los transportadores ABC utilizan la unión e hidrólisis del ATP para transportar moléculas pequeñas a través de la bicapa.

Los transportadores ABC constituyen la mayor familia de proteínas transportadoras a través de la membrana y son de una gran importancia clínica. La primera de estas proteínas que fue caracterizada se descubrió en bacterias. Ya hemos mencionado que la membrana plasmática de todas las bacterias contiene transportadores que utilizan el gradiente de H^+ a través de la membrana para bombear diversos nutrientes al interior de la célula. Las bacterias también tienen ATPasas de transporte que utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para importar moléculas pequeñas específicas. En bacterias como *E. coli*, que tienen membranas dobles (**Figura 11-18**), las ATPasas de transporte están localizadas en la membrana interna y un mecanismo auxiliar captura los nutrientes y los distribuye a los transportadores (**Figura 11-19**).

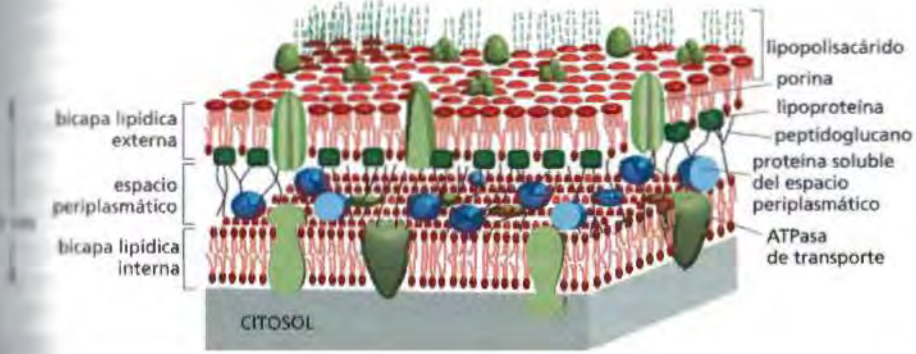


Figura 11-18 **Sección de la doble membrana de una bacteria *E. coli*.** La membrana interna es la membrana plasmática de la célula. Entre las bicapas lipídicas interna y externa, hay una capa de peptidoglucano rígido y muy poroso, formado por proteínas y polisacáridos, que constituye la pared bacteriana. Está anclado a las moléculas lipoproteicas de la membrana externa y llena el *espacio periplasmático* (sólo se muestra una pequeña parte de la capa de peptidoglucano). Este espacio también contiene una gran diversidad de moléculas proteicas solubles. Los filamentos discontinuos (en *verde*) de la parte superior representan las cadenas de polisacáridos de las moléculas del lipopolisacárido especial que forma la monocapa externa de la membrana exterior; para mayor claridad, sólo se representan algunas de estas cadenas. Las bacterias con doble membrana se llaman *Gram-negativas* porque no retienen el colorante azul oscuro utilizado en la tinción de Gram. Las bacterias con membranas sencillas (pero con paredes celulares más gruesas), como los estafilococos y los estreptococos, sí que retienen el colorante azul y, por tanto, se llaman *Gram-positivas*; su única membrana es análoga a la membrana interna (plasmática) que tienen las bacterias Gram-negativas.

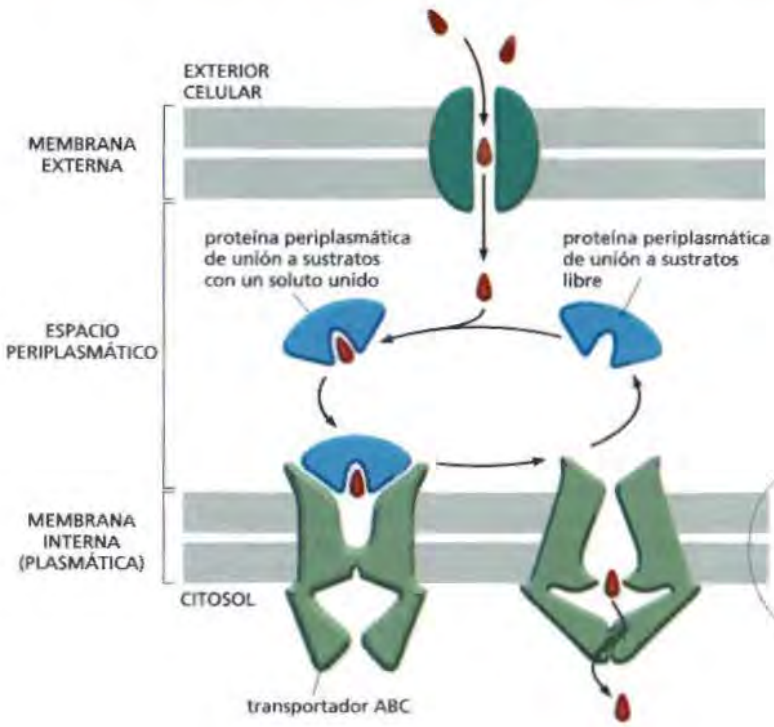


Figura 11–19 Sistema auxiliar de transporte asociado con las ATPasas de transporte de las bacterias con doble membrana. El soluto difunde a través de las proteínas formadoras de canales (porinas) de la membrana externa y se une a una *proteína periplasmática de unión a sustratos*, que sufre un cambio conformacional que le permite unirse a un transportador ABC de la membrana plasmática. El transportador ABC cede el soluto que es transportado activamente a través de la membrana plasmática en una reacción impulsada por la hidrólisis de ATP. Se ha omitido el petidoglucano para simplificar la figura; su estructura porosa permite que las proteínas de unión a sustratos y los solutos hidrosolubles se desplacen por el espacio periplasmático por difusión simple.

En *E. coli*, 78 genes (un increíble 5% de los genes de la bacteria) codifican transportadores ABC, mientras que los genomas de las células animales contienen muchos más. Aunque parece que cada transportador es específico para una molécula o una clase de moléculas, la variedad de sustratos transportados por esta superfamilia es muy grande e incluye iones inorgánicos, aminoácidos, azúcares, mono y polisacáridos, péptidos e incluso proteínas. Mientras que los transportadores ABC bacterianos se utilizan tanto para importar como para exportar sustratos, parece que los identificados en eucariotas están especializados en la exportación.

De hecho, los primeros transportadores ABC eucariotas identificados fueron descubiertos por su capacidad de bombear drogas hidrófobas al exterior del citosol. Uno de estos transportadores es la **proteína de resistencia a muchos fármacos (MDR: *multidrug resistance*)**, cuya sobreexpresión en las células cancerosas humanas las puede volver resistentes de forma simultánea a una gran variedad de fármacos citotóxicos de naturalezas químicas muy diversos que se utilizan en la quimioterapia del cáncer. El tratamiento con uno de estos fármacos puede provocar la supervivencia selectiva y sobrecrecimiento de aquellas células cancerosas que expresan más cantidad de la proteína de transporte MDR. Estas células pueden bombear los fármacos hacia el exterior de la célula de una forma muy eficiente y resultar así relativamente resistentes a los efectos tóxicos de estos fármacos anticancerosos. Por eso, la selección de células cancerosas que son resistentes a un fármaco puede conducir a la resistencia a una gran variedad de fármacos anticancerosos. Algunos estudios indican que más del 40% de los cánceres humanos desarrollan resistencia a muchos fármacos, lo cual constituye uno de los principales escollos en la lucha contra el cáncer.

Un fenómeno relacionado e igualmente con consecuencias negativas ocurre en el protozoo *Plasmodium falciparum*, que causa la malaria. Más de 200 millones de personas en todo el mundo están infectados con este parásito, que continúa siendo una de las principales causas de mortalidad en humanos, ya que provoca más de un millón de muertes al año. El desarrollo de resistencia al fármaco antimalárico *cloroquina* dificulta el control de la malaria. Los *P. falciparum* resistentes han amplificado un gen que codifica un transportador ABC que bombea la cloroquina hacia el exterior.

En la mayoría de las células de vertebrados, un transportador ABC de la membrana del retículo endoplasmático (ER) transporta activamente una gran variedad de péptidos desde el citosol al lumen del ER. Estos péptidos están producidos por la degradación de las proteínas en los proteosomas (descrito en el Capítulo 6). Son transportados desde el ER a la superficie celular, donde son expuestos al escrutinio de los linfocitos T citotóxicos, que ma-

tarán a la célula si los péptidos derivan de un virus o de otros microorganismos ocultos en el citosol de una célula infectada (se describe en el Capítulo 25).

Otro miembro de transportadores de la familia ABC es la proteína *reguladora de la conductancia transmembrana en la fibrosis quística* (CFTR: *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), que fue descubierto a través de estudios de la enfermedad genética, relativamente común, llamada *fibrosis quística*. Esta enfermedad está causada por una mutación en un gen que codifica CFTR, que actúa como un canal de Cl^- en la membrana plasmática de las células epiteliales. CFTR regula la concentración de iones en el fluido extracelular, especialmente en el pulmón. Una de cada 27 personas de raza blanca transporta el gen que codifica una forma mutante de esta proteína y, en una de cada 2900 personas, están mutadas ambas copias del gen, lo cual causa la enfermedad. A diferencia de los otros transportadores ABC, la unión e hidrólisis del ATP no impulsa el proceso de transporte. En lugar de ello, controla la apertura y el cierre del canal de Cl^-, lo que proporciona un conducto pasivo para que el Cl^- se pueda desplazar a favor de su gradiente electroquímico. Así pues, aparentemente las proteínas ABC actúan como transportadores y también como canales.

Resumen

Los transportadores se unen específicamente a solutos y los transfieren a través de la bicapa lipídica mediante cambios conformacionales que exponen el centro de unión al soluto, secuencialmente a un lado de la membrana y al otro. Algunos transportadores desplazan un solo soluto "cuesta abajo", a favor de su gradiente mientras que otros actúan como bombas que desplazan un soluto "cuesta arriba", en contra de su gradiente electroquímico, utilizando la energía suministrada por la hidrólisis del ATP, por un gradiente favorable de otro soluto (como Na^+ o H^+) o por la luz, que impulsan la serie de cambios conformacionales necesarios de una manera ordenada. Los transportadores pertenecen a un número reducido de familias proteicas. Cada familia contiene proteínas de secuencias similares de aminoácidos, que parece que han evolucionado a partir de una proteína ancestral común y que actúan mediante un mecanismo semejante. La familia de las ATPasas de transporte de tipo P, que incluye las bombas de Ca^{2+} y de Na^+/K^+, es un ejemplo importante; cada una de estas ATPasas se autofosforila y desfosforila en secuencial durante el ciclo de bombeo. La superfamilia de transportadores ABC es la mayor familia de proteínas de transporte de membrana y es en especial importante desde el punto de vista clínico. Incluye proteínas que son responsables de la fibrosis quística así como de la resistencia a fármacos en células cancerosas y al parásito que causa la malaria.

CANALES IÓNICOS Y PROPIEDADES ELÉCTRICAS DE LAS MEMBRANAS

A diferencia de los transportadores, los canales forman poros hidrófilos a través de las membranas. Una clase de canales que se encuentra en la práctica totalidad de los animales forman las *uniones comunicantes* o *uniones de tipo gap* (*gap junctions*) entre dos células adyacentes; cada membrana plasmática contribuye por igual a la formación del canal, que conecta el citoplasma de las dos células. Estos canales se describen en el Capítulo 19, por lo que aquí no trataremos de ellos. Tanto las uniones comunicantes como las *porinas*, las proteínas formadoras de canales de las membranas de bacterias, mitocondrias y cloroplastos (descritas en el Capítulo 10), forman unos poros relativamente grandes y permisivos, que resultarían desastrosos si conectaran de forma directa el interior de una célula con el espacio extracelular. De hecho, muchas toxinas bacterianas siguen este procedimiento para matar otras células (como se explica en el Capítulo 24).

Por el contrario, la mayoría de los canales de la membrana plasmática de las células animales y vegetales que conectan el citosol con el exterior de la célula deben constituir necesariamente poros estrechos y muy selectivos que se puedan abrir y cerrar con rapidez. Estas proteínas están relacionadas específicamente con el transporte de iones inorgánicos, por lo que se denominan **canales iónicos**. Respecto a la eficiencia de transporte, los canales iónicos tienen ventaja sobre los transportadores, ya que a través de cada canal abierto pueden pasar hasta 100 millones de iones por segundo –una velocidad 10^5 veces superior que la del transporte mediado por cualquier transportador conocido. Sin embargo, los canales no pueden acoplarse a una fuente de energía para realizar un transporte activo, por lo que el transporte que median es siempre pasivo ("cuesta abajo"). Por lo tanto, la función de los canales

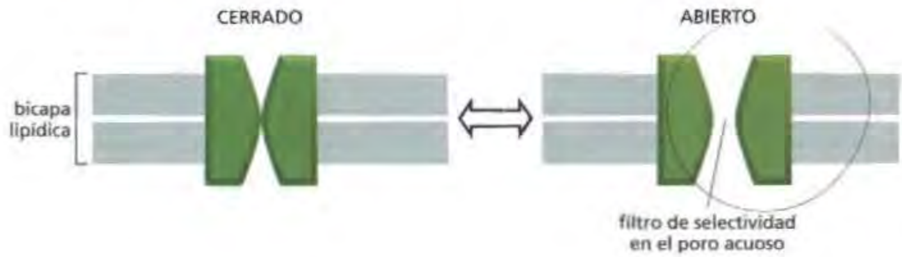


Figura 11-20 Canal iónico típico, que fluctúa entre sus conformaciones cerrada y abierta. El canal, que se muestra aquí en sección longitudinal, sólo forma un poro hidrófilo en la bicapa lipídica en su estado conformacional "abierto". Se supone que la pared del poro está recubierta de grupos polares, mientras que las cadenas laterales de los aminoácidos hidrófobos interactúan con la bicapa lipídica (aunque no se muestra). El poro se estrecha hasta unas dimensiones atómicas en una región (el filtro de selectividad), en la que se determina en gran medida la selectividad iónica del canal.

iónicos es la de permitir que algunos iones inorgánicos determinados –sobre todo Na^+, K^+, Ca^{2+} o Cl^-– difundan rápidamente a favor de sus gradientes electroquímicos a través de la bicapa lipídica. Como veremos, la capacidad de controlar los flujos iónicos a través de estos canales es esencial para muchas funciones celulares. Las células nerviosas (neuronas), en particular, se han especializado en utilizar una gran variedad de canales iónicos; ahora se considerará de qué forma utilizan muchos de estos canales diferentes para recibir, conducir y transmitir señales.

Los canales iónicos son selectivos para el ion transportado y fluctúan entre estados abiertos y cerrados

Dos propiedades importantes diferencian a los canales iónicos de los simples poros acuosos. Primero, presentan *selectividad iónica*, permitiendo que algunos iones inorgánicos puedan pasar, pero otros, no. Esto sugiere que sus poros deben ser lo bastante estrechos como para forzar que los iones entren en contacto íntimo con las paredes del canal de modo que sólo los iones del tamaño y carga apropiados puedan pasar. Los iones que deben ser transportados tienen que deshacerse de la mayoría o de todas las moléculas de agua asociadas para pasar, a menudo en fila, a través de la parte más estrecha del canal, lo que se conoce como el *filtro de selectividad*; esto limita su velocidad de paso (**Figura 11-20**). Así, cuando aumenta la concentración de un ion, el flujo de ese ion a través del canal aumenta proporcionalmente hasta que se alcanzan los niveles de saturación, momento en que se llega a la velocidad máxima de transporte.

La segunda diferencia importante entre canales iónicos y poros acuosos es que los canales iónicos no están abiertos de forma continua. En lugar de ello, tienen "puertas", que les permiten abrirse brevemente y volver a cerrarse de nuevo (**Figura 11-21**). Además, bajo una prolongada estimulación (química o eléctrica), la mayoría de canales pasan a un estado cerrado "desensibilizado" o "inactivado", en el que son refractarios a posteriores aperturas hasta que el estímulo ha desaparecido, como se explicará más adelante. En la mayoría de los casos, la puerta se abre en respuesta a un estímulo específico. Los principales tipos de estí-

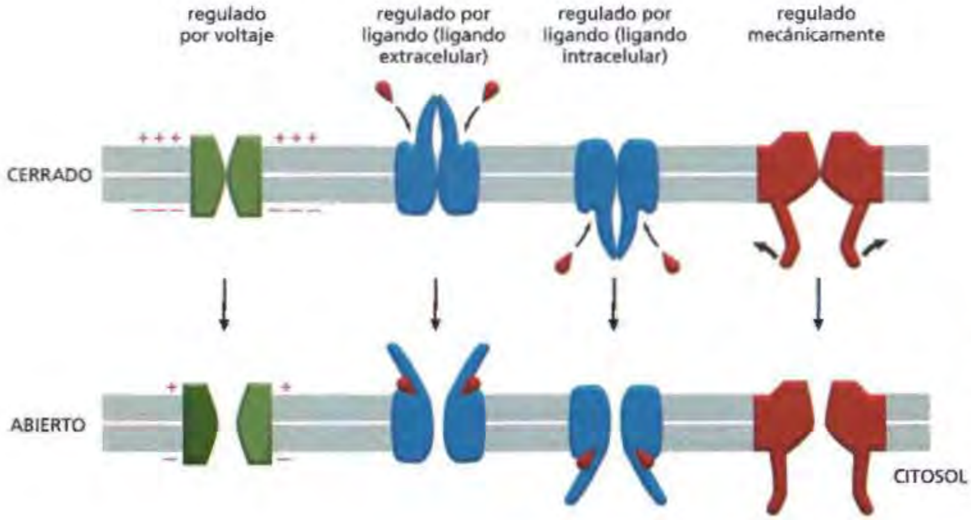


Figura 11-21 Regulación de los canales iónicos. Este esquema muestra diferentes tipos de estímulos que abren los canales iónicos. Los canales regulados de forma mecánica suelen tener extensiones citoplasmáticas que unen el canal al citoesqueleto (que no se muestra en la figura).

estímulos que causan esta apertura de canales iónicos son cambios en el voltaje a través de la membrana (*canales regulados por voltaje*), un estrés mecánico (*canales regulados mecánicamente*) o la unión de un ligando (*canales regulados por ligando*). El ligando puede ser tanto un mediador extracelular –específicamente, un neurotransmisor (*canales regulados por transmisor*)– o un mediador intracelular, como un ion (*canales regulados por iones*), o un nucleótido (*canales regulados por nucleótidos*). Además, la actividad de muchos canales iónicos está regulada por fosforilación y desfosforilación; este tipo de regulación de los canales se describe, junto con los canales iónicos regulados por nucleótidos, en el Capítulo 15.

Hasta ahora se han descrito más de 100 tipos de canales iónicos y todavía se están descubriendo más, cada uno de los cuales se caracteriza por los iones que transporta, el mecanismo por el que se cierra y por su abundancia y localización en la célula. Los canales iónicos son responsables de la excitabilidad eléctrica de las células musculares y median la mayoría de las formas de señalización eléctrica del sistema nervioso. Una sola neurona puede contener, típicamente, 10 tipos de canales iónicos o más, localizados en diferentes dominios de su membrana plasmática. Pero los canales iónicos no están restringidos a las células excitables eléctricamente. Están presentes en todas las células animales y se encuentran en plantas y microorganismos: son los responsables de propagar el cierre de las hojas de la mimosa o de que los paramecios unicelulares cambien de dirección después de colisionar.

Quizá los canales iónicos más comunes son los que permiten el tránsito de K^+. Estos canales se hallan en la membrana plasmática de casi todas las células animales. Un subtipo importante de canales de K^+ se abren incluso en un célula no estimulada, o "en reposo", de ahí que a veces se les denomine **canales de fuga de K^+**. Aunque este término engloba varios tipos de canales de K^+ diferentes, según el tipo celular, todos tienen la misma función. Al hacer que la membrana plasmática sea mucho más permeable al K^+ que a otros iones, desempeñan un papel crucial en el mantenimiento del potencial de membrana a través de todas las membranas plasmáticas.

El potencial de membrana en las células animales depende principalmente de los canales de fuga de K^+ y del gradiente de K^+ a través de la membrana plasmática

Cuando existe una diferencia de cargas eléctricas a ambos lados de una membrana, se establece un **potencial de membrana**, debido a un ligero exceso de iones positivos sobre los negativos en un lado y un ligero déficit en el otro. Estas diferencias de carga pueden deberse tanto a un bombeo electrogénico activo (véase p. 662) como a una difusión pasiva de iones. Como trataremos en el Capítulo 14, las bombas electrogénicas de H^+ de la membrana mitocondrial interna generan la mayor parte del potencial de membrana de la mitocondria. Las bombas electrogénicas también generan la mayor parte del potencial eléctrico de la membrana plasmática de plantas y hongos. Sin embargo, en las células animales son generalmente los movimientos pasivos de iones los que realizan la principal contribución al potencial eléctrico de la membrana plasmática.

Tal como se ha explicado, la bomba de Na^+/K^+ facilita el mantenimiento del balance osmótico a ambos lados de la membrana de la célula animal al mantener muy baja la concentración intracelular de Na^+. Dado que hay muy poco Na^+ en el interior de la célula, se tienen que acumular otros cationes para poder contrarrestar las cargas debidas a los aniones fijos de la célula –las moléculas orgánicas cargadas negativamente que están confinadas en el interior de la célula. Este papel equilibrador lo realiza sobre todo el K^+, que es bombeado activamente al interior de la célula por la bomba Na^+/K^+ y que también puede desplazarse hacia el interior o el exterior por los *canales de fuga de K^+* de la membrana plasmática. A causa de estos canales, el potasio puede llegar casi hasta el equilibrio, en el que una fuerza eléctrica ejercida por el exceso de cargas negativas que atraen el K^+ hacia el interior de la célula equilibra la tendencia del K^+ de difundir hacia el exterior a favor de su gradiente de concentración. El potencial de membrana es la manifestación de esta fuerza eléctrica y podemos calcular su valor de equilibrio a partir del valor del gradiente de concentración de K^+. La siguiente explicación puede ayudar a aclarar este punto.

Supongamos que inicialmente no haya un gradiente de voltaje a través de la membrana plasmática (el potencial de membrana es cero), pero la concentración de K^+ es alta en el interior de la célula y baja en el exterior. El K^+ tenderá a salir de la célula a través de los canales de fuga de K^+, impulsado por su gradiente de concentración. A medida que el K^+ empieza a salir de la célula, cada ion deja un desequilibrio de carga negativa por lo que se genera un

LA ECUACIÓN DE NERNST Y EL FLUJO IÓNICO

El flujo de cualquier ion a través de un canal de membrana viene establecido por el gradiente electroquímico de ese ion. Este gradiente representa la combinación de dos influencias: el gradiente de voltaje y el gradiente de concentración del ion a través de la membrana. Cuando estas dos influencias se contrarrestan entre sí, el gradiente electroquímico del ion es cero y no hay un flujo *neto* del ion a través del canal. El gradiente de voltaje (potencial de membrana) al cual se alcanza el equilibrio se llama potencial de equilibrio de este ion. Se puede calcular a partir de la ecuación que se deduce a continuación, llamada ecuación de Nernst.

La ecuación de Nernst es

$$V = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_o}{C_i}$$

donde

V = potencial de equilibrio en voltios (potencial interno menos potencial externo)
C_o y C_i = concentraciones externa e interna del ion, respectivamente
R = la constante de los gases (2 cal mol^{-1} K^{-1})
T = la temperatura absoluta (K)
F = la constante de Faraday ($2{,}3 \times 10^4$ cal V^{-1} mol^{-1})
z = la valencia (carga) del ion
ln = logaritmo en base e

La ecuación de Nernst se deduce de la siguiente manera:

Una molécula en una solución (un soluto) tiende a desplazarse desde una región de alta concentración hacia otra de baja concentración, simplemente por el movimiento aleatorio de las moléculas, que alcanzan así su equilibrio. Por lo tanto, el desplazamiento a favor de un gradiente de concentración está acompañado por un cambio favorable de energía libre ($\Delta G < 0$), mientras que un desplazamiento en contra de gradiente está asociado a un cambio desfavorable de energía libre ($\Delta G > 0$). (La energía libre se trata en el Capítulo 2 y en el Panel 14–1, p. 830, es analizada en el contexto de las reacciones redox.)

La variación de energía libre por mol de soluto desplazado a través de la membrana plasmática (ΔG_{conc}) es igual a $-RT \ln C_o / C_i$.

Si el soluto es un ion, su desplazamiento a través de una membrana cuyo interior esté a un voltaje V respecto del exterior origina otro cambio adicional de energía libre (por mol de soluto transferido) de $\Delta G_{volt} = zFV$.

En el punto en que los gradientes de concentración y voltaje se contrarrestan,

$$\Delta G_{conc} + \Delta G_{volt} = 0$$

y la distribución del ion a través de la membrana está en equilibrio.

Así pues,

$$zFV - RT \ln \frac{C_o}{C_i} = 0$$

y, por tanto,

$$V = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_o}{C_i}$$

o, utilizando la constante para pasar logaritmos en base e a logaritmos en base 10,

$$V = 2{,}3 \frac{RT}{zF} \log_{10} \frac{C_o}{C_i}$$

Para un ion monovalente,

$$2{,}3 \frac{RT}{F} = 58 \text{ mV a } 20\ °C \text{ y } 61{,}5 \text{ mV a } 37\ °C$$

De esta forma, para este ion a 37 °C,

$$V = +\,61{,}5 \text{ mV para } C_o / C_i = 10,$$

mientras que

$$V = 0 \text{ para } C_o / C_i = 1.$$

El potencial de equilibrio para el K^+ (V_K), por ejemplo, es

$61{,}5 \log_{10}([K^+]_o / [K^+]_i)$ milivoltios

(−89 mV en una célula típica en la cual $[K^+]_o$ = 5 mM y $[K^+]_i$ = 140 mM).

A V_K, no hay flujo neto de K^+ a través de la membrana.

De manera parecida, cuando el potencial de membrana tiene un valor de

$61{,}5 \log_{10}([Na^+]_o / [Na^+]_i)$,

el potencial de equilibrio del Na^+ (V_{Na}),

no hay flujo neto de Na^+.

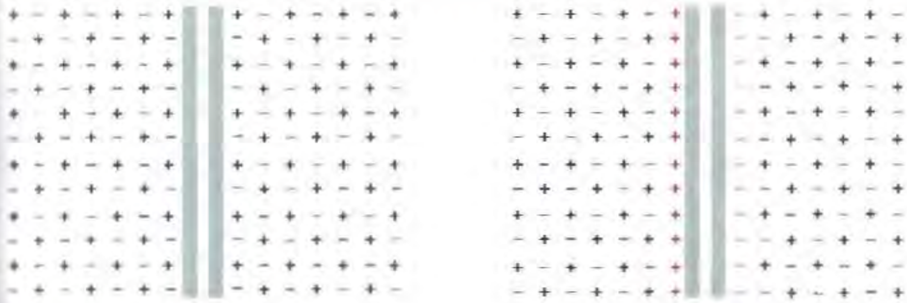
Para cualquier valor del potencial de membrana, V_M, la fuerza neta que impulse un tipo particular de ion fuera de la célula, será proporcional a la diferencia entre V_M y el potencial de equilibrio de ese ion: es decir,

para el K^+ sera $V_M - V_K$

y para el Na^+ sera $V_M - V_{Na}$.

El número de iones que forman la capa de cargas adyacente a la membrana es minúsculo comparado con el número total dentro de la célula. Por ejemplo, el desplazamiento de 6000 iones Na^+ a través de 1 μm^2 de membrana supone una carga suficiente para cambiar el potencial de membrana aproximadamente 100 mV.

Dado que hay aproximadamente 3×10^7 iones Na^+ en una célula típica (con un volumen de citoplasma de aproximadamente 1 μm^3), este desplazamiento de cargas suele tener un efecto despreciable en el gradiente de concentración del ion a través de la membrana.



número de cargas exactamente igual a cada lado de la membrana; potencial de membrana = 0

algunos iones positivos (*rojo*) cruzan la membrana de derecha a izquierda, dejando atrás sus contraiones negativos (*rojo*); se establece un potencial de membrana distinto de cero

Figura 11–22 Base iónica de un potencial de membrana. Un pequeño flujo de iones supone una transferencia de carga suficiente para provocar un gran cambio en el potencial de membrana. Los iones responsables del potencial de membrana se disponen en una fina capa (< 1 nm) adyacente a la membrana, retenidos por la atracción eléctrica de los iones de carga opuesta (contraiones) de la otra cara de la membrana. En una célula típica, la transferencia de un lado a otro de la membrana de 1 microculombio de carga (6 × 10^{12} iones monovalentes) por centímetro cuadrado de membrana provoca un cambio de aproximadamente 1 V. Esto significa, por ejemplo, que en una célula esférica de 10 μm de diámetro, el número de iones K^+ que tienen que desplazarse para alterar el potencial de membrana unos 100 mV es tan sólo de unos 1/100.000 del número total de iones K^+ del citosol.

campo eléctrico o potencial de membrana, que tenderá a oponerse a la salida de K^+. La salida neta de K^+ se detiene cuando el potencial de membrana alcanza un valor cuya fuerza eléctrica compensa exactamente el efecto del gradiente de concentración del K^+, es decir, cuando el gradiente electroquímico del K^+ es cero. Aunque los iones Cl^- también se equilibran a ambos lados de la membrana, el potencial de membrana mantiene la mayoría de estos iones fuera de la célula a causa de sus cargas negativas.

La condición de equilibrio, en la que no hay un flujo neto de iones a través de la membrana plasmática, define el **potencial de reposo de la membrana** de esta célula idealizada. Una fórmula sencilla pero muy importante, la **ecuación de Nernst**, cuantifica este equilibrio y, tal como se explica en el **Panel 11–2**, permite calcular el potencial de membrana de reposo teórico si conocemos la relación entre las concentraciones interna y externa del ion. Sin embargo, la membrana plasmática de una célula real no sólo es permeable al K^+ y al Cl^-, por lo que el potencial de membrana de reposo real no suele ser exactamente igual al predicho por la ecuación de Nernst para el K^+ o el Cl^-.

Cuando se detiene la bomba Na^+/K^+, el potencial de reposo sólo decae levemente

El número de iones que se deben desplazar a través de la membrana plasmática para establecer el potencial de membrana es muy reducido. Por lo tanto, podemos pensar que el potencial de membrana aparece por desplazamientos de cargas que casi no afectan a las *concentraciones* de iones y que generan una diferencia muy ligera entre el número de iones positivos y negativos a ambos lados de la membrana (**Figura 11–22**). Además, por lo general estos desplazamientos de cargas son muy rápidos, ya que se dan como máximo en unos cuantos milisegundos.

Consideremos la variación del potencial de membrana de una célula real tras la inactivación repentina de la bomba Na^+/K^+. Inmediatamente, tiene lugar una ligera caída del potencial de membrana, debido a que la bomba es electrogénica y, mientras está activa, realiza una pequeña contribución directa al potencial de membrana bombeando hacia el exterior tres Na^+ por cada dos K^+ que bombea hacia adentro. Sin embargo, la desconexión de la bomba no elimina el componente principal del potencial de reposo, que se genera por el mecanismo de equilibrio de K^+ que se ha descrito antes. Este componente del potencial de membrana persiste mientras la concentración de Na^+ del interior de la célula permanece baja y la de K^+, alta, generalmente, durante varios minutos. Pero la membrana plasmática es un poco permeable a todos los iones pequeños, incluso al Na^+. Así pues, sin la bomba Na^+/K^+, los gradientes de iones que la bomba ayuda a mantener, acabarán desapareciendo y el potencial de membrana establecido por la difusión a través de los canales de fuga de K^+ también caerá. A medida que el Na^+ entra, el balance osmótico se va viendo comprometido y va entrando agua en la célula (véase el Panel 11–1, p. 664) y la célula finalmente llegará a un nuevo estado de reposo en el que el Na^+, el K^+ y el Cl^- estarán en equilibrio a través de la membrana. El potencial de membrana en este estado será mucho menor que el que tenía la célula con una bomba Na^+/K^+ activa.

El potencial de reposo de una célula animal varía entre –20 mV y –120 mV, dependiendo del organismo y del tipo celular de que se trate. Aunque el gradiente de K^+ siempre tiene

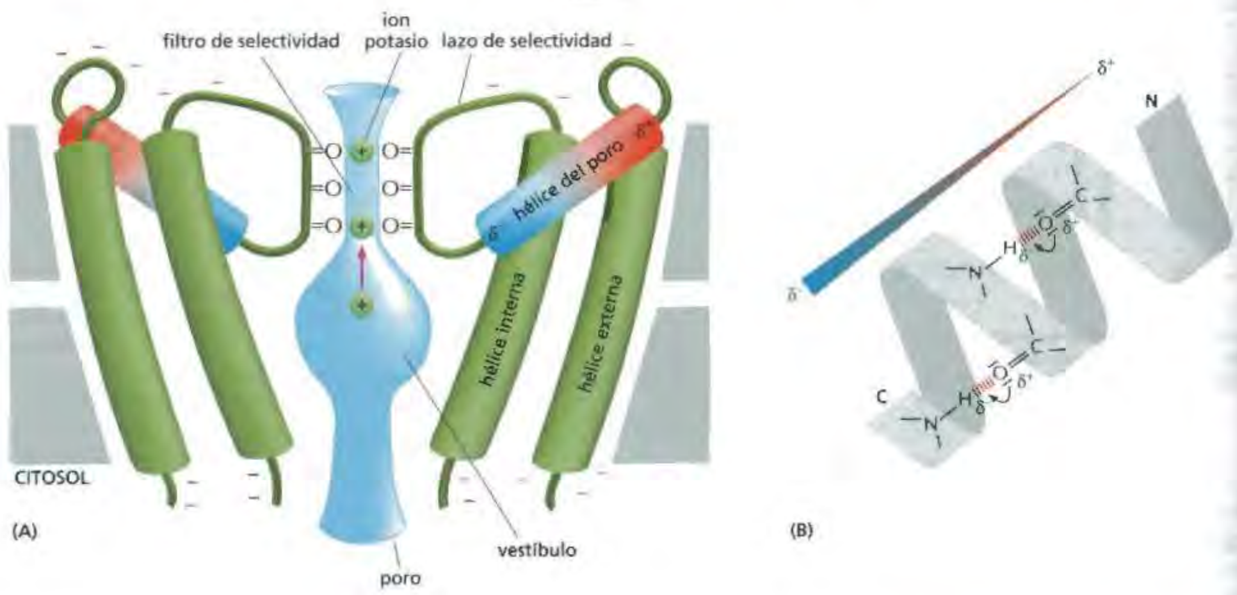


Figura 11-23 **Estructura de un canal bacteriano de K⁺.** <ATTA> (A) Se muestran dos hélices α transmembrana de dos de las cuatro subunidades idénticas. Desde el lado citosólico, el poro se abre a un vestíbulo en el interior de la membrana. El vestíbulo facilita el transporte al permitir que los iones K^+ permanezcan hidratados aunque estén en el interior de la membrana. El estrecho filtro de selectividad une el vestíbulo con el exterior de la célula. Las paredes del filtro de selectividad están tapizadas con los oxígenos de los grupos carbonilo del esqueleto peptídico, que suponen centros de unión transitorios para los iones K^+ deshidratados. Las posiciones de los iones K^+ en el poro se determinaron sumergiendo cristales de la proteína en una solución que contenía iones rubidio, que son más densos a los electrones que los de K^+, pero sólo un poco mayores; a partir de las diferencias en los patrones de difracción obtenidos con los iones K^+ y con los iones rubidio en el canal, se pudo calcular las posiciones de los iones. Dos iones K^+ ocupan los centros en el filtro de selectividad, mientras un tercer ion K^+ está situado en el centro del vestíbulo, donde se estabiliza por interacciones eléctricas con los extremos cargados negativamente de las hélices del poro. Los extremos de las cuatro hélices (sólo se muestran dos de ellos) miran precisamente hacia el centro del vestíbulo, guiando así a los iones K^+ hacia el filtro de selectividad. Determinados aminoácidos cargados negativamente (indicados como signos negativos en *rojo*) se concentran cerca del canal de entrada y salida. (B) A causa de la polaridad de los enlaces de hidrógeno (*rojo*) que unen las diferentes vueltas que presenta una hélice α, cada hélice α tiene un dipolo eléctrico a lo largo de su eje, con un extremo C-terminal cargado más negativamente (δ^-) y un extremo N-terminal cargado más positivamente (δ^+). (A, adaptado de D.A. Doyle et al., *Science* 280:69-77, 1998. Con la autorización de la AAAS.)

una influencia principal sobre este potencial, los gradientes de otros iones (y los efectos desequilibradores de las bombas iónicas) también tienen un efecto significativo: cuanto más permeable es la membrana a un ion determinado, mayor tendencia tiene el potencial de membrana a alcanzar el valor de equilibrio para ese ion. Por lo tanto, cambios en la permeabilidad de la membrana a los iones pueden causar cambios muy importantes en el potencial de membrana. Éste es uno de los principios clave que relacionan la excitabilidad eléctrica de las células con las actividades de los canales iónicos.

Para entender cómo seleccionan los canales sus iones y cómo se abren y se cierran, es necesario conocer su estructura atómica. El primer canal iónico cristalizado y estudiado por difracción de rayos X fue un canal de K^+ bacteriano. Los detalles de su estructura revolucionaron el conocimiento de los canales iónicos.

La estructura tridimensional de un canal bacteriano de K^+ muestra cómo funciona un canal iónico

Los científicos se han enfrentado al problema de la notable capacidad de los canales iónicos de combinar una exquisita selectividad iónica con una elevada conductancia. Los canales de fuga de K^+, por ejemplo, transportan el K^+ 10.000 veces mejor que el Na^+, aunque ambos iones son esferas de características parecidas y con diámetros similares (0,133 nm y 0,095 nm, respectivamente). La sustitución de un único aminoácido en el poro de un canal de K^+ de una célula animal puede provocar la pérdida de la selectividad iónica y la muerte celular. No podemos explicar la selectividad normal al K^+ en base al tamaño del poro, ya que el Na^+ es menor que el K^+. Además, la elevada conductancia es incompatible con la presencia en el canal de centros de unión de alta afinidad al K^+, ya que la unión de los iones K^+ a estos centros disminuiría de forma considerable su velocidad de transporte.

Este rompecabezas se solucionó al determinarse por cristalografía de rayos X la estructura de un *canal bacteriano de K⁺*. El canal está constituido por cuatro subunidades transmembrana idénticas, que forman en conjunto un poro central que atraviesa la membrana (**Figura 11-23**). En la entrada citosólica del poro se concentran aminoácidos cargados negativamente, que supuestamente atraen cationes y repelen aniones, lo que hace que el canal sea selectivo para cationes. Cada subunidad aporta dos hélices transmembrana, dispuestas en la membrana de manera que juntas forman una especie de cono, con su extremo ancho dirigido hacia el exterior de la célula, por donde los iones K^+ abandonan el canal. La cadena polipeptídica que conecta las dos hélices transmembrana forma un corto segmento de hélice α (la *hélice del poro*) y un lazo protuberante que resulta crucial en la sección ancha del cono, que forma el **filtro de selectividad**. Los lazos de selectividad de las cuatro subunidades forman un poro corto, rígido y estrecho, en el que se alinean los átomos de oxígeno de los grupos carbonilo del esqueleto polipeptídico. Dado que todos los lazos de selectividad de todos los canales de K^+ conocidos tienen unas secuencias de aminoácidos similares, es muy

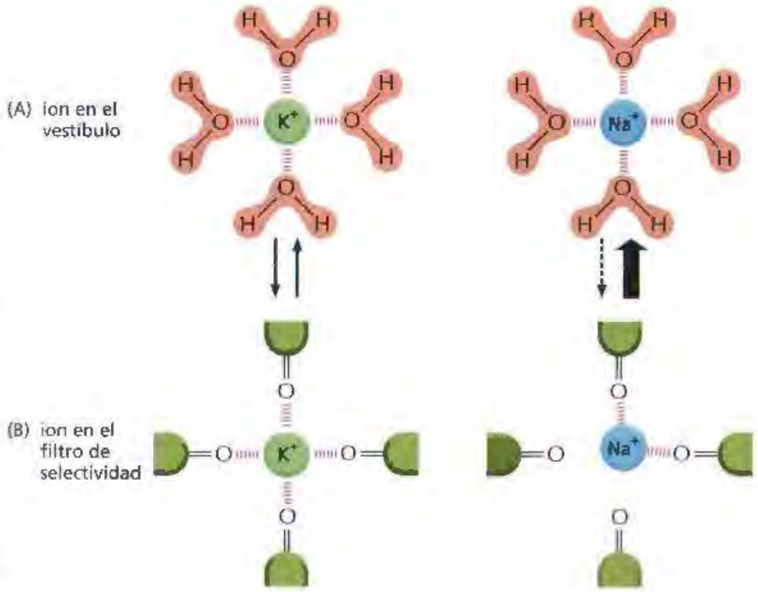


Figura 11-24 Determinación de la especificidad para el K^+ del filtro de selectividad del canal de K^+. La figura muestra iones de K^+ y Na^+ (A) en el vestíbulo y (B) en el filtro de selectividad del poro, vistos en sección transversal. En el vestíbulo, los iones están hidratados. En el filtro de selectividad, han perdido sus moléculas de agua y los oxígenos de los grupos carbonilo están situados de forma precisa acomodando al ion K^+ deshidratado. La deshidratación del ion K^+ requiere energía, que se recupera precisamente por la interacción del ion con los oxígenos de los grupos carbonilo, que actúan como si fueran moléculas de agua. El Na^+ es demasiado pequeño para interaccionar con los oxígenos, por lo que sólo puede entrar en el filtro de selectividad a expensas de un gran gasto energético. De esta forma, el filtro selecciona los iones K^+ con una gran especificidad. (Adaptado de D.A. Doyle et al., *Science* 280:69-77, 1998. Con la autorización de la AAAS.)

probable que todos ellos tengan una estructura muy semejante. La estructura cristalina muestra la existencia dentro del filtro de selectividad de dos iones K^+ en fila india, separados uno de otro unos 0,8 nm. Se supone que la repulsión mutua entre los dos iones ayuda a que se desplacen a través del poro hasta el fluido extracelular.

La estructura del filtro de selectividad explica la selectividad iónica del canal. Un ion K^+ tiene que perder casi todas las moléculas de agua que tiene unidas para poder entrar en el filtro, donde interactúa con los oxígenos de los grupos carbonilo que se alinean a lo largo del filtro; los oxígenos están espaciados rígidamente a una distancia exacta que permite acomodar al ion K^+. Por el contrario, el ion Na^+ no puede entrar en el filtro porque los oxígenos carbonilo están demasiado alejados del Na^+, más pequeño que el K^+, para compensar el gasto energético asociado a la pérdida de las moléculas de agua que se requiere para entrar en el canal (**Figura 11–24**).

Los estudios estructurales de los canales de K^+ y de otros canales han indicado también algunos principios generales sobre cómo se pueden abrir y cerrar estos canales. Parece ser que en la apertura participan desplazamientos de las hélices en la membrana de forma que obstruyen (en el estado cerrado) o dejan libre (en el estado abierto) el paso para el desplazamiento del ión. Dependiendo del tipo particular de canal de que se trate, parece que durante el proceso de apertura y cierre las hélices se inclinan, giran sobre su eje o se curvan. La estructura del canal de K^+ cerrado muestra que mediante la inclinación de las hélices interiores el poro se constriñe como un diafragma por su extremo citosólico (**Figura 11–25**). De forma general, las cadenas laterales de algunos aminoácidos hidrófobos de la proteína bloquean la pequeña abertura que queda e impiden la entrada de iones.

La mayoría de los canales iónicos están construidos por muchas subunidades idénticas, cada una de las cuales contribuye a formar un poro central común. Sin embargo, la es-

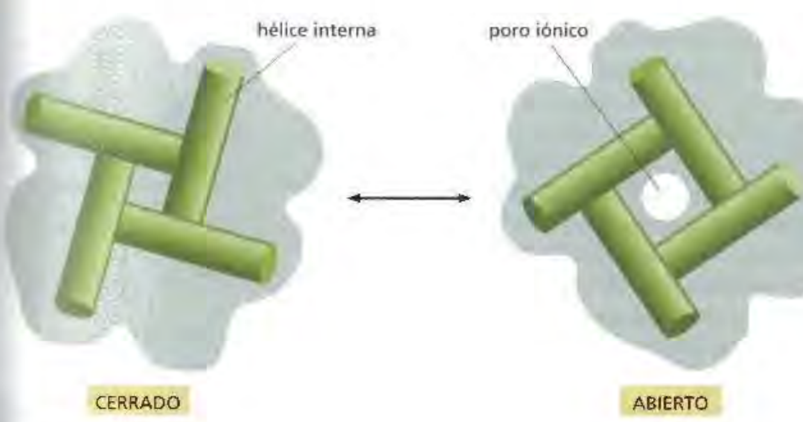


Figura 11-25 Modelo de regulación del canal de K^+ bacteriano. El canal está representado en sección transversal. La conformación cerrada se consigue cuando las cuatro hélices transmembrana internas, que circundan el poro por la cara citosólica del filtro de selectividad (véase Figura 11-23), se reordenan cerrando la entrada citosólica del canal. (Adaptado de E. Perozo et al., *Science* 285:73-78, 1999. Con la autorización de la AAAS.)

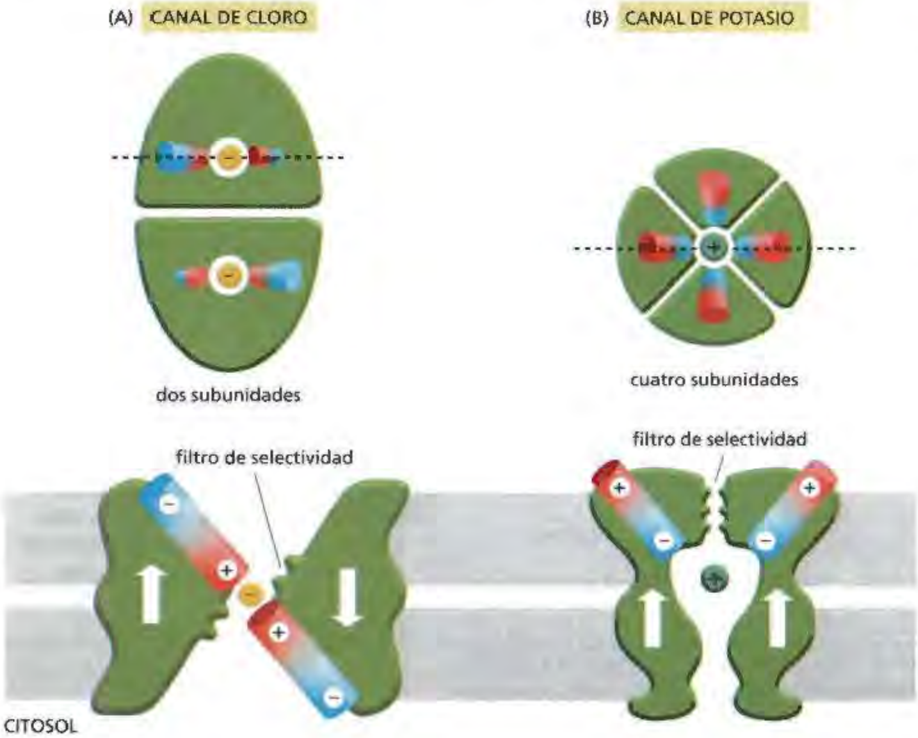


Figura 11–26 Comparación de la arquitectura de los canales de Cl^- y de K (A) El canal de Cl^- es un "canal doble", un dímero formado por dos subunidades idénticas, cada una de las cuales presenta poro que conduce los iones. La figura sup es una representación esquemática de la extracelular del canal, que muestra los do poros idénticos conductores de iones. La figura inferior muestra una sección que atraviesa una subunidad, vista desde el interior de la membrana. (La *línea negra de puntos* en la parte superior indica el plano la sección.) La subunidad es una sola cade polipeptídica formada por dos partes que aunque similares, atraviesan la membrana orientaciones opuestas (*flechas blancas*): c parte aporta al poro una hélice orientada forma que su carga positiva quede dirigid hacia la posición central del filtro de selectividad. Tanto el filtro de selectividad como las hélices bipolares contribuyen a la selectividad del canal para iones Cl^- carg negativamente. (B) Por el contrario, el canal K^+ es un tetrámero formado por cuatro subunidades idénticas, cada una de las cu forma parte del poro central. Las cuatro subunidades tienen la misma orientación la membrana (*flechas blancas*). Cada unida aporta una de las cuatro hélices del poro, c su carga negativa dirigida hacia el vestíbulo estabilizando los iones K^+ cargados positiva mente (véase también la Figura 11–23). (Dibujos inferiores en A y B, adaptado de R. Dutzler et al., *Nature* 415:287-294, 2002 la autorización de Macmillan Publishers Ltd

tructura cristalina reciente determinada del canal de Cl^- ha revelado que algunos canales iónicos tienen una estructura muy diferente a ésta. A pesar de que la proteína es un dímero formado por dos subunidades idénticas, cada una de las subunidades contiene su propio poro a través del cual se desplaza el Cl^-. En el centro de la membrana, unas cadenas laterales de aminoácidos forman un filtro de selectividad que es conceptualmente similar al de los canales de K^+. Pero, a diferencia del filtro de los canales de K^+, en este caso diferentes regiones de la proteína contribuyen con sus cadenas laterales y no están distribuidas de forma simétrica (**Figura 11–26**).

Las acuaporinas son permeables al agua pero impermeables a los iones

Las células procariotas y las células eucariotas tienen **canales de agua**, o **acuaporinas**, embebidos en su membrana plasmática, que permiten que el agua se desplace con facilidad a través de esta membrana. Las acuaporinas son especialmente abundantes en las células que tienen que transportar agua a velocidades particularmente elevadas, como las células epiteliales o las células del riñón.

Las acuaporinas deben resolver este problema que es opuesto al de los canales iónicos. Para evitar romper los gradientes iónicos a través de las membranas, las acuaporinas tienen que dejar pasar rápido las moléculas de agua pero bloqueando por completo el paso de iones. La estructura cristalina de una acuaporina revela de qué forma consiguen esta selectividad tan destacable. Los canales tienen un estrecho poro que permite que las moléculas de agua atraviesen la membrana de una en una atravesando un camino de oxígenos carbonilos que recubren cada lado del poro (**Figura 11–27**A y B). Los aminoácidos hidrofóbicos recubren los otros lados del poro. El poro es demasiado estrecho para que pueda entrar cualquier ion hidratado y el coste energético para deshidratar un ion sería enorme, ya que la pared hidrofóbica del poro no puede interactuar con un ion deshidratado para compensar la pérdida de agua. Este diseño explica por qué las acuaporinas no conducen iones K^+, Na^+, Ca^{2+} ni Cl^-. Para entender por qué estos canales también son impermeables al H^+, recordemos que en la célula la mayoría de protones están en forma H_3O^+, que difunde a través del agua de una forma muy rápida utilizando un mecanismo de liberación molecular que requiere la formación y la rotura de enlaces de hidrógeno entre moléculas adyacentes de agua (Figura 11–27C). Las acuaporinas contienen dos esparraguinas colocadas estratégicamente



que se unen a los átomos de oxígeno central de la molécula de agua en la línea de moléculas de agua que atraviesan el poro. Dado que las dos valencias de este oxígeno son inasequibles para formar enlaces de hidrógeno, la molécula central de agua no puede participar en ninguna liberación de H^+ por lo que el poro es impermeable a los protones (Figura 11–27C y D).

Algunos canales de agua bacterianos similares a las acuaporinas también conducen glicerol y pequeños azúcares, que interactúan con oxígenos carbonilo situados de forma similar recubriendo el poro. Estos contactos transitorios que hacen los solutos con las paredes del poro aseguran que el transporte sea altamente específico sin impedir de forma significativa la velocidad a la que los solutos atraviesan el poro. Cada canal individual de acuaporina deja pasar unas 10^9 moléculas de agua por segundo.

Las células que utilizan los canales de una forma más sofisticada son las neuronas. Antes de explicar cómo lo hacen, una breve digresión permitirá describir como está organizada una neurona.

Figura 11–27 **La estructura de las acuaporinas.** (A) Diagrama de cintas de un monómero de acuaporina. Las acuaporinas forman tetrámeros en la membrana, en los que cada monómero tiene un poro central (no mostrado). (B) Un modelo especial compacto de un monómero de acuaporina, cortado y abierto como un libro de manera que sea visible el poro interior. Los aminoácidos que revisten los poros están coloreados: en *rojo* y *azul*, los aminoácidos hidrofílicos; en *amarillo*, los hidrofóbicos. En *verde* se muestran los aminoácidos no relacionados en la formación del poro. Obsérvese que una de las caras del poro está revestida con aminoácidos hidrofílicos, que proporcionan uniones de hidrógeno transitorias para moléculas de agua; estas uniones ayudan a alinear las moléculas de agua en transición en fila y las orientan en su paso a través de la membrana. Por el contrario, la otra cara de los poros está desprovista de estos aminoácidos, proporcionando una *capa hidrofóbica* que no permite la formación de enlaces de hidrógeno. (C y D) Un modelo que explica por qué las acuaporinas son impermeables a H^+. (C) En el agua, los iones de H^+ se difunden de manera muy rápida, al ser transmitidos de una molécula de agua a otra cercana. (D) Dos esparraguinas, situadas estratégicamente en el centro de cada poro de acuaporina, ayudan a amarrar una molécula central de agua, ocupando las dos valencias del oxígeno e impidiendo así la transmisión de un H^+. (A y B, adaptado de R.M. Stroud et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13:424-431, 2003. Con la autorización de Elsevier.)

La función de una neurona depende de su estructura alargada

La labor fundamental de una **neurona**, o **célula nerviosa**, es recibir, conducir y transmitir señales. Para llevar a cabo estas funciones, las neuronas suelen ser extremadamente alargadas. Por ejemplo, una sola neurona de un ser humano que vaya desde la médula espinal hasta un músculo del pie, puede llegar a medir 1 metro de largo. Cada neurona consta de un cuerpo o soma celular (que contiene el núcleo) y un número variable de pequeñas prolongaciones que irradian de él. Por lo general, una de estas prolongaciones es un largo **axón** que conduce las señales desde el soma celular hasta dianas que pueden estar muy alejadas, mientras que las otras prolongaciones más cortas y ramificadas, las **dendritas**, son expansiones del soma celular a modo de antenas, que aumentan la superficie necesaria para recibir señales desde los axones de otras neuronas (**Figura 11–28**) a pesar de que el soma celular también recibe señales. Un axón típico se divide en su extremo distal en muchas ramificaciones, lo cual le permite transmitir su mensaje a muchas células diana de forma simultánea. Del mismo modo, el grado de ramificación de las dendritas también puede ser muy elevado; en algunos casos, suficiente para recibir hasta 100.000 señales en una sola neurona.

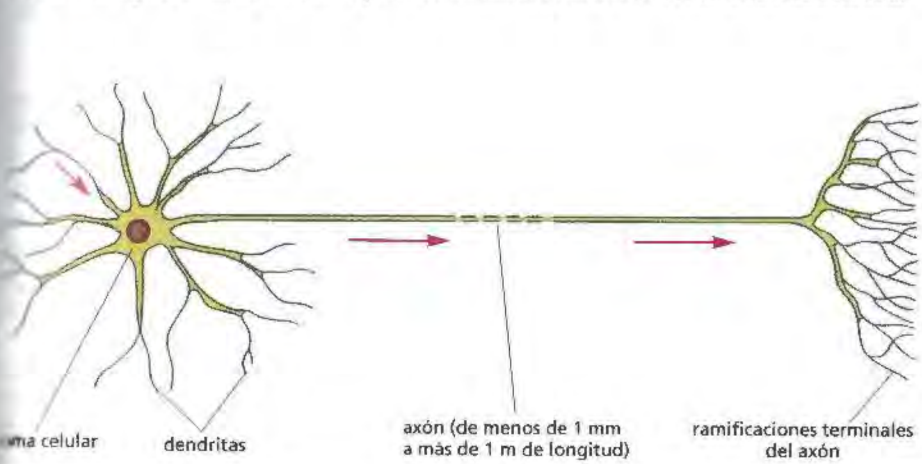


Figura 11–28 **Una neurona típica de vertebrados.** Las flechas indican la dirección en que viajan las señales. El único axón de la célula transporta las señales desde el soma celular, mientras que las múltiples dendritas (y el soma celular) reciben señales de los axones de otras neuronas. Las terminaciones nerviosas acaban en las dendritas o en los somas de otras neuronas o en otros tipos celulares, como fibras musculares o glándulas.

A pesar de que las señales transmitidas por las diferentes clases de neuronas pueden tener significados muy variados, la forma de la señal siempre es la misma: una serie de cambios en el potencial eléctrico de la membrana plasmática de la neurona. La señal se transmite porque una perturbación eléctrica en una zona de la célula se desplaza a otras zonas de la célula, a pesar de que la perturbación se iría debilitando a medida que se distanciara de la fuente, si no se utilizase energía para amplificarla mientras viaja. En distancias cortas, esta atenuación no es muy importante; de hecho, muchas neuronas pequeñas pueden transmitir sus señales de forma pasiva, sin amplificación. Pero para la comunicación a larga distancia, esta transmisión pasiva no es adecuada. Por tanto, las neuronas mayores deben utilizar un mecanismo de señalización activo, que constituye una de sus características más notables. Un estímulo eléctrico que sobrepase una cierta intensidad umbral dispara una explosión de actividad eléctrica que se propaga rápidamente a lo largo de la membrana plasmática de la neurona y se mantiene mediante amplificación automática durante todo el recorrido. Esta onda de excitación eléctrica, conocida como **potencial de acción** o *impulso nervioso*, puede transportar un mensaje sin atenuación desde un extremo de una neurona al otro, a velocidades de 100 metros por segundo. Como vamos a describir a continuación, los potenciales de acción son la consecuencia directa de las propiedades de los canales catiónicos regulados por voltaje.

Los canales catiónicos regulados por voltaje generan potenciales de acción en las células excitables eléctricamente

La membrana plasmática de todas las células excitables eléctricamente – no sólo las neuronas, sino también las fibras musculares, las células endocrinas y los oocitus– tiene **canales catiónicos regulados por voltaje**, que son los responsables de generar los potenciales de acción. Un potencial de acción se dispara por la *despolarización* de la membrana plasmática, es decir, por una variación del potencial de membrana a un valor menos negativo en el interior. (Veremos más adelante de qué manera los neurotransmisores producen una despolarización.) En las células nerviosas y en las fibras de la musculatura esquelética, un estímulo capaz de provocar la suficiente despolarización abre unos **canales de Na^+ regulados por voltaje**, permitiendo que entre en la célula una pequeña cantidad de Na^+ a favor de su gradiente electroquímico. La entrada de cargas positivas aumenta la despolarización de la membrana, lo que provoca la apertura de más canales de Na^+ y la entrada de más Na^+, lo que, a su vez, lleva a una mayor despolarización. Este proceso de autoamplificación (un ejemplo de *retroalimentación positiva*, analizada en el Capítulo 15) continúa hasta que, en una fracción de milisegundo, el potencial eléctrico de la región de la membrana que ha sido

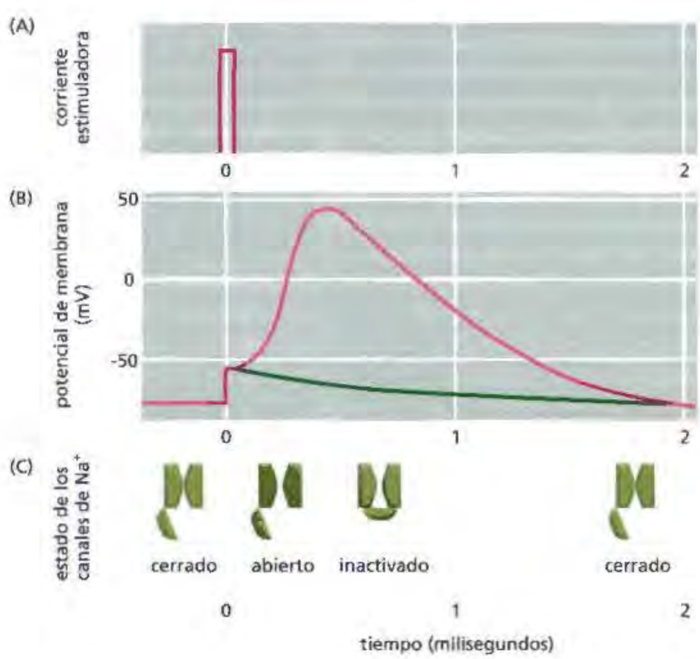


Figura 11–29 Un potencial de acción. <CGAG> (A) Se dispara un potencial de acción mediante un breve pulso de corriente que (B) despolariza de forma parcial la membrana, como se muestra en la gráfica del potencial de membrana en función del tiempo. La *curva verde* muestra cómo regresaría el potencial de membrana a su valor de reposo después del estímulo inicial si no hubiera canales de Na^+ regulados por voltaje en la membrana; este retorno relativamente lento del potencial de membrana a su valor inicial de –70 mV en ausencia de canales de Na^+ abiertos se debe a la salida de K^+ a través de los canales de K^+ regulados por voltaje, que se abren en respuesta a la despolarización de la membrana y la devuelven al potencial de equilibrio de K^+. La *curva roja* muestra el curso de un potencial de acción causado por la apertura y la posterior inactivación de los canales de Na^+ regulados por voltaje, cuyo estado se muestra en (C). La membrana no puede disparar un segundo potencial de acción hasta que los canales de Na^+ regresen a su conformación cerrada; hasta entonces, la membrana es refractaria a la estimulación.

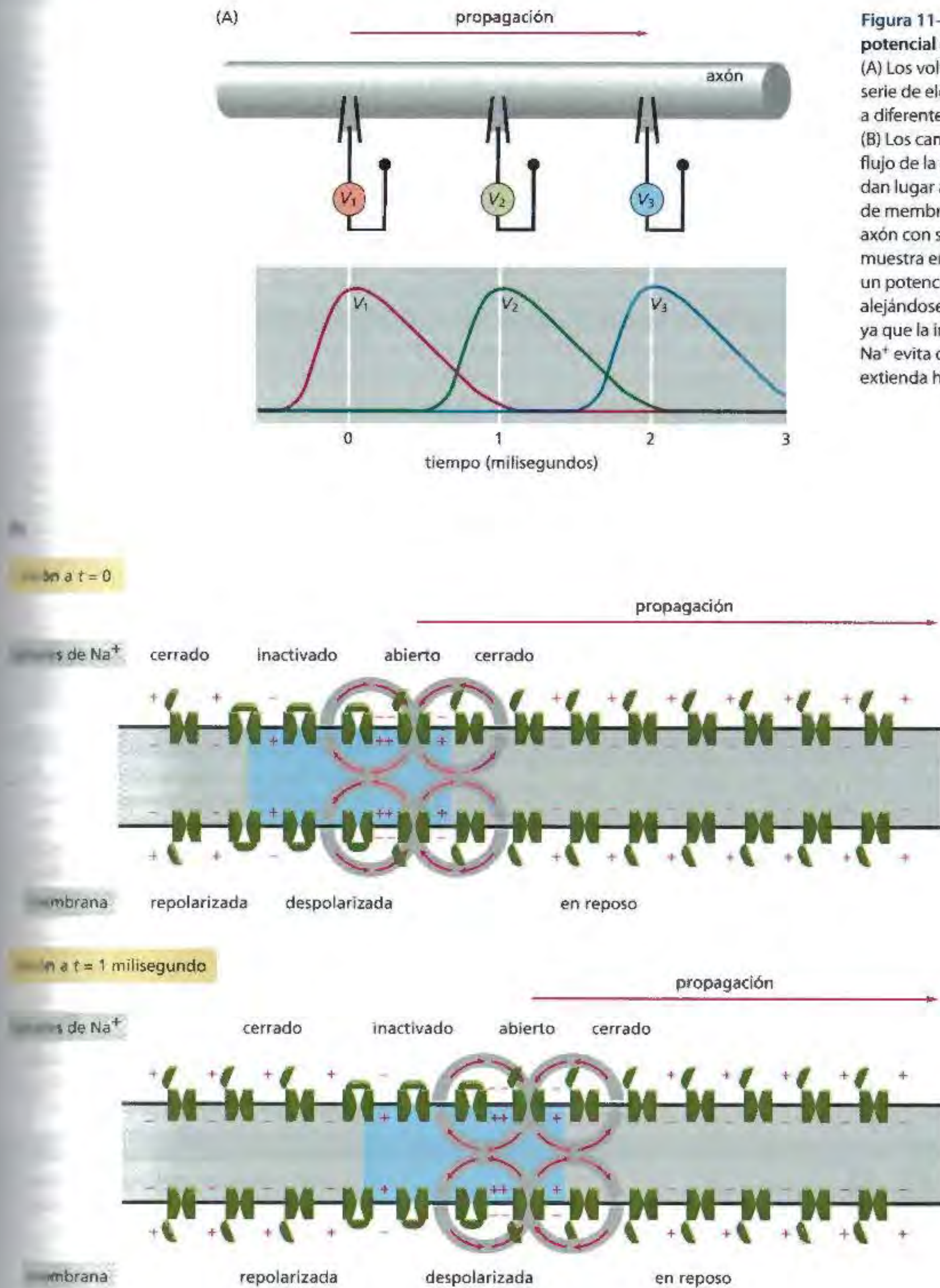


Figura 11–30 La propagación de un potencial de acción a lo largo de un axón. (A) Los voltajes que se registrarían en una serie de electrodos intracelulares situados a diferentes intervalos a lo largo del axón. (B) Los cambios en los canales de Na$^+$ y el flujo de la corriente (*flechas naranja*) que dan lugar a la perturbación del potencial de membrana que se desplaza. La región del axón con su membrana despolarizada se muestra en *azul*. Hay que resaltar que un potencial de acción sólo puede viajar alejándose del punto de despolarización, ya que la inactivación de los canales de Na$^+$ evita que la despolarización se extienda hacia atrás.

...ctada pasa de su valor de –70 mV en reposo a un valor de +50 mV, próximo al del potencial ...equilibrio del Na$^+$ (véase Panel 11–2, p. 670). En este punto, en el que la fuerza electroquí...a que impulsa el flujo de Na$^+$ es casi cero, la célula llegaría a un nuevo estado de reposo, ... todos sus canales de Na$^+$ permanentemente abiertos, si la conformación abierta del ca...l fuera estable. Dos mecanismos actúan de forma concertada para salvar a la célula de este ...pasmo eléctrico: los canales de Na$^+$ se inactivan y los canales de K$^+$ regulados por voltaje se ...bren.

Los canales de Na$^+$ tienen un mecanismo de inactivación automático, que hace que se ...uelvan a cerrar rápidamente incluso aunque la membrana todavía esté despolarizada. Los ...nales de Na$^+$ permanecen en este estado *inactivado*, incapaces de volverse a abrir, hasta ...spués de que el potencial de membrana vuelva a su valor negativo inicial. El ciclo com-

pleto desde el estímulo inicial hasta el retorno al estado de reposo inicial dura unos cuantos milisegundos o menos. Así pues, el canal de Na^+ puede encontrarse en tres estados diferentes: cerrado, abierto e inactivo. En la **Figura 11–29**, se muestra de qué manera el cambio de estado contribuye al aumento y caída del potencial de acción.

Esta descripción de un potencial de acción sólo corresponde a una pequeña zona de la membrana plasmática. La despolarización autoamplificada de esta zona es suficiente para despolarizar las regiones vecinas de la membrana que, a su vez, entran en el mismo ciclo. De esta forma, el potencial de acción recorre toda la membrana plasmática como una ola desde el punto inicial de despolarización, como se observa en la **Figura 11–30**.

Los **canales de K^+ regulados por voltaje** suponen un segundo mecanismo que, en la mayoría de las células nerviosas, contribuye a que la membrana plasmática activada recupere con más rapidez su potencial negativo original y quede preparada para transmitir un segundo impulso. Estos canales se abren en respuesta a una despolarización de la membrana de una manera muy parecida a como lo hacen los canales de Na^+, pero con pequeñas diferencias cinéticas; por esta razón, a veces se les denomina *canales retardados de K^+*. Cuando un canal de K^+ se abre, el flujo de potasio sobrepasa rápido la entrada transitoria de Na^+ y conduce a la membrana hacia el potencial de equilibrio del K^+, incluso antes de que se complete la inactivación de los canales de Na^+.

Al igual que los canales de Na^+, los canales de K^+ también se inactivan automáticamente. Los estudios de mutaciones de los canales de K^+ regulados por voltaje demuestran que los 20 aminoácidos N-terminales de la proteína son necesarios para la inactivación rápida del canal: alterando esta región cambia la cinética de inactivación del canal; eliminando la región se elimina por completo la inactivación. Sorprendentemente, en este último caso, la exposición de la cara citoplasmática de la membrana plasmática a un pequeño péptido sintético que contenga el fragmento amino terminal eliminado restaura la inactivación. Estos descubrimientos sugieren que el extremo N-terminal de cada subunidad del canal de K^+ actúa como una bola anclada mediante una corta cadena, que ocluye el extremo citoplasmático del poro muy poco tiempo después de que se haya abierto e inactiva de esta forma el canal (**Figura 11–31**). Se supone que un mecanismo similar a este participa en la rápida inactivación de los canales de Na^+ regulados por voltaje (que describiremos más adelante), aunque parece que participa un segmento diferente de la proteína.

El mecanismo electroquímico del potencial de acción fue establecido por primera vez en una serie de famosos experimentos realizados en las décadas de 1940 y 1950. En aquella época no se habían desarrollado todavía las técnicas necesarias para estudiar los fenómenos eléctricos en células pequeñas, por lo que se utilizaron neuronas gigantes de calamar. A pesar de los muchos avances técnicos realizados desde entonces, la lógica de los análisis originales continúa siendo un modelo de trabajo. En el **Panel 11–3** se resumen algunos de los experimentos clave originales.

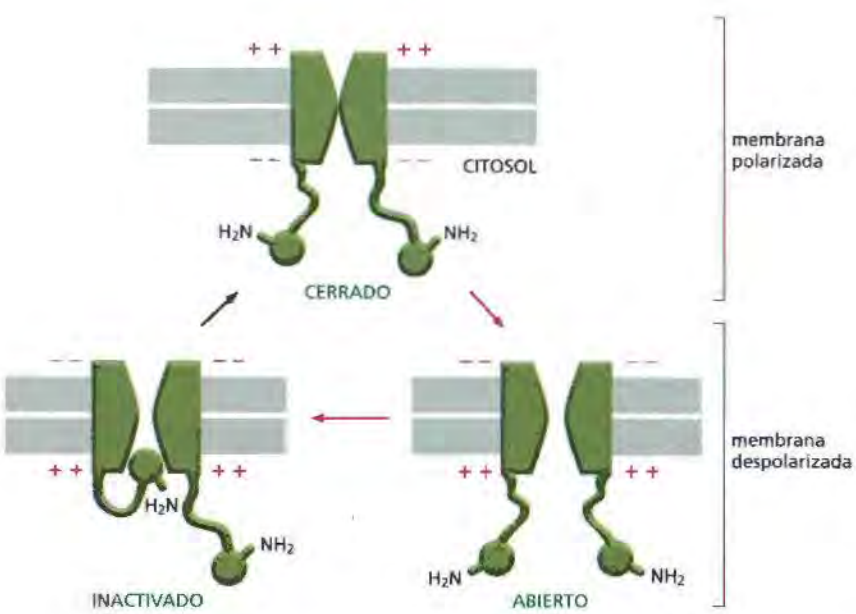
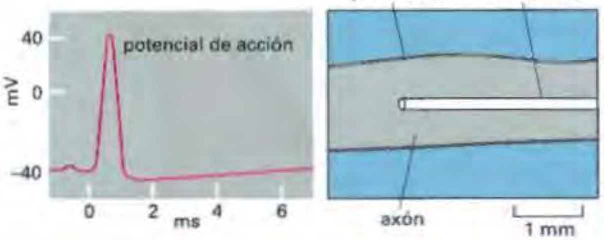


Figura 11–31 El modelo de "la bola y la cadena" de inactivación rápida de los canales de K^+ regulados por voltaje. Cuando la membrana se despolariza, el canal se abre y se inicia el transporte de iones. Si se mantiene la despolarización, el canal abierto adopta una conformación inactiva, en la que el poro queda ocluido por la "bola" formada por los 20 aminoácidos N-terminales, que están unidos al canal por un segmento de cadena polipeptídica no plegada que actúa de "cadena". Para simplificar la figura, sólo se muestran dos bolas; de hecho, hay cuatro, una por cada subunidad. Se ha propuesto un mecanismo similar, que utilizaría otro segmento de la cadena polipeptídica, para la inactivación de los canales de Na^+. Las fuerzas internas estabilizan cada uno de estos estados contra pequeñas perturbaciones, pero una colisión suficientemente violenta con otras moléculas puede hacer que el canal pase de uno de estos estados al otro. El estado de menor energía depende del potencial de membrana porque las diferentes conformaciones tienen diferentes distribuciones de carga. Cuando la membrana está en reposo (altamente polarizada), la conformación *cerrada* tiene la menor cantidad posible de energía libre y, por tanto, es la más estable; cuando la membrana está despolarizada, la energía de la conformación *abierta* es menor, por lo que el canal tiene una alta probabilidad de estar abierto. Pero la energía libre de la conformación *inactivada* es todavía menor, de forma que tras pasar un periodo variable aleatorio en el estado abierto, el canal se inactivará. Por lo tanto, la conformación abierta corresponde a un estado metaestable que sólo puede existir transitoriamente. Las *flechas rojas* indican la secuencia que se sigue tras una despolarización repentina; la *flecha negra* indica el retorno a la conformación original, la de menor energía una vez se ha repolarizado la membrana.

1 Los potenciales de acción se registran con un electrodo intracelular

El axón gigante del calamar mide aproximadamente 0,5-1 mm de diámetro y varios centímetros de longitud. A lo largo del eje del axón, se puede introducir un electrodo en forma de un tubo capilar de vidrio que contenga una solución conductora, de modo que el extremo del capilar se encuentre en el citosol de la célula. Con su ayuda, se pueden medir las diferencias de voltaje entre el interior y el exterior del axón –es decir, el potencial de membrana– al paso de un potencial de acción sobre el electrodo. El potencial de acción se desencadena por un breve estímulo eléctrico en un extremo del axón. No importa en qué extremo, ya que la excitación puede viajar en cualquier sentido; y no importa la intensidad del estímulo, mientras sobrepase un cierto valor umbral: el potencial de acción es de todo o nada.

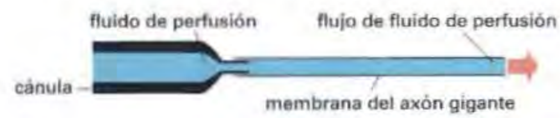


2 Los potenciales de acción sólo dependen de la membrana plasmática de la neurona y de los gradientes de Na⁺ y de K⁺.

Los tres iones más abundantes, tanto en el interior como en el exterior del axón, son el Na^+, el K^+ y el Cl^-. Igual que en otras células, la bomba de Na^+/K^+ mantiene un gradiente de concentración: la concentración de Na^+ es unas 9 veces menor dentro del axón que fuera, mientras que la concentración de K^+ es unas 20 veces mayor dentro que fuera. ¿Qué iones son importantes para el potencial de acción?

El axón gigante del calamar es tan grande y robusto que es posible extraer su citoplasma, como el dentífrico de un tubo, y perfundirlo con soluciones artificiales puras de Na^+, K^+, Cl^- o SO_4^{2-}. Hay que destacar que, si (y sólo si) las concentraciones de Na^+ y K^+ dentro y fuera se aproximan a los valores naturales, el axón todavía será capaz de propagar los potenciales de acción de forma normal. Por tanto, la membrana plasmática es la parte de la célula que resulta importante para la señalización eléctrica; los iones relevantes son el Na^+ y el K^+; el gradiente de concentración a través de la membrana debe aportar una fuente suficiente de energía libre para impulsar el potencial de acción, ya que probablemente todas las demás fuentes de energía metabólica han sido eliminadas con la perfusión.

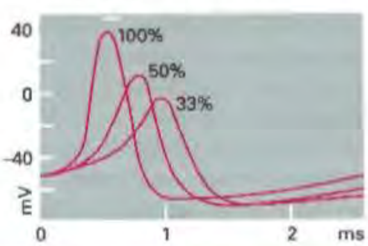




3 En reposo, la membrana es permeable sobre todo al K^+; durante el potencial de acción, se hace temporalmente permeable al Na^+.

En reposo, el potencial de membrana está próximo al potencial de equilibrio para el K^+. Cuando cambia la concentración externa de K^+, el potencial de reposo cambia aproximadamente según la ecuación de Nernst para el K^+ (véase el Panel 11–2). Por tanto, en reposo la membrana es permeable principalmente al K^+: los canales de fuga de K^+ suponen la vía principal de transferencia de este ion a través de la membrana.

Las variaciones de la concentración externa de Na^+ no afectan el potencial de reposo. Sin embargo, la altura del pico del potencial de acción varía de forma aproximada según la ecuación de Nernst para el Na^+. Así pues, durante el potencial de acción, la membrana parece ser permeable principalmente al Na^+: los canales de Na^+ se han abierto. Una vez transcurrido el potencial de acción, el potencial de membrana revierte a un valor negativo que depende de la concentración externa de K^+ y está incluso más próximo al potencial de equilibrio del K^+ que el potencial de reposo: la membrana ha perdido su permeabilidad al Na^+ y se ha hecho incluso más permeable al K^+ que antes, es decir, se han cerrado los canales de Na^+ y se han abierto canales adicionales de K^+.

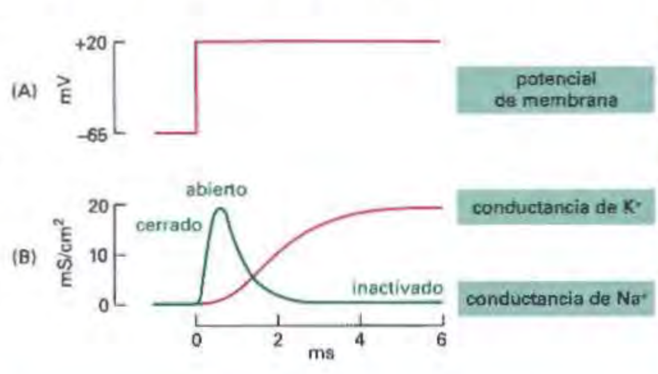


Forma del potencial de acción cuando el medio externo contiene 100%, 50% o 33% de la concentración normal de Na^+.

4 El control de voltaje revela de qué manera el potencial de membrana controla la apertura y cierre de canales iónicos

El potencial de membrana puede ser mantenido artificialmente en un valor constante a lo largo del axón, haciendo pasar la corriente apropiada a través de un hilo metálico insertado a lo largo del eje del axón, mientras se registra el potencial de membrana con otro electrodo intracelular. Cuando se cambia bruscamente el potencial de reposo de la membrana y ésta se mantiene despolarizada (A), los canales de Na^+ se abren con rapidez hasta que la permeabilidad de la membrana al Na^+ es mucho mayor que al K^+; estos canales se cierran espontáneamente poco después, aunque el potencial de membrana se mantenga constante. Los canales de K^+ también se abren, pero más tarde, de modo que la permeabilidad al K^+ aumenta mientras disminuye la del Na^+ (B). Si ahora se inicia de nuevo el experimento, devolviendo la membrana al potencial de reposo durante un breve periodo y despolarizándola de nuevo rápidamente, la respuesta es diferente: la despolarización prolongada ha hecho que los canales de Na^+ entren en un estado inactivado, de modo que la segunda despolarización no consigue provocar el aumento y descenso de su permeabilidad que consiguió la primera vez. La recuperación de este estado inactivado requiere que la membrana pase un tiempo relativamente largo –unos 10 milisegundos– con el potencial de membrana repolarizado (reposo).

En un axón normal, no sometido al control de voltaje, la entrada de Na^+ a través de los canales de Na^+ abiertos produce la chispa que dispara el potencial de acción; la inactivación de los canales de Na^+ y la apertura de los canales de K^+ devuelven la membrana rápidamente a su potencial de reposo.



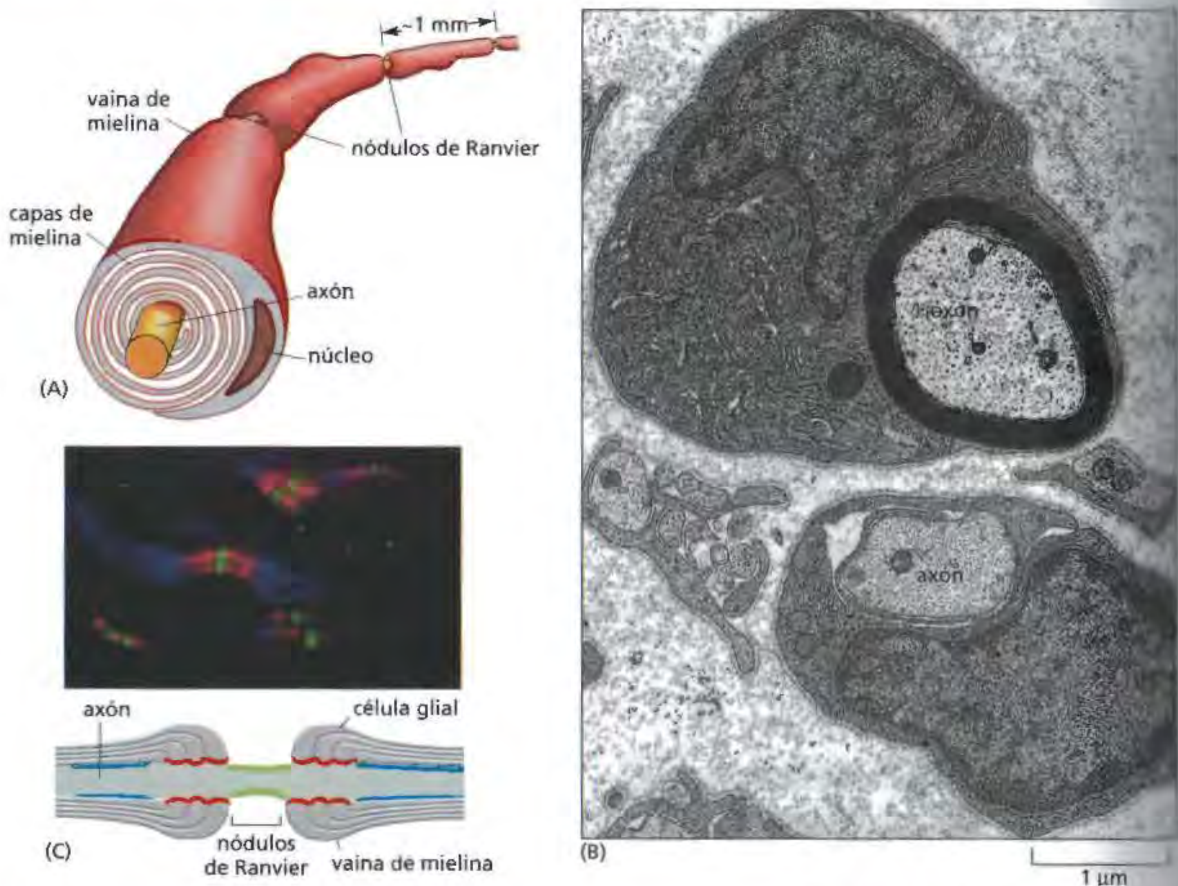


Figura 11–32 Mielinizacion. (A) Axón mielinizado de un nervio periférico. Cada célula de Schwann enrolla su membrana plasmática de forma concéntrica alrededor del axón, formando un segmento de vaina de mielina de aproximadamente 1 mm de longitud. Para mayor claridad del dibujo, las vainas de mielina de la membrana se muestran menos compactadas de lo que son en realidad (véase la ilustración B). (B) Electromicrografía de una sección de un nervio de la pata de una rata joven. Se puede observar dos células de Schwann: una, en la parte inferior, está empezando a mielinizar su axón; la otra, en la parte superior, ya ha formado una vaina de mielina prácticamente madura. (C) Micrografía de fluorescencia y diagrama de axones mielinizados diseccionados a partir de un nervio. Mediante la tinción con anticuerpos, se detectan tres proteinas diferentes. En los nódulos de Ranvier de la membrana del axón se concentran canales de Na^+ regulados por voltaje (teñidos en *verde*) Una proteína extracelular (llamada *Caspr*, teñida en *rojo*) marca el extremo de cada vaina de mielina. Caspr se acumula en los puntos de unión de la membrana plasmática de la célula glial con el axón y proporciona la señal eléctrica. Los canales de K^+ regulados por voltaje (teñido en *azul*) se localizan en la región de la membrana plasmática del axón, próximos a los nudos. (B, de Cedric S. Raine, en Myelin [P. Morell, ed.] New York: Plenum, 1976; C, de M.N. Rasband y P. Shrager, *J. Physiol.* 525:63-73, 2000. Con la autorización de Blackwell Publishing.)

La mielinización incrementa la velocidad y la eficiencia de propagación del potencial de acción en las células nerviosas

Los axones de muchas neuronas de vertebrados están aislados por una **vaina de mielina**, que incrementa la velocidad a la que el axón puede transmitir un potencial de acción. La importancia de la mielinización queda demostrada por la desmielinización que se produce en la *esclerosis múltiple*, enfermedad en la que el sistema nervioso destruye las vainas de mielina de algunas regiones del sistema nervioso central; en las regiones afectadas, la propagación del impulso es mucho más lenta, con unas consecuencias neurológicas devastadoras.

La mielina es fabricada por unas células especiales, llamadas **células gliales**. Las **células de Schwann** mielinizan los axones de los nervios periféricos y los **oligodendrocitos** lo hacen en el sistema nervioso central. Estas células gliales enrollan su membrana plasmática capa tras capa envolviendo al axón en una espiral compacta (**Figura 11–32**A y B), aislando la membrana del axón de tal forma que se pierda muy poca corriente eléctrica. La vaina de mielina está interrumpida en los *nódulos de Ranvier*, distribuidos a intervalos regulares, en los cuales se concentra la mayoría de los canales de Na^+ del axón (véase Figura 11–32C). Las porciones de la membrana del axón rodeadas de mielina tienen unas excelentes propiedades conductoras, es decir, que se comportan eléctricamente como los cables telegráficos subacuáticos, por lo que la despolarización de la membrana en un nódulo se propaga inmediatamente de forma pasiva al siguiente nódulo. Así, un potencial de acción se propaga a lo largo de un axón mielinizado saltando de un nódulo a otro nódulo, proceso conocido como *conducción saltatoria*. Ésta tiene dos ventajas: los potenciales de acción viajan más deprisa y se conserva más energía metabólica, ya que la excitación activa sólo se produce en las pequeñas regiones de la membrana plasmática del axón que no están aisladas eléctricamente, en los nódulos de Ranvier.

El registro de zona indica que cada uno de los canales de Na^+ se abre siguiendo la ley del todo o nada

Las membranas plasmáticas de las neuronas y las fibras musculares esqueléticas contienen muchos miles de canales de Na^+ regulados por voltaje; la corriente total que atraviesa la

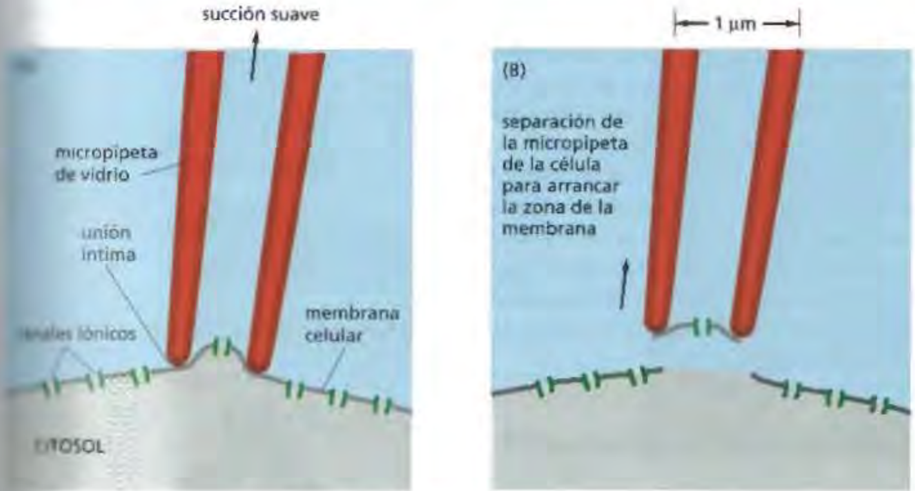


Figura 11-33 La técnica del registro de zona. La unión entre la boca de la micropipeta y la membrana es muy intensa, por lo que la corriente únicamente puede entrar o salir de la micropipeta atravesando los canales de la *zona* de membrana que recubre la boca de la micropipeta. Se utiliza un dispositivo electrónico que permite mantener el potencial de membrana a un valor constante predeterminado mientras se registra la corriente iónica que atraviesa los canales individuales. La corriente de estos canales puede registrarse cuando la zona de la membrana todavía está unida al resto de la célula, como en (A), o separada, como en (B). La ventaja de trabajar en la zona de membrana separada de la célula es que resulta más fácil alterar la composición de la solución a cada lado de la membrana, para estudiar el efecto de diferentes solutos sobre el comportamiento del canal. La zona de membrana separada del resto de la célula también puede colocarse en la orientación opuesta, con la cara citoplasmática de la membrana hacia el lumen de la pipeta.

membrana es la suma de las corrientes que fluyen a través de todos ellos. Esta corriente agregada puede registrarse con un microelectrodo intracelular, tal como se muestra en la Figura 11-30. Sin embargo, también es posible registrar la corriente que fluye a través de cada uno de los canales individualmente. La técnica del **registro de zona** (*patch-clamp recording*), desarrollada en las décadas de 1970 y 1980, revolucionó el estudio de los canales iónicos al permitir examinar el transporte a través de una única molécula del canal en la pequeña zona de la membrana que queda cubierta por la punta de una micropipeta (**Figura 11-33**). Con esta técnica, sencilla pero muy potente, se pueden estudiar con detalle las propiedades de los canales iónicos en todos los tipos celulares. Este trabajo ha llevado al descubrimiento de que incluso las células que no son excitables eléctricamente suelen tener una gran variedad de canales iónicos en su membrana plasmática. Muchas de estas células, como las levaduras, son demasiado pequeñas para ser investigadas mediante el método tradicional en electrofisiología de introducir un microelectrodo intracelular.

El registro de zona indica que cada uno de los canales de Na^+ regulados por voltaje se abre siguiendo la ley del todo o nada. Un canal se abre y se cierra aleatoriamente, pero cuando se abre siempre tiene la misma conductancia y permite el paso de más de 1000 iones por milisegundo. Así pues, la corriente agregada que cruza la membrana de una célula no indica el *grado* de apertura de los canales sino el *número total* de canales de la membrana que están abiertos en un momento dado (**Figura 11-34**).

Algunos principios físicos elementales permiten entender el fenómeno de regulación regulada por voltaje. El interior de una neurona o de una fibra muscular en reposo tiene un potencial eléctrico unos 50-100 mV más negativo que el medio externo. Aunque esta diferencia de potencial parece pequeña, se da a través de una membrana plasmática de tan sólo 5 nm de grosor, por lo que el gradiente de voltaje resultante es de unos 100.000 V/cm. Por lo tanto, las proteínas de membrana están sometidas a un campo eléctrico muy grande que puede afectar profundamente a su conformación. Estas proteínas, como muchas otras, tie-

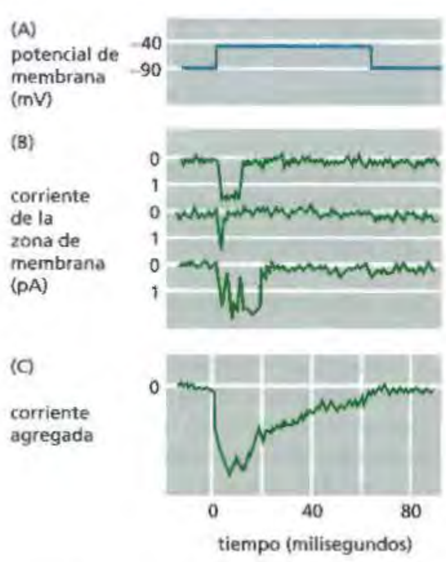


Figura 11-34 Registros de corriente a través de un solo canal de Na^+ regulado por voltaje. Se utiliza una diminuta zona de membrana plasmática separada de una célula muscular de embrión de rata (véase Figura 11-33). (A) La membrana se despolariza por un abrupto incremento de potencial. (B) Los tres registros de corriente que se presentan proceden de tres experimentos realizados sobre la misma zona de membrana. Cada una de las variaciones mayores de corriente en (B) corresponde a la apertura y al cierre de un solo canal. El estudio comparativo de los tres registros muestra que, a pesar de que los tiempos de apertura y cierre del canal varían considerablemente, la velocidad a la que la corriente fluye a través del canal abierto es casi constante. Las fluctuaciones menores del registro de corriente proceden principalmente de ruido eléctrico de fondo del aparato de medida. La corriente está medida en picoamperios (pA). Por convención, el potencial eléctrico en el exterior de la célula se define como cero. En (C) se muestra la suma de corrientes medidas en 144 repeticiones del mismo experimento. Esta corriente agregada es equivalente a la corriente de Na^+ habitual que se podría observar a través de una zona de membrana que contuviera 144 canales. Comparando (B) y (C), se puede observar que la variación temporal de voltaje de la corriente agregada refleja la probabilidad de que cualquier canal individual se encuentre en el estado abierto; esta probabilidad disminuye con el tiempo a medida que los canales de la membrana despolarizada adoptan su conformación inactivada. (Datos de J. Patlak y R. Horn, *J. Gen. Physiol.* 79:333-351, 1982. Con la autorización de The Rockefeller University Press.)

nen muchos grupos cargados y diversas uniones polarizadas entre sus átomos. Por consiguiente, el campo eléctrico genera fuerzas sobre su estructura molecular. Para muchas proteínas de membrana, los efectos de los cambios en el campo eléctrico de la membrana probablemente son insignificantes, pero los canales iónicos regulados por voltaje pueden adoptar varias conformaciones alternativas, cuyas estabilidades dependen de la fuerza del campo. Por ejemplo, los canales de Na^+, K^+ y Ca^{2+} regulados por voltaje tienen unos determinados aminoácidos cargados positivamente en uno de sus segmentos transmembrana que responden a la despolarización exponiéndose más hacia el exterior, lo que conlleva una serie de cambios conformacionales que abren el canal. Cada conformación puede saltar de una conformación a otra si sufre una sacudida lo bastante importante debida a los movimientos térmicos aleatorios del entorno, alterándose la estabilidad relativa de las conformaciones cerrada, abierta e inactivada (véase la Figura 11–31).

Los canales catiónicos regulados por voltaje están relacionados evolutiva y estructuralmente

Los canales de Na^+ no son el único tipo de canales catiónicos regulados por voltaje que pueden generar un potencial de acción. Por ejemplo, los potenciales de acción de algunos músculos, los oocitos y células endocrinas no dependen de canales de Na^+ sino de *canales de Ca^{2+} regulados por voltaje*.

En cada una de estas tres clases de canales catiónicos regulados por voltaje existe una sorprendente diversidad estructural y funcional, generada tanto por múltiples genes como por la maduración alternativa de los transcritos de RNA producidos a partir de un mismo gen. Sin embargo, las secuencias de todos los canales conocidos de Na^+, K^+ y Ca^{2+} regulados por voltaje muestran elevados grados de similitud, lo que demuestra que todos ellos pertenecen a una gran superfamilia de proteínas evolutiva y estructuralmente relacionadas y que comparten muchos de los principales motivos de diseño. La levadura unicelular *S. cerevisiae* contiene un solo gen que codifica un canal de K^+ regulado por voltaje, pero el genoma del gusano *C. elegans* tiene 68 genes que codifican canales de K^+ diferentes pero relacionados entre sí. Esta complejidad indica que incluso un sistema nervioso sencillo de tan sólo 302 neuronas utiliza un gran número de canales iónicos diferentes para integrar sus respuestas.

Los seres humanos que heredan mutaciones en los genes que codifican canales iónicos pueden sufrir una gran variedad de enfermedades nerviosas, musculares, cerebrales o cardíacas, dependiendo del tipo de células en las que actúe el canal codificado por el gen mutado. Por ejemplo, las mutaciones en los genes que codifican canales de Na^+ regulados por voltaje en las fibras musculares pueden causar *miotonía*, una condición en la que la relajación muscular tras una contracción voluntaria está retardada, lo que produce dolorosos espasmos musculares. En algunos casos, esto se debe a que los canales anómalos no se inactivan normalmente; como resultado de ello, una vez acabado el potencial de acción la entrada de Na^+ persiste y vuelve a reiniciar de forma repetida la despolarización de la membrana y la contracción muscular. De manera semejante, las mutaciones que afectan a los canales de Na^+ o K^+ del cerebro pueden causar *epilepsia*, enfermedad en la que la activación sincronizada excesiva de grandes grupos de neuronas causa las convulsiones epilépticas.

En las sinapsis químicas, los canales iónicos regulados por transmisores convierten las señales químicas en señales eléctricas

Las señales neuronales se transmiten de célula a célula en unos lugares de contacto especializados, conocidos como **sinapsis**. El mecanismo normal de transmisión es indirecto. Las células están eléctricamente aisladas unas de otras, ya que la *célula presináptica* se encuentra separada de la *célula postsináptica* mediante una estrecha *hendidura sináptica*. Un cambio en el potencial eléctrico de la célula presináptica desencadena la liberación de unas pequeñas moléculas señal, conocidas como **neurotransmisores**, que se hallan almacenadas en unas vesículas sinápticas próximas a la membrana y que pueden ser liberadas por exocitosis. El neurotransmisor difunde con rápidez a través de la hendidura sináptica y provoca un cambio eléctrico en la célula postsináptica mediante su unión a *canales iónicos*

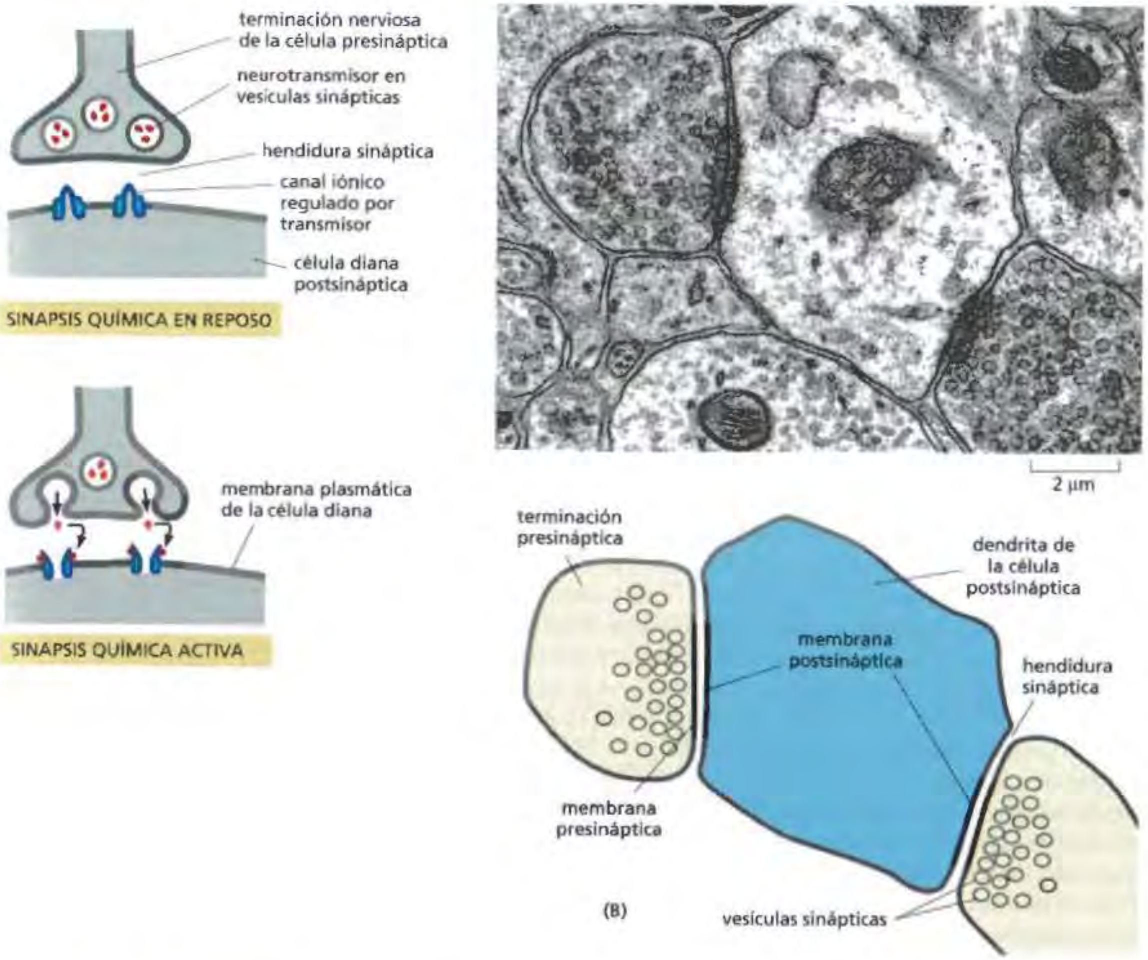


Figura 11–35 Una sinapsis química. <CTGA> (A) Cuando un potencial de acción alcanza la terminación nerviosa de una célula presináptica, estimula a esta terminación a que libere su neurotransmisor. Las moléculas del neurotransmisor están almacenadas en vesículas sinápticas y se liberan al exterior de la célula cuando estas vesículas se fusionan con la membrana plasmática de la terminación nerviosa. El neurotransmisor liberado se une a los canales iónicos regulados por el transmisor de la membrana de la célula diana postsináptica y los abre. El flujo de iones resultante altera el potencial de membrana de la célula diana y transmite de esta manera la señal desde el nervio excitado. (B) Electromicrografía de una sección ultrafina de dos terminaciones sinápticas en una dendrita de una célula postsináptica. (B, cortesía de Cedric Raine.)

regulados por transmisores (**Figura 11–35**) y determina su apertura. Una vez secretado el neurotransmisor, es rápidamente eliminado por degradación mediante enzimas específicas situadas en la hendidura sináptica, por la captura gracias a la terminación nerviosa que lo ha liberado o por las células gliales vecinas. La recaptación está mediada por diferentes transportadores de neurotransmisores dependientes de Na^+; de esta forma, los neurotransmisores son reciclados, permitiendo que las células puedan mantener una elevada tasa de liberación. Su rápida eliminación asegura la precisión espacial y temporal de la señal en la sinapsis. Disminuyen las posibilidades de que la influencia del neurotransmisor alcance a células vecinas y despeja la hendidura sináptica antes de que se produzca el próximo pulso de neurotransmisor, de forma que las señales rápidas y repetidas puedan ser comunicadas de forma adecuada a la célula postsináptica. Como veremos, la señalización mediante estas *sinapsis químicas* es mucho más versátil y adaptable que el acoplamiento eléctrico directo mediante uniones estrechas en las *sinapsis eléctricas* (descritas en el Capítulo 19), que también son utilizadas por las neuronas, aunque con menos frecuencia.

Los **canales iónicos regulados por transmisores** están especializados en transformar rápidamente las señales químicas extracelulares en señales eléctricas en las sinapsis químicas. Estos canales están concentrados en la membrana plasmática de la célula postsináptica en la región de la sinapsis y se abren de forma transitoria en respuesta a la unión de las moléculas de neurotransmisor, generando así un breve cambio en la permeabilidad de la membrana (Figura 11–35A). Al contrario de lo que ocurría con los canales regulados por voltaje responsables de los potenciales de acción, los canales regulados por transmisores son relativamente insensibles al potencial de membrana y, por tanto, no pueden provocar por sí mismos una autoamplificación de la señal. En lugar de ello, generan cambios en la permeabilidad local y, por tanto, cambios en el potencial de membrana; la magnitud de estos cambios dependerá de la cantidad de neurotransmisor liberado a la sinapsis y del tiempo que permanece allí. Sólo se originará un potencial de acción si el potencial de membrana local se despolariza lo suficiente como para poder abrir los canales catiónicos regulados por voltaje presentes en la misma membrana de la célula diana.

Las sinapsis químicas pueden ser excitadoras o inhibidoras

Los canales iónicos regulados por transmisores se diferencian entre sí en varios aspectos importantes. Primero, al ser receptores, presentan un centro de unión altamente selectivo para el neurotransmisor que se libera en la terminación nerviosa presináptica. Segundo, al ser canales, son selectivos respecto del tipo de iones que dejan pasar a través de la membrana plasmática; esta propiedad determina la naturaleza de la respuesta postsináptica. Los **neurotransmisores excitadores** abren canales catiónicos, causando una entrada de Na^+ que despolariza la membrana postsináptica hacia el potencial umbral que dispara el potencial de acción. Los **neurotransmisores inhibidores**, por el contrario, abren canales de Cl^- o de K^+, lo que elimina la posibilidad de un potencial de acción, ya que hace más difícil que las señales excitadoras despolaricen la membrana postsináptica. Muchos neurotransmisores pueden ser tanto excitadores como inhibidores, dependiendo de dónde hayan sido liberados, a qué receptores se unan y qué condiciones iónicas se encuentren. Por ejemplo, la *acetilcolina* puede tanto excitar como inhibir, según a qué receptores se una. Pero la acetilcolina, el *glutamato* y la *serotonina* generalmente actúan como neurotransmisores excitadores, mientras que el *ácido γ-aminobutírico* (*GABA*: ***gamma amino**-butyric **acid***) y la *glicina* actúan como inhibidores. El glutamato, por ejemplo, es el responsable de la mayoría de la señalización excitadora en el cerebro de los vertebrados.

Antes se explicó de qué manera la apertura de los canales catiónicos puede despolarizar una membrana. Es posible entender el efecto de la apertura de los canales de Cl^- de la siguiente manera. La concentración de Cl^- es mucho mayor fuera de la célula que dentro (véase Tabla 11-1, p. 652), pero su entrada está inhibida por el potencial de membrana que se opone a su flujo. De hecho, en muchas neuronas el potencial de equilibrio del Cl^- está muy próximo al potencial de reposo o es incluso más negativo. Por ello, la apertura de los canales de Cl^- tiende a tamponar el potencial de membrana; a medida que la membrana empieza a despolarizarse, entran en la célula más iones negativos Cl^- que contrarrestan la despolarización. Así, la apertura de los canales de Cl^- dificulta la despolarización de la membrana y, por tanto, la excitación de la célula. La apertura de los canales de K^+ tiene un efecto similar. El efecto de toxinas que bloquean su acción demuestra la importancia de los neurotransmisores inhibidores: la estricnina, por ejemplo, se une a los receptores de la glicina bloqueando su acción inhibidora y provoca espasmos musculares, convulsiones y la muerte.

Sin embargo, no todas las señales químicas del sistema nervioso actúan mediante canales iónicos regulados por ligando. Muchas de las moléculas señal que son secretadas por las terminaciones nerviosas, incluyendo una gran diversidad de neuropéptidos, se unen a receptores que sólo regulan indirectamente la actividad de los canales iónicos. Estos *receptores acoplados a proteínas G* y *receptores acoplados a enzimas* se describen en el Capítulo 15. Mientras que la señalización mediada por los neurotransmisores excitadores e inhibidores que se unen a canales iónicos es inmediata, simple y breve, la señalización mediante receptores acoplados a proteínas G y a enzimas es más lenta, compleja y duradera.

Los receptores de acetilcolina de las uniones neuromusculares son canales catiónicos regulados por transmisores

El ejemplo mejor estudiado de un canal iónico regulado por transmisores es el *receptor de acetilcolina* de las fibras musculares esqueléticas. Este canal se abre de forma transitoria por la acetilcolina liberada por la terminación nerviosa de la **unión neuromuscular** –la sinapsis química especializada entre una neurona motora y una fibra muscular esquelética (**Figura 11-36**). Esta sinapsis se ha investigado ampliamente, ya que es fácilmente accesible para los estudios electrofisiológicos.



Figura 11-36 Electromicrografía de barrido a bajo aumento de una sinapsis neuromuscular de rana. Se muestra la terminación de un solo axón sobre una fibra muscular esquelética. (De J. Desaki y Y. Uehara, *J. Neurocytol.* 10:101-110, 1981. Con la autorización de Kluwer Academic Publishers.)

El **receptor de acetilcolina** ocupa un lugar especial en la historia de los canales iónicos. Fue el primer canal iónico purificado, el primero cuya secuencia de aminoácidos fue determinada y que pudo ser reconstituido funcionalmente en bicapas lipídicas sintéticas y el primero para el que se registró la señal eléctrica de la apertura de una sola molécula de canal. Su gen también fue gen de un canal iónico clonado y secuenciado y su estructura tridimensional ha sido determinada, aunque a una resolución moderada. Existen al menos dos razones que explican el rápido progreso en la purificación y caracterización de este receptor. Primero, se encontró una fuente muy rica de receptores de acetilcolina en los órganos eléctricos de los peces eléctricos y las rayas (estos órganos son músculos modificados que proporcionan a la presa una gran descarga eléctrica). Segundo, algunas neurotoxinas (como la *α-bungarotoxi-*

del veneno de ciertas serpientes se unen con una gran afinidad ($K_a = 10^9$ litros/mol) y especificidad al receptor por lo que pueden ser utilizadas para su purificación por cromatografía de afinidad. También se puede usar *α-bungarotoxina* fluorescente o marcada radiactivamente para localizar y cuantificar los receptores de acetilcolina. De esta forma los investigadores han comprobado que los receptores están densamente empaquetados en la membrana plasmática de la fibra muscular en la unión neuromuscular (unos 20.000 receptores por μm^2) y que existen muy pocos receptores en el resto de la membrana.

El receptor de acetilcolina del músculo esquelético está formado por cinco polipéptidos transmembrana, dos de un tipo y tres más diferentes entre sí, codificados por cuatro genes independientes. Los cuatro genes tienen una secuencia extraordinariamente similar entre sí, lo que implica que evolucionaron a partir de un único gen ancestral. Cada uno de los dos polipéptidos idénticos del pentámero contribuyen a uno o dos centros de unión para la acetilcolina que están colocados entre subunidades adyacentes. Cuando se unen dos moléculas de acetilcolina al complejo pentamérico, inducen un cambio de conformación: las hélices que tapizan el poro giran sobre su eje y desorganizan un anillo de aminoácidos hidrofóbicos que bloquea el flujo de iones en el estado cerrado. Con el ligando todavía unido, el canal alterna los estados abierto y cerrado, pero ahora tiene una probabilidad del 90% de estar abierto. Este estado continúa así hasta que la hidrólisis por una enzima específica (la *acetilcolina esterasa*), localizada en la unión neuromuscular, haga disminuir de forma suficiente la concentración de acetilcolina. Una vez liberado del neurotransmisor unido, el receptor de acetilcolina vuelve a su estado de reposo inicial. Si la presencia de acetilcolina se prolonga mucho tiempo como resultado de una excesiva estimulación nerviosa, el canal se inactiva (**Figura 11–37**).

Por microscopía electrónica se ha determinado la forma global del receptor de acetilcolina y el probable reordenamiento de sus subunidades (**Figura 11–38**). Las cinco subunidades se disponen en anillo y forman un canal transmembrana con un interior acuoso consistente en un estrecho poro que atraviesa la bicapa lipídica y se ensancha en cada extremo formando unos vestíbulos. Unos grupos de aminoácidos cargados negativamente y dispuestos en cada extremo del poro ayudan a excluir los iones negativos y favorecen el paso de iones positivos con un diámetro inferior a 0,65 nm. El tráfico normal consiste mayoritariamente en Na^+ y K^+, junto con algunos iones Ca^{2+}. Así, al contrario de lo que pasaba con los canales catiónicos regulados por voltaje como el canal de K^+ que hemos descrito, este receptor tiene poca especificidad de cationes, de forma que las contribuciones relativas de los diferentes cationes a la corriente global a través del canal dependen sobre todo de sus concentraciones y de las fuerzas electroquímicas impulsoras. Cuando la membrana de la fibra muscular se encuentra en su potencial de reposo, la fuerza impulsora neta para el K^+ es casi nula, ya que el gradiente de voltaje casi contrarresta el gradiente de concentración de K^+ a través de la membrana (véase Panel 11–2, p. 670). Para el Na^+, en cambio, el gradiente de voltaje y el de concentración actúan ambos en la misma dirección impulsando el ion hacia el interior de la célula. (Lo mismo es válido para el Ca^{2+}, pero la concentración extracelular de Ca^{2+} es tan inferior a la de Na^+ que el Ca^{2+} contribuye muy poco a la corriente total de entrada.) Así pues, la apertura de los canales del receptor de acetilcolina provoca una gran entrada neta de Na^+ (a una velocidad punta de 30.000 iones por canal en cada milisegundo). Esta entrada provoca una despolarización de la membrana que lleva a la contracción muscular, como se describe más adelante.

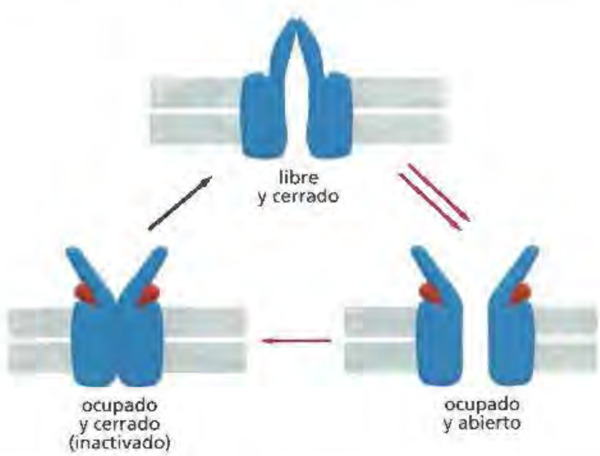


Figura 11–37 Las tres conformaciones del receptor de acetilcolina. Este canal regulado por transmisor se abre por la unión de dos moléculas de acetilcolina. Hasta que la acetilcolina sea hidrolizada, el canal tiene una alta probabilidad de permanecer abierto. Si la presencia de acetilcolina se mantiene, el canal se inactiva (se desensibiliza). Por lo general, la acetilcolina se hidroliza con rapidez y el canal se cierra en aproximadamente 1 milisegundo, antes de que ocurra una desensibilización importante. La desensibilización tiene lugar después de unos 20 milisegundos de presencia continuada de la acetilcolina.

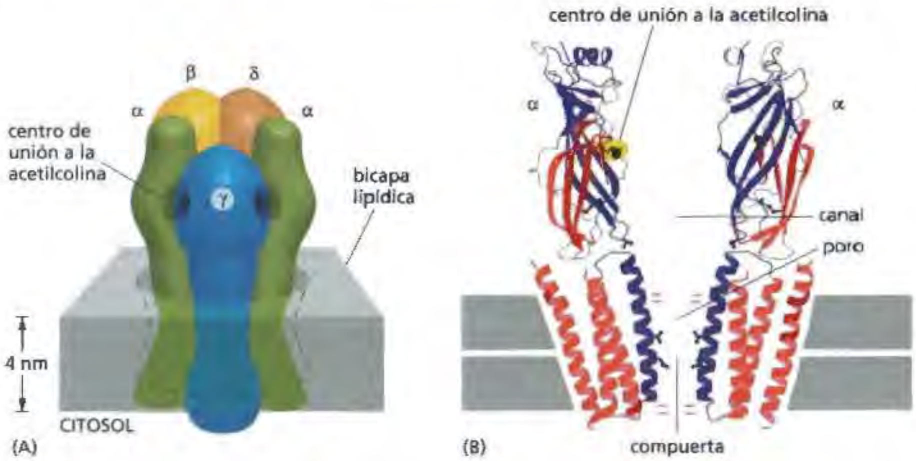


Figura 11–38 Modelo de la estructura del receptor de acetilcolina. (A) Cinco subunidades homólogas (α, α, β, γ, δ) se combinan entre sí formando el poro transmembrana acuoso. El poro está constituido por un anillo de cinco hélices α transmembrana, cada una de una subunidad diferente. Parece que en su conformación cerrada el poro está ocluido por las cadenas laterales hidrófobas de cinco leucinas, una de cada hélice α, que forman una compuerta cerca del centro de la bicapa lipídica. Las cadenas laterales cargadas negativamente que hay a cada extremo del poro aseguran que sólo atraviesen el canal iones cargados positivamente. (B) Ambas subunidades α aportan un centro de unión a la acetilcolina alojado entre las subunidades adyacentes; cuando hay acetilcolina unida a ambos centros, el canal sufre un cambio de tipo conformacional que abre la compuerta, posiblemente por rotación de las hélices que hace que las leucinas que contienen y estaban ocultas, se desplacen hacia atrás. En el dibujo de la estructura (*derecha*), las partes del canal que se desplazan en respuesta a la unión de AChR abriendo el poro están coloreadas en *azul*. (Adaptado de N. Unwin, *Cell* 72[Suppl.]:31-41, 1993. Con la autorización de Elsevier.)

Los canales iónicos regulados por transmisores son las dianas principales de los fármacos psicoactivos

Los canales iónicos que se abren de forma directa en respuesta a los neurotransmisores acetilcolina, serotonina, GABA y glicina contienen subunidades estructuralmente similares entre ellas y es probable que formen los poros transmembrana de forma parecida, aunque sean distintas sus especificidades de unión a los neurotransmisores y su selectividad iónica. Parece que todos esos canales están formados por subunidades polipeptídicas idénticas, que probablemente se ensamblan formando un pentámero similar al receptor de la acetilcolina. Los canales iónicos regulados por glutamato están constituidos por una familia distinta de subunidades y se supone que actúan como tetrámeros, como los canales de K^+.

Para cada clase de canal iónico regulado por transmisores existen formas alternativas de cada tipo de subunidad, codificadas por distintos genes o generadas por maduración (ayuste) alternativa del mismo producto génico. Estas variantes se ensamblan en diferentes combinaciones generando una serie muy diversa de subtipos distintos de canales, con diferentes afinidades por sus ligandos, diferentes conductancias, velocidades de apertura y cierre y sensibilidades a fármacos y toxinas. Por ejemplo, las neuronas de los vertebrados tienen canales iónicos regulados por acetilcolina que difieren de los de las fibras musculares en que están formados por dos subunidades de un tipo y tres de otro; pero hay al menos nueve genes que codifican las versiones del primer tipo de subunidad y al menos tres genes que codifican las diferentes versiones del segundo, aumentando la diversidad gracias a la maduración alternativa de sus RNA. En el cerebro, los diferentes grupos de neuronas sensibles a la acetilcolina tienen funciones diversas y expresan diferentes combinaciones de estas subunidades. Este fenómeno en teoría, y en cierta medida ya en la práctica, hace posible diseñar fármacos dirigidos contra grupos de neuronas o sinapsis muy bien definidos que influyan así de forma específica sobre funciones particulares del cerebro.

De hecho, los canales iónicos regulados por transmisores han sido dianas de algunos fármacos desde hace mucho tiempo. Por ejemplo, en cirugía se pueden relajar los músculos durante una operación mediante el bloqueo de los receptores de acetilcolina de las fibras musculares esqueléticas con *curare*, un compuesto vegetal que utilizaban los indígenas sudamericanos para envenenar sus flechas. Muchos de los fármacos utilizados para tratar el insomnio, la ansiedad, la depresión y la esquizofrenia ejercen sus efectos sobre las sinapsis químicas y actúan mediante su unión a los canales regulados por transmisores. Por ejemplo, los barbitúricos y los tranquilizantes, como el Valium o el Librium, se unen a los receptores de GABA, potenciando la acción inhibidora del GABA, al permitir que los canales de Cl^- se abran en respuesta a concentraciones más bajas de este neurotransmisor. Los avances en la biología molecular de los canales iónicos, al revelar tanto su diversidad como los detalles de su estructura, alimentan la esperanza de diseñar una nueva generación de fármacos psicoactivos para aliviar los efectos de las enfermedades mentales.

Además de los canales iónicos, muchos otros componentes de la maquinaria señalizadora de la sinapsis también pueden ser dianas para fármacos psicoactivos. Como ya hemos mencionado, tras su liberación en la hendidura sináptica muchos neurotransmisores deben ser eliminados por mecanismos de recaptación mediados por transportadores dependientes de Na^+. La inhibición de estos transportadores prolonga el efecto del neurotransmisor y,

por tanto, potencia la transmisión sináptica. Muchos fármacos antidepresivos, como por ejemplo el Prozac, inhiben la recaptación de serotonina; otros inhiben tanto la recaptación de serotonina como de noradrenalina.

Los canales iónicos son los componentes moleculares básicos de los mecanismos neuronales de señalización y computación. Estos mecanismos son muy sofisticados. A continuación damos varios ejemplos que demuestran cómo pueden actuar juntos algunos grupos de canales iónicos en la comunicación sináptica entre células excitables eléctricamente.

La transmisión neuromuscular implica la activación secuencial de cinco grupos diferentes de canales iónicos

La importancia de los canales iónicos en las células excitables eléctricamente se puede ilustrar mediante el seguimiento del proceso a través del cual un impulso nervioso estimula la contracción de una fibra muscular. Esta respuesta, aparentemente sencilla, requiere la activación secuencial de como mínimo cinco grupos diferentes de canales iónicos, en el intervalo de unos cuantos milisegundos (**Figura 11–39**).

1. Este proceso se inicia cuando un impulso nervioso alcanza la terminación nerviosa y despolariza la membrana plasmática de la terminación. La despolarización abre de forma transitoria los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje de esta membrana. Dado que la concentración de Ca^{2+} fuera de la célula es 1000 veces superior a la concentración de Ca^{2+} libre en el interior, el Ca^{2+} entra en la terminación nerviosa. El aumento en la concentración de Ca^{2+} del citosol de la terminación nerviosa dispara la liberación local de acetilcolina a la hendidura sináptica.
2. La acetilcolina liberada se une a los receptores de acetilcolina de la membrana plasmática de la fibra muscular y abre transitoriamente los canales iónicos asociados a ellos. Por ello la entrada de Na^+ causa una despolarización local de la membrana.
3. La despolarización local de la membrana plasmática de la fibra muscular abre los canales de Na^+ regulados por voltaje de la membrana, permitiendo la entrada de más Na^+ y aumentando la despolarización de la membrana. Esto provoca la apertura de los canales de Na^+ regulados por voltaje vecinos y genera una despolarización autopropagadora (un potencial de acción) que se extiende hasta afectar a toda la membrana plasmática (véase la Figura 11–30).
4. La despolarización generalizada de la membrana plasmática de la fibra muscular activa los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje de algunas regiones especializadas de la membrana (los túbulos transversos [T]; descritos en el Capítulo 16).
5. Esto, a su vez, hace que los *canales de liberación de* Ca^{2+} regulados por Ca^{2+} presentes en una región adyacente de la membrana del retículo sarcoplasmático (SR) se abran transitoriamente y liberen al citosol el Ca^{2+} almacenado en el SR. Las membranas del túbulo T están muy próximas entre sí y los dos tipos de canales se disponen juntos en una estructura (véase la Figura 16–77). El incremento brusco de la concentración de Ca^{2+} en el citosol hace que las miofibrillas de las fibras musculares se contraigan.



Figura 11–39 El sistema de canales iónicos de la unión neuromuscular. Estos canales iónicos son esenciales para la estimulación de la contracción muscular por un impulso nervioso. Los diferentes canales están numerados según la secuencia en la que son activados, como se describe en el texto.

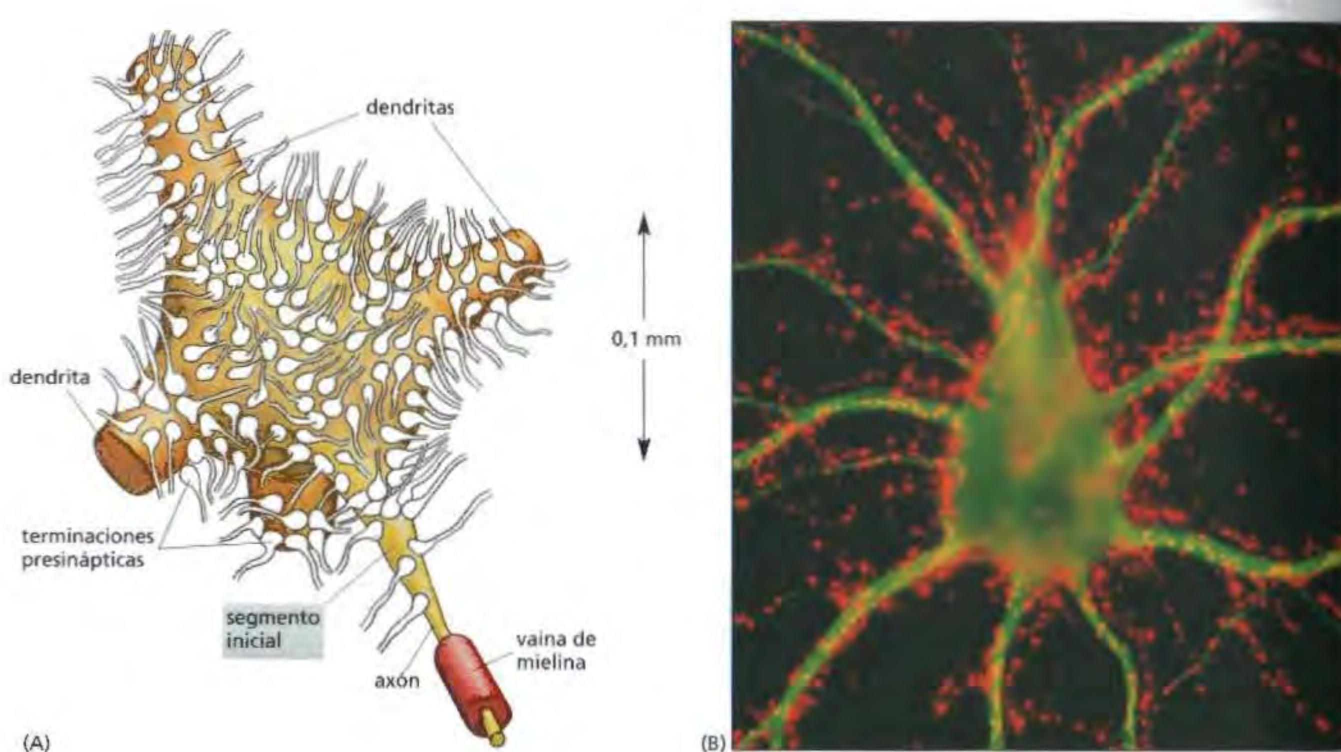
Aunque la activación de la contracción muscular por una neurona motora es compleja, todavía se requiere un mecanismo de canales iónicos más sofisticado para que una neurona integre el gran número de señales de entrada que recibe en sus sinapsis y responda de forma apropiada, como se explica a continuación.

Cada neurona es un complejo sistema de integración

En el sistema nervioso central, una sola neurona puede recibir señales de miles de otras neuronas y a su vez puede establecer sinapsis con muchos miles de células. Por ejemplo, una neurona motora de la médula espinal puede recibir sinapsis de varios miles de terminaciones nerviosas; tanto su soma celular como sus dendritas están prácticamente cubiertos de ellas (**Figura 11–40**). Algunas de estas sinapsis transmiten señales desde el cerebro o la médula espinal; otras aportan información sensorial desde los músculos o la piel. Cada neurona motora debe combinar la información recibida de todas estas fuentes y reaccionar provocando un potencial de acción a lo largo de su axón o permanecer en reposo.

De entre la gran cantidad de sinapsis de una neurona, algunas de ellas tienden a excitarla y otras a inhibirla. Los neurotransmisores liberados en una sinapsis excitadora provocan una pequeña despolarización en la membrana postsináptica llamada *potencial postsináptico (PSP) excitador*, mientras que los neurotransmisores liberados en una sinapsis inhibidora causan una pequeña hiperpolarización conocida como *PSP inhibidor*. La membrana de las dendritas y del soma celular de la mayoría de las neuronas contiene una densidad baja de canales de Na^+ regulados por voltaje, de forma que un solo PSP excitador suele ser débil para desencadenar el potencial de acción. En lugar de eso, cada señal que llega se refleja en un PSP local de determinada intensidad, que va disminuyendo con la distancia desde el punto de la sinapsis. Si llegan de forma simultánea diversas señales a varias sinapsis de la misma región del árbol dendrítico, el PSP total local será la suma de los PSP individuales, mientras que la contribución de los PSP inhibidores al total sería negativa. Los PSP de cada región se extienden pasivamente y convergen en el soma celular. En las transmisiones a largas distancias, la magnitud combinada del PSP se traslada, o se *codifica*, en la *frecuencia* de disparo de los potenciales de acción (**Figura 11–41**). Esta codificación se consigue mediante un grupo especial de canales iónicos presentes en una elevada densidad en la base del axón, adyacentes al soma celular, en una región conocida como *segmento inicial* o *colina axónica* (véase la Figura 11–40).

Figura 11–40 Soma de una neurona motor de la médula espinal. (A) Sobre el soma celular y las dendritas existen muchos miles de sinapsis formadas por terminaciones nerviosas. Estas sinapsis suministran señales de otras zonas del organismo controlando el desencadenamiento de potenciales de acción a lo largo del axón de esta gran célula. (B) Micrografía de un soma celular y de sus dendritas, marcados con un anticuerpo fluorescente que reconoce una proteína de citoesqueleto (*verde*). Miles de terminaciones axónicas (*rojo*) de otras células nerviosas (no visibles) establecen sinapsis en el soma y las dendritas; estas sinapsis están marcadas con un anticuerpo que reconoce las vesículas sinápticas. (B, cortesía de Olaf Mundigl y Pietro de Camilli.)



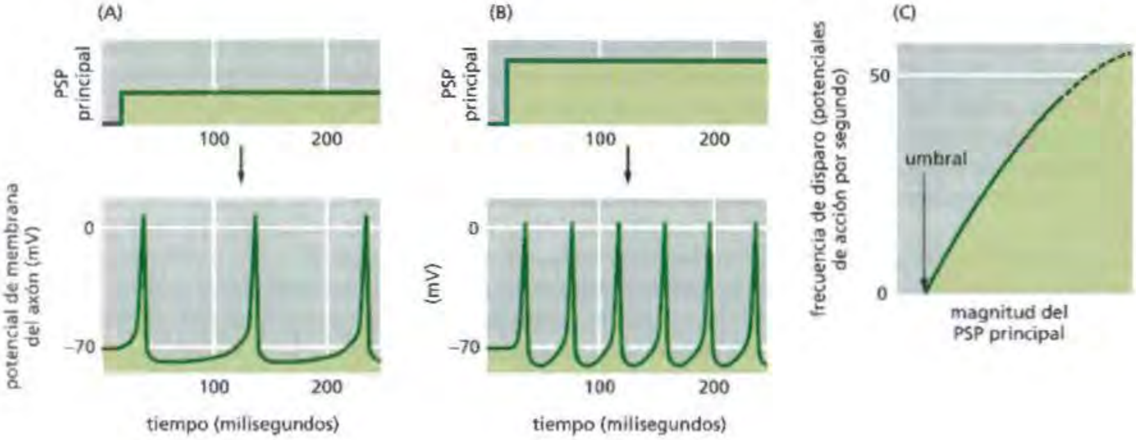


Figura 11–41 La magnitud del potencial sináptico principal (PSP) se refleja en la frecuencia de los disparos de los potenciales de acción. Cuando llegan sucesivos potenciales de acción a una misma sinapsis, cada PSP originado se suma a la cola del precedente provocando un PSP principal mayor. La comparación de (A) y (B) muestra cómo aumenta la frecuencia de disparo de un axón con el aumento del PSP principal. (C) Resume la relación general.

La integración neuronal requiere la combinación de por lo menos tres clases de canales de K^+

La intensidad de la estimulación que recibe una neurona está codificada, en el caso de la transmisión a larga distancia, por la frecuencia de los potenciales de acción que la neurona dispara: cuanto más fuerte es la estimulación, mayor es la frecuencia de los potenciales de acción. Los potenciales de acción se inician en el **segmento inicial**, una región única de cada neurona donde existe una gran cantidad de canales de Na^+ regulados por voltaje. Pero para poder realizar esta especial función de codificación, la membrana del segmento inicial también contiene, al menos, otras cuatro clases de canales iónicos: tres selectivos para el K^+ y uno selectivo para el Ca^{2+}. Las tres variedades de canales de K^+ tienen propiedades diferentes; nos referiremos a ellos como los *canales de K^+ retardado, temprano* y *activado por Ca^{2+}*.

Para entender la función que desempeñan tantos tipos de canales, es necesario considerar primero qué ocurriría si los únicos canales iónicos regulados por voltaje presentes en la célula nerviosa fueran los canales de Na^+. Por debajo de un cierto nivel umbral de estimulación sináptica, la despolarización de la membrana del segmento inicial sería insuficiente para provocar un potencial de acción. A medida que la estimulación fuera incrementándose gradualmente, se cruzaría el valor umbral, se abrirían los canales de Na^+ y se produciría el potencial de acción. El potencial de acción acabaría de la forma habitual por la inactivación de los canales de Na^+. Antes de poder provocar un nuevo potencial de acción, estos canales se tendrían que recuperar de su inactivación. Pero esto requeriría el retorno a un valor de potencial de membrana muy negativo, lo que no se podría dar mientras se mantuviera el fuerte estímulo despolarizador (causado por los PSP). Por consiguiente, se necesita un tipo de canal adicional para repolarizar la membrana después de cada potencial de acción y preparar a la célula para volver a disparar otro potencial de acción.

Esta función la realizan los **canales retardados de K^+** que se describieron anteriormente en relación a la propagación del potencial de acción (véase p. 677). Están regulados por voltaje pero, a causa de su lenta cinética, sólo se abren durante la fase de caída del potencial de acción, cuando los canales de Na^+ son inactivos. Su apertura permite una salida de K^+ que devuelve la membrana a su potencial de equilibrio de K^+, que es tan negativo que los canales de Na^+ pueden recuperarse con rapidez de su estado inactivado. La repolarización de la membrana también cierra los canales retardados de K^+. Ahora el segmento inicial está de nuevo en condiciones para que los estímulos despolarizadores de las señales que lleguen a la célula provoquen un nuevo potencial de acción. De esta manera, la estimulación sostenida de las dendritas y del soma celular permiten que en el axón se disparen potenciales de acción de forma repetitiva.

Sin embargo, esta capacidad repetitiva de provocar potenciales de acción no es suficiente por sí sola. La frecuencia de los potenciales de acción debe reflejar la intensidad de la estimulación y un sistema sencillo de canales de Na^+ y canales retardados de K^+ es inadecuado para este propósito. Por debajo de un cierto nivel de estimulación estable, la célula no disparará ningún potencial de acción; por encima de ese valor umbral, empezará a dispararlos de repente a una frecuencia relativamente rápida. Los **canales tempranos de K^+** re-

suelven este problema. Se trata, también, de canales regulados por voltaje y se abren cuando la membrana se despolariza, pero su específica sensibilidad al voltaje y su cinética de inactivación les permiten actuar a unos valores de estimulación levemente superiores al valor umbral y, por tanto, reducir la frecuencia de disparo de los potenciales de acción. De esta forma, pueden eliminar la discontinuidad que se da en la relación entre la velocidad de disparo y la intensidad de la estimulación. El resultado es una velocidad de disparo proporcional a la fuerza del estímulo despolarizador a lo largo de un amplio rango de valores (véase la Figura 11–41C).

Además, el proceso de codificación suele estar modulado por otros dos tipos de canales iónicos del segmento inicial que hemos mencionado, denominados canales de Ca^{2+} regulados por voltaje y los canales de K^+ activados por Ca^{2+}. Estos canales actúan de forma coordinada disminuyendo la respuesta de una célula a una estimulación prolongada e invariable: este proceso se denomina **adaptación**. Estos canales de Ca^{2+} son similares a los canales de Ca^{2+} que median la liberación del neurotransmisor en las terminaciones axónicas presinápticas; se abren cuando se dispara un potencial de acción y permiten la entrada transitoria de Ca^{2+} en el segmento inicial.

El **canal de K^+ activado por Ca^{2+}** es estructural y funcionalmente diferente de cualquier otro tipo de canal que hayamos descrito. Se abre en respuesta a la elevación de la concentración de Ca^{2+} en la cara citoplasmática de la membrana de la célula nerviosa. Supongamos que aplicamos un fuerte y prolongado estímulo despolarizador, provocando una larga serie de potenciales de acción. Cada potencial de acción permite una breve entrada de Ca^{2+} mediante los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje, de modo que la concentración intracelular de Ca^{2+} aumenta de forma gradual hasta alcanzar un valor lo bastante alto como para abrir los canales de K^+ activados por Ca^{2+}. Como el aumento resultante en la permeabilidad de la membrana al K^+ hace que ésta sea más difícil de despolarizar, se aumenta el desfase entre un potencial de acción y el siguiente. De esta forma, una neurona que sea estimulada de forma continua durante un largo periodo de tiempo se va haciendo gradualmente menos sensible a este estímulo constante.

Esta adaptación, que también puede ocurrir mediante otros mecanismos, permite que una neurona –de hecho, todo el sistema nervioso– reaccione sensiblemente al *cambio*, incluso en un nivel basal elevado de estimulación continua. Es una de las estrategias que nos ayudan, por ejemplo, a notar un ligero toque en la espalda y seguir ignorando la presión constante de nuestra ropa. La adaptación como una característica general del proceso de señalización celular se explicará con más detalle en el Capítulo 15.

Otras neuronas llevan a cabo diversas integraciones, reaccionando a las señales que reciben en sus sinapsis de maneras muy diferentes, lo cual refleja las múltiples dotaciones de las diferentes familias de canales iónicos presentes en sus membranas. En el genoma humano existen varios centenares de genes que codifican canales iónicos y más de 150 que codifican canales regulados por voltaje. Tanto la maduración alternativa del RNA como el ensamblaje de canales a partir de diferentes combinaciones de subunidades diferentes introducen todavía mayor complejidad en el sistema de canales. Evidentemente la multiplicidad de canales iónicos permite disponer de una gran variedad de tipos de neuronas, cuyo comportamiento eléctrico está adaptado de forma específica a las funciones particulares que deben desarrollar.

Una de las propiedades más importantes del sistema nervioso es su capacidad de aprender y de recordar, la cual parece depender en gran medida de los cambios a largo plazo que tienen lugar en sinapsis específicas. Acabaremos este capítulo considerando un canal iónico que, según parece, desempeña un destacado papel en algunas de las formas de aprendizaje y memoria. Está localizado en muchas sinapsis del sistema nervioso central, donde está regulado tanto por voltaje como por el neurotransmisor excitador glutamato. También es la diana de la acción del fármaco psicoactivo fenciclidina o polvo de ángel.

La potenciación a largo plazo en el hipocampo de los mamíferos depende de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de los receptores de NMDA

Casi todos los animales pueden aprender, pero parece que los mamíferos aprenden particularmente bien (o al menos esto es lo que parece). En el cerebro de un mamífero la región llamada *hipocampo* tiene un papel especial en el aprendizaje. Cuando se destruye en los dos lados del cerebro, la capacidad para formar nuevos recuerdos se pierde casi del todo, aunque

los recuerdos adquiridos previamente se mantienen. En consonancia con esta función, algunas sinapsis del hipocampo presentan unas marcadas alteraciones funcionales tras su uso repetido: mientras que un potencial de acción ocasional no deja ninguna traza duradera en la célula presináptica, una corta serie de potenciales de acción repetitivos causa la llamada **potenciación a largo plazo (LTP**: ***long-term potentiation*)**, de modo que los potenciales de acción individuales posteriores enviados por la célula presináptica pueden provocar una respuesta altamente potenciada en la célula postsináptica. El efecto puede durar horas, días o semanas, según el número y la intensidad de las series de potenciales de acción. Sólo muestran LTP las sinapsis que han sido activadas; las sinapsis de la célula postsináptica que han permanecido en reposo no están afectadas. Sin embargo, si mientras la célula está recibiendo una serie de estimulación repetitiva en una de sus sinapsis llega un potencial de acción individual a *otra* de las sinapsis de su superficie, esta segunda sinapsis también sufrirá la LTP, aunque este potencial de acción por sí solo, en otro momento, no hubiera sido capaz de provocarla.

La regla que parece regir el fenómeno de la LTP en estas sinapsis es que la *LTP tendrá lugar en cualquier momento en que la célula presináptica dispare uno o más potenciales de acción mientras la membrana postsináptica esté fuertemente despolarizada* (ya sea por una serie repetitiva de potenciales de acción procedentes de la misma célula presináptica o por otra razón). Esta regla refleja el comportamiento de una clase particular de canales iónicos de la membrana postsináptica. El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central de los mamíferos y los canales iónicos regulados por el glutamato son los canales iónicos regulados por transmisores más abundantes del cerebro. En el hipocampo, como en el resto del cerebro, la mayoría de la corriente despolarizadora responsable de los PSP excitadores es debida a los canales iónicos regulados por glutamato, denominados **receptores AMPA**, que actúan según el mecanismo habitual. Pero esta corriente tiene un segundo componente mucho más fascinante, mediado por una subclase diferente de canales iónicos regulados por glutamato, conocido como los **receptores de NMDA**, llamados así porque pueden ser activados selectivamente por el análogo artificial del glutamato, el N-metil-D-aspartato. Los canales del receptor de NMDA están doblemente regulados, abriéndose sólo cuando se cumplen de forma simultánea dos condiciones: el glutamato debe estar unido al receptor y la membrana debe estar fuertemente despolarizada. La segunda condición es indispensable para liberar el Mg^{2+} que por lo general bloquea el canal en estado de reposo. Esto significa que normalmente los receptores de NMDA sólo se activan cuando los receptores AMPA también están activados y despolarizan la membrana. Los receptores de NMDA son críticos para la LTP. Cuando se bloquean selectivamente mediante un inhibidor específico o en animales transgénicos en los que el gen se ha inactivado, la LTP no tiene lugar, aunque la transmisión sináptica ordinaria continúa. Estos animales presentan deficiencias específicas en su capacidad de aprendizaje pero se comportan casi con normalidad en todo lo demás.

¿Cómo los receptores de NMDA pueden mediar un efecto tan notable? La respuesta es que estos canales, cuando se abren, son altamente permeables al Ca^{2+}, que actúa como un mediador intracelular en la célula postsináptica y provoca una cascada de cambios responsables, en último término, de la LTP. De esta manera, se puede bloquear la LTP cuando los niveles de Ca^{2+} se mantienen artificialmente bajos en la célula postsináptica mediante la inyección del quelante de Ca^{2+} EGTA, y se puede inducir una LTP elevando artificialmente los niveles de Ca^{2+} intracelulares. Uno de los cambios a largo plazo que incrementan la sensibilidad de la célula postsináptica al glutamato consiste en la inserción de nuevos receptores AMPA en la membrana plasmática (**Figura 11–42**). Existen evidencias de que los cambios también afectan a la célula presináptica, que libera más glutamato del normal cuando vuelve a ser activada.

Si las sinapsis sólo expresan LTP se saturarán con rapidez y, por tanto, constituirán un valor limitado como elementos de almacenamiento de información. De hecho, las sinapsis también presentan **depresiones a largo plazo (LTD**: ***long-term depression*)** que, sorprendentemente, también requieren la activación de receptores NMDA e incrementos de Ca^{2+}. ¿De qué forma el Ca^{2+} provoca efectos opuestos en una misma sinapsis? Este hecho indica que este control bidireccional de la fuerza sináptica depende de la magnitud del aumento de Ca^{2+}: niveles elevados de Ca^{2+} activan la proteína quinasa y LTP mientras que niveles moderados de Ca^{2+} activan la proteína fosfatasa y LTD.

También existen evidencias de que los receptores de NMDA desempeñan un papel importante en el aprendizaje y en otros fenómenos relacionados en otras áreas del cerebro, además del hipocampo. En el Capítulo 21 veremos que, según se desprende de algunos ex-

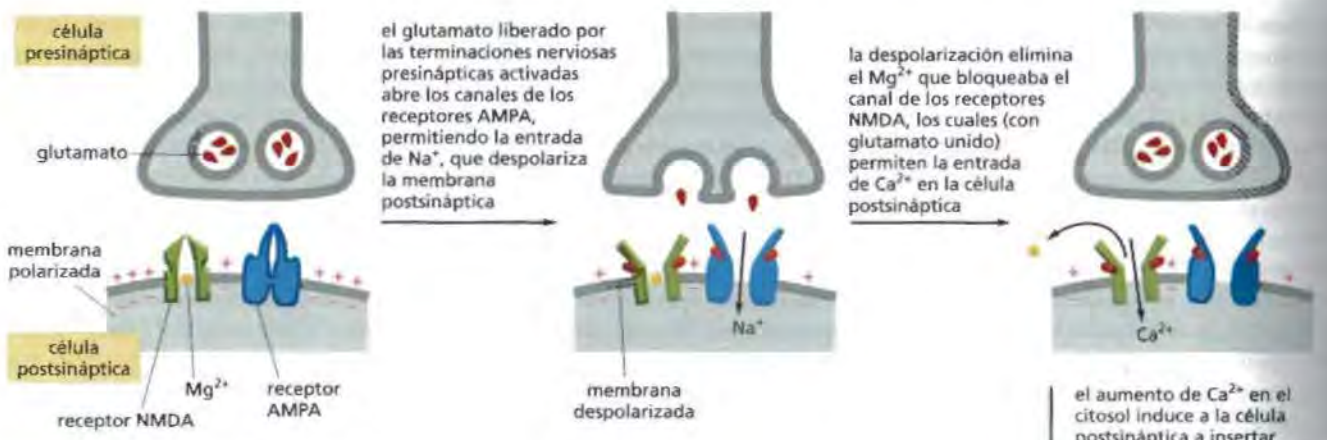




Figura 11–42 Cascada de señalización en la potenciación a largo plazo. Aunque no se muestran en la figura, existen evidencias que apuntan a que también se producen cambios en las terminaciones nerviosas presinápticas en la LTP, que pueden ser estimuladas por señales retrógradas desde la célula postsináptica.

perimentos, los receptores de NMDA tienen un papel crucial en el ajuste del patrón anatómico de conexiones sinápticas durante el desarrollo del sistema nervioso.

Por tanto, los neurotransmisores liberados en las sinapsis, además de transmitir señales eléctricas transitorias, también pueden alterar las concentraciones de mediadores intracelulares que desencadenan cambios duraderos en la eficacia de la transmisión sináptica. Sin embargo, todavía no está claro de qué forma estos cambios pueden durar semanas, meses o toda una vida cuando los constituyentes celulares siguen recambiándose a la velocidad normal.

En la **Tabla 11–2**, se resumen algunas de las familias de canales iónicos descritos en este capítulo.

Resumen

Los canales iónicos forman poros acuosos a través de la bicapa lipídica y permiten que los iones inorgánicos de tamaño y carga adecuados crucen la membrana a favor de sus gradientes electroquímicos a velocidades unas 1000 veces superiores que las que se consiguen mediante un transportador. Los canales están regulados y por lo general se abren transitoriamente en respuesta a una perturbación específica de la membrana, como un cambio en el potencial de membrana (canales regulados por voltaje) o la unión de un neurotransmisor (canales regulados por transmisores).

En muchas células animales, los canales de fuga selectivos de K^+ desempeñan un papel importante en el establecimiento del potencial de membrana de reposo. Los canales catiónicos regulados por voltaje son responsables de la generación de potenciales de acción autoamplificados en las células excitables eléctricamente, como las neuronas y las fibras musculares. Los canales iónicos regulados por transmisores convierten las señales químicas en señales eléctricas en las sinapsis químicas. Los neurotransmisores excitadores, como la acetilcolina y el glutamato, abren los canales catiónicos regulados por transmisores y despolarizan la membrana postsináptica hacia el valor umbral que dispara el potencial de acción. Los neurotransmisores inhibidores, como el GABA o la glicina, abren canales de Cl^- o K^+ regulados por transmisores y, de esta forma, suprimen el disparo de potenciales de acción manteniendo polarizada la membrana postsináptica. Una subclase de canales iónicos regulados por glutamato, llamado canal de los receptores de NMDA, es altamente permeable al Ca^{2+}, que puede provocar cambios a largo plazo en las sinapsis como LTP y LTD, que parece que están implicados en algunas formas de aprendizaje y memoria.

Tabla 11–2 Algunas familias de canales iónicos

TIPO DE CANAL	EJEMPLO REPRESENTATIVO	
Canales catiónicos regulados por voltaje	canales de Na^+ regulados por voltaje	
	canales de K^+ regulados por voltaje (incluyendo retardados y tempranos)	
	canales de Ca^{2+} regulados por voltaje	
Canales iónicos regulados por transmisores	canales catiónicos regulados por acetilcolina	excitadores
	canales de Ca^{2+} regulados por glutamato	excitadores
	canales catiónicos regulados por serotonina	excitadores
	canales de Cl^- regulados por GABA	inhibidores
	canales de Cl^- regulados por glicina	inhibidores

Los canales iónicos actúan coordinadamente de formas complejas y controlan el comportamiento de las células excitables eléctricamente. Por ejemplo, una neurona típica recibe miles de señales excitadoras e inhibidoras, que se combinan por suma espacial y temporal generando un potencial postsináptico (PSP) en el soma celular. La magnitud del PSP se traduce en una velocidad de disparo de potenciales de acción mediante una combinación de canales catiónicos en la membrana del segmento inicial.

PROBLEMAS

¿Qué afirmaciones son ciertas? Explicar por qué sí o por qué no

11-1 El transporte mediante transportadores puede ser activo o pasivo, mientras que el transporte a través de canales es siempre pasivo.

11-2 Los transportadores se saturan a elevadas concentraciones de la molécula transportada, cuando todos sus lugares de unión están ocupados; por el contrario, los iones transportados a través de un canal no se unen a él, de manera que el flujo a través del canal no se satura.

11-3 El potencial de membrana es consecuencia de los desplazamientos de carga que dejan las concentraciones de iones casi inalteradas, generando únicamente una ligera discrepancia en el número de iones positivos y negativos a los dos lados de la membrana.

Resolver los siguientes problemas

11-4 Ordenar, de acuerdo con su capacidad de difusión a través de la bicapa lipídica: Ca^{2+}, CO_2, etanol, glucosa, RNA y H_2O, comenzando por el que la atraviesa con mayor facilidad. Explicar el orden elegido.

11-5 ¿Cómo es posible que algunas moléculas mantengan un equilibrio a través de las membranas biológicas y no estén a la misma concentración en ambos lados?

11-6 Los transportadores de iones están estrechamente "unidos", no físicamente, sino como consecuencia de sus funciones. Por ejemplo, las células pueden aumentar su pH intracelular cuando se acidifican demasiado, intercambiando Na^+ interno por H^+ externo, utilizando un antiportador Na^+/H^+. La variación del Na^+ interno es reparada mediante una bomba de Na^+/K^+.

A. Estos dos transportadores, actuando conjuntamente, ¿pueden normalizar las concentraciones de H^+ y de Na^+ en el interior de la célula?

B. ¿La acción conjunta de estas dos bombas puede provocar un desequilibrio en la concentración de K^+ o en el potencial de membrana? ¿Por qué sí o por qué no?

11-7 Los microvilli aumentan el área de superficie de las células intestinales e incrementan así la eficiencia de la absorción de nutrientes. En la **Figura P11-1** se muestra una visión de perfil y una sección transversal de los microvilli. Sobre las dimensiones dadas en la figura, calcular el incremento del área de la superficie que proporcionan los microvilli (para la parte de la membrana plasmática que está en contacto con el lumen del intestino) respecto a la superficie correspondiente de una célula que tuviera la membrana plasmática "plana".

11-8 Según las leyes del movimiento de Newton, un ion expuesto a un campo eléctrico en el vacío tendría una aceleración constante debida a la fuerza electromotriz, similar a la aceleración constante debida a la gravedad de un cuerpo cayendo en el vacío. Sin embargo en el agua un ion sometido a un campo eléctrico se desplaza a una velocidad constante. ¿Por qué pasa esto?

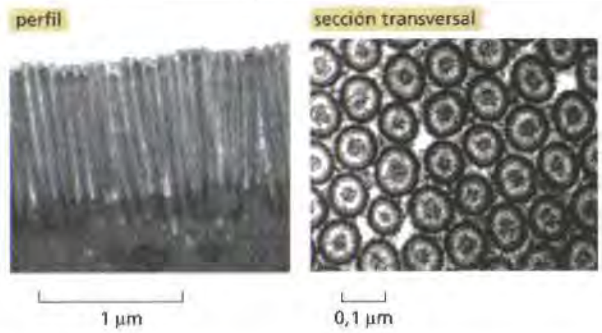


Figura P11-1 Perfil y sección transversal de los microvilli de las células del epitelio intestinal (Problema 11-7). (Panel izquierdo, de Rippel Electron Microscope Facility, Dartmouth College; panel derecho, de David Burgess.)

11-9 El modelo de "la pelota y la cadena" para la inactivación rápida de los canales de K^+ regulados por voltaje ha sido confirmado de forma elegante por el canal *agitador de K*$^+$ en *Drosophila melanogaster*. (Este canal ha sido denominado así tras conocerse una forma mutante que provoca un comportamiento nervioso –las moscas mantienen el movimiento incluso anestesiadas.) La deleción de los aminoácidos del extremo N-terminal del canal *agitador* normal da lugar a un canal que se abre en respuesta a la despolarización de la membrana, pero permanece abierto, en lugar de cerrarse rápidamente como un canal normal. A una concentración de 100 μM, un péptido (MAAVAGLYGLGEDRQHRKKQ) que corresponde al extremo N-terminal eliminado, puede inactivar el canal abierto.

¿La concentración del péptido libre (100 μM) que es necesaria para inactivar el canal defectuoso de K^+ está de alguna manera próxima a la concentración local normal de la bola atada sobre un canal normal? Asumir que la pelota atada puede explorar un hemisferio [volumen = $(2/3)\pi r^3$] cuyo radio es de 21,4 nm, la longitud de la "cadena" del polipéptido (**Figura P11-2**). Calcular la concentración para una pelota en este hemisferio. ¿Cómo es este valor comparado con la concentración de péptido libre necesaria para inactivar el canal?

11-10 El axón gigante del calamar ocupa una posición singular en la historia de nuestra comprensión del potencial de la membrana celular y la actividad nerviosa. Cuando se introduce un elec-

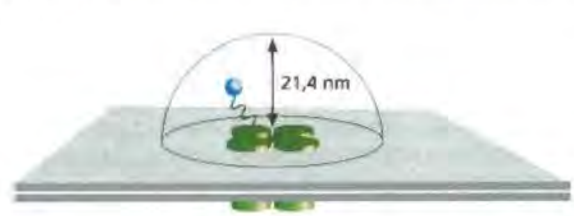


Figura P11-2 Una "pelota" atada por una "cadena" a un canal de K^+ regulado por voltaje (Problema 11-9).

trodo dentro de un axón intacto, se registra un potencial de membrana de –70 mV. Cuando el axón sumergido en un baño de agua de mar es estimulado a conducir un impulso nervioso, el potencial de membrana cambia transitoriamente de –70 mV a +40 mV.

Para iones univalentes a 20 °C (293 K), la ecuación de Nernst se reduce a

$$V = 58\ \text{mV} \times \log\ (C_0/C_i)$$

donde C_0 y C_i son las concentraciones en el exterior y en el interior, respectivamente.

Aplicando esta ecuación, calcular el potencial de la membrana en reposo (1) asumiendo que sólo se debe a K^+ y (2) asumiendo que se debe únicamente a Na^+. (Las concentraciones de Na^+ y de K^+ en el citoplasma del axón y en el agua de mar figuran en la **Tabla P11–1**.) ¿Qué cálculo es apropiado para medir el potencial en reposo? ¿Qué cálculo es apropiado para medir el potencial de acción? Explicar por qué estas suposiciones resultan aproximaciones a los potenciales de reposo y de acción medidos.

Tabla P11–1 Composición iónica del agua de mar y del citoplasma de un axón gigante del calamar (Problema 11–10).

ION	CITOPLASMA	AGUA DE MA
Na^+	65 mM	430 mM
K^+	344 mM	9 mM

BIBLIOGRAFÍA

General

Martonosi AN (ed) (1985) The enzymes of Biological membranes, vol 3: Membrane transport. 2.ª ed. New York: Plenum Press.

Stein WD (1990) Channels, carriers and pumps: An introduction to membrane transport. San Diego: Academic Press

Principios del transporte a través de la membrana

Al-Awqati Q (1999) One hundred years of membrane permeability: does Overton still rule? *Nature Cell Biol* 1: E201–E202.

Forrest LR & Sansom MS (2000) Membrane simulations: bigger and better? *Curr Opin Struct Biol* 10:174–181.

Gouaux E and MacKinnon R (2005) Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science* 310:1461–1465.

Mitchell P (1977) Vectorial chemiosmotic processes. *Annu Rev Biochem* 46:996–1005.

Tanford C (1983) Mechanism of free energy coupling in active transport. *Annu Rev Biochem* 52:379–409.

Transportadores y transporte activo a través de la membrana

Almers W & Stirling C (1984) Distribution of transport proteins over animal cell membranes. *J Membr Biol* 77:169–186.

Baldwin SA & Henderson PJ (1989) Homologies between sugar transporters from eukaryotes and prokaryotes. *Annu Rev Physiol* 51:459–471.

Borst P & Elferink RO (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71:537–592.

Carafoli E & Brini M (2000) Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Curr Opin Chem Biol* 4:152–161.

Dean M, Rzhetsky A et al (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 11:1156–1166.

Doige CA & Ames GF (1993) ATP-dependent transport systems in bacteria and humans: relevance to cystic fibrosis and multidrug resistance. *Annu Rev Microbiol* 47:291–319.

Gadsby DC, Vergani P & Csanady L (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 440:477–83.

Higgins CF (2007) Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* 446:749–57.

Kaback HR, Sahin-Toth M et al (2001) The kamikaze approach to membrane transport. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2:610–620.

Kühlbrandt W (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5:282–295.

Lodish HF (1986) Anion-exchange and glucose transport proteins: structure, function, and distribution. *Harvey Lect* 82:19–46.

Pedersen PL & Carafoli E (1987) Ion motive ATPases. 1. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem Sci* 12:146–150.

Romero MF & Boron WF (1999) Electrogenic Na^+/HCO_3^- cotransporters: cloning and physiology. *Annu Rev Physiol* 61:699–723.

Saier MH, Jr (2000) Vectorial metabolism and the evolution of transport systems. *J Bacteriol* 182:5029–5035.

Scarborough GA (2003) Rethinking the P-type ATPase problem. *Trends Biochem Sci* 28:581–584.

Stein WD (2002) Cell volume homeostasis: ionic and nonionic mechanisms. The sodium pump in the emergence of animal cells. *Int Rev Cytol* 215:2

Canales iónicos y propiedades eléctricas de las membranas

Armstrong C (1998) The vision of the pore. *Science* 280:56–57.

Choe S (2002) Potassium channel structures. *Nature Rev Neurosci* 3:115–21.

Choe S, Kreusch A & Pfaffinger PJ (1999) Towards the three-dimensional structure of voltage-gated potassium channels. *Trends Biochem Sci* 24:345–349.

Franks NP & Lieb WR (1994) Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 367:607–614.

Greengard P (2001) The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* 294:1024–30.

Hille B (2001) Ionic Channels of Excitable Membranes, 3.ª ed. Sunderlan Sinauer.

Hucho F, Tsetlin VI & Machold J (1996) The emerging three-dimensional structure of a receptor. The nicotinic acetylcholine receptor. *Eur J Bioch* 239:539–557.

Hodgkin AL & Huxley AF (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Ph* 117:500–544.

Hodgkin AL & Huxley AF (1952) Currents carried by sodium and potasiu ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116:449–472.

Jessell TM & Kandel ER (1993) Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell–cell communication. *Cell* 72[Suppl]:1–30.

Kandel ER, Schwartz JH & Jessell TM (2000) Principles of Neural Science, 4. New York: McGraw-Hill.

Karlin A (2002) Emerging structure of the nicotinic acetylcholine recepto *Nature Rev Neurosci* 3:102–114.

Katz B (1966) Nerve, Muscle and Synapse. New York: McGraw-Hill.

King LS, Kozono D & Agre P (2004) From structure to disease: the evolving ta aquaporin biology. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5:687–698.

MacKinnon R (2003) Potassium channels. *FEBS Lett* 555:62–65.

Malenka RC & Nicoll RA (1999) Long-term potentiation–a decade of prog *Science* 285:1870–1874.

Moss SJ & Smart TG (2001) Constructing inhibitory synapses. *Nature Rev Neurosci* 2:240–250.

Neher E and Sakmann B (1992) The patch clamp technique. *Sci Am* 266:44–

Nicholls JG, Fuchs PA, Martin AR & Wallace BG (2000) From Neuron to Brain, 4.ª ed. Sunderland, MA: Sinauer.

Numa S (1987) A molecular view of neurotransmitter receptors and ionic channels. *Harvey Lect* 83:121–165.

Scannevin RH & Huganir RL (2000) Postsynaptic organization and regulation excitatory synapses. *Nature Rev Neurosci* 1:133–141.

Seeburg PH (1993) The molecular biology of mammalian glutamate recepto channels. *Trends Neurosci* 16:359–365.

Snyder SH (1996) Drugs and the Brain. New York: WH Freeman/ Scientific American Books.

Stevens CF (2004) Presynaptic function. *Curr Opin Neurobiol* 14:341–345.

Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV et al (1988) Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci* 11:431–4

Unwin N (2003) Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS Lett* 555:91–95.

Compartimientos intracelulares y clasificación de proteínas

12

A diferencia de las bacterias, que por lo general constan de un solo compartimiento rodeado por una membrana plasmática, la célula eucariota está subdividida en compartimientos rodeados por membrana, que son funcionalmente distintos. Cada compartimiento u **orgánulo** contiene su propia dotación de enzimas, otras moléculas especializadas y un complejo sistema de distribución que transporta de forma específica los compuestos de un compartimiento a otro. Para entender la célula eucariota es necesario conocer cómo genera y mantiene estos compartimientos, qué ocurre en cada uno de ellos y cómo se desplazan las moléculas entre ellos.

Las proteínas confieren a cada compartimiento sus propiedades estructurales y funcionales. Catalizan las reacciones que tienen lugar en cada orgánulo y transportan selectivamente pequeñas moléculas hacia dentro y hacia fuera del interior del orgánulo o **lumen**. También actúan como marcadores específicos de superficie de los orgánulos que dirigen el destino de proteínas y lípidos al orgánulo apropiado.

Una célula animal contiene alrededor de 10 mil millones (10^{10}) de moléculas de proteína de unos 10.000 tipos distintos. La síntesis de la mayoría de todas estas proteínas empieza en el citosol, el espacio común que engloba a los orgánulos. Una vez sintetizada, cada proteína es transportada específicamente al compartimiento celular que la necesita. El transporte intracelular es el tema central de este capítulo y del siguiente. El conocimiento del tráfico de proteínas desde un compartimiento a otro permite empezar a comprender el desconcertarte laberinto de las membranas intracelulares.

En este capítulo

LA COMPARTIMENTACIÓN DE LAS CÉLULAS 695

TRANSPORTE DE MOLÉCULAS ENTRE EL NÚCLEO Y EL CITOSOL 704

TRANSPORTE DE PROTEÍNAS AL INTERIOR DE MITOCONDRIAS Y CLOROPLASTOS 713

PEROXISOMAS 720

RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO 723

LA COMPARTIMENTACIÓN DE LAS CÉLULAS

En esta sección introductoria se proporcionará una visión general de los distintos compartimientos de la célula y de las relaciones que existen entre ellos mediante la organización conceptual de los orgánulos en un pequeño número de familias, revisando cómo las proteínas se dirigen a orgánulos específicos y explicando cómo atraviesan las membranas de los orgánulos

Todas las células eucariotas tienen la misma dotación básica de orgánulos rodeados de membrana

Muchos procesos bioquímicos vitales ocurren en o sobre superficies de membrana. Por ejemplo, el metabolismo lipídico está catalizado sobre todo por enzimas unidas a membranas y tanto la fosforilación oxidativa como la fotosíntesis requieren una membrana semipermeable para acoplar el transporte de H^+ con la síntesis de ATP. Además de proporcionar un incremento del área de membrana a las reacciones bioquímicas, los sistemas intracelulares de membranas forman compartimientos cerrados separados del citosol, generando dentro de la célula espacios acuosos que tienen una función especializada. Dado que la bicapa lipídica de los orgánulos de membrana es impermeable a la mayoría de las moléculas hidrofílicas, la membrana de cada orgánulo debe disponer de proteínas transportadoras que importan o exportan determinados metabolitos. La membrana de cada orgánulo también debe tener un mecanismo de importación y de incorporación al orgánulo de las proteínas características de dicho orgánulo.

En la **Figura 12-1**, se ilustran los compartimientos más importantes comunes a todas las células eucariotas. El *núcleo* contiene el genoma principal (además de las mitocondrias y

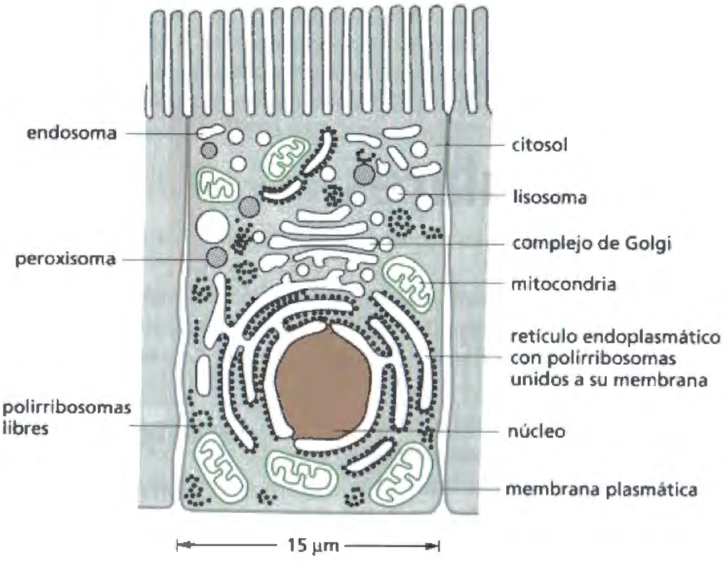


Figura 12–1 Esquema de los principales compartimientos intracelulares de una célula animal. <ATCC> El citosol (en *gris*), el retículo endoplasmático, el complejo de Golgi, el núcleo, las mitocondrias, los endosomas, los lisosomas y los peroxisomas son diferentes compartimientos que se hallan aislados del resto de la célula mediante, al menos, una membrana dotada de permeabilidad selectiva.

los cloroplastos) y es el lugar más importante de síntesis de DNA y de RNA. El **citoplasma** que lo circunda consiste en el *citosol* y los *orgánulos* citoplasmáticos suspendidos en él. El **citosol** constituye un poco más de la mitad del volumen total de la célula y es el lugar donde tiene lugar la síntesis de proteínas y su degradación. Además es donde se desarrollan la mayoría de las reacciones del metabolismo intermediario celular, es decir, el elevado número de reacciones mediante las cuales algunas moléculas pequeñas son degradadas y otras son sintetizadas proporcionando los elementos para la construcción de las macromoléculas (se describe en el Capítulo 2).

Aproximadamente la mitad del área total de membrana de una célula eucariota engloba los espacios laberínticos del *retículo endoplasmático* (*ER: endoplasmic reticulum*). El *ER rugoso* presenta muchos ribosomas unidos a su superficie citoplasmática, que sintetizan proteínas solubles e integrales de membrana, la mayoría destinadas a ser segregadas o a ser transportadas a otros orgánulos. Veremos que aunque las proteínas son transportadas a otros orgánulos después de ser sintetizadas, son transportadas al ER a medida que se sintetizan. Esto explica por qué el ER presenta ribosomas de forma característica. Ciertas regiones que no tienen ribosomas se denominan *ER liso*. El ER también produce la mayoría de los lípidos del resto de la célula y también actúa como almacén de iones Ca^{2+}. El ER envía muchas de sus proteínas y lípidos al *complejo de Golgi*, que está formado por una serie de compartimientos organizados en forma de sacos discoidales llamados *cisternas del Golgi*. El complejo de Golgi recibe lípidos y proteínas del ER y las distribuye hacia diferentes destinos intracelulares, por lo general modificándolas covalentemente *durante el viaje*.

Las *mitocondrias* y (en plantas) los *cloroplastos* generan la mayor parte del ATP que utilizan las células para impulsar las reacciones biosintéticas que requieren un aporte de energía libre; los cloroplastos son una versión especializada de los *plastidios*, que pueden tener otras funciones en las células vegetales, como el almacenamiento de reservas o de pigmentos. Los *lisosomas* contienen enzimas digestivas que degradan tanto orgánulos muertos como macromoléculas y partículas captadas del exterior de la célula por endocitosis. En su camino hacia los lisosomas, las macromoléculas y las partículas endocitadas primero deben pasar por una serie de compartimientos llamados *endosomas*. Por último, los *peroxisomas* son pequeños compartimientos vesiculares que contienen enzimas que participan en diversas reacciones oxidativas.

En general, cada orgánulo rodeado por membrana realiza el mismo tipo de funciones básicas en todos los tipos celulares. Pero, para poder cumplir las funciones especializadas de las células, estos orgánulos varían en abundancia y pueden tener propiedades adicionales que difieran de un tipo celular a otro.

En conjunto, estos orgánulos ocupan casi la mitad del volumen celular (**Tabla 12–1**) y para fabricarlos se requiere una gran cantidad de membranas intracelulares. Por ejemplo, en las células hepáticas y en las células pancreáticas, el retículo endoplasmático tiene una superficie de membrana total que es 25 y 12 veces mayor respectivamente que la membrana plasmática (**Tabla 12–2**). Así, en términos de área y de masa en la mayoría de las células

Tabla 12–1 Volúmenes relativos ocupados por los principales compartimientos intracelulares en una célula hepática típica (hepatocito)

COMPARTIMIENTO INTRACELULAR	PORCENTAJE DEL VOLUMEN CELULAR TOTAL
Citosol	54
Mitocondrias	22
Vesículas del ER rugoso	9
Vesículas del ER liso y cisternas del Golgi	6
Núcleo	6
Peroxisomas	1
Lisosomas	1
Endosomas	1

eucariotas la membrana plasmática sólo es una membrana minoritaria y los orgánulos se encuentran densamente empaquetados en el citosol (**Figura 12–2**).

A menudo los orgánulos rodeados de membrana ocupan posiciones características en el citosol. Por ejemplo, en la mayoría de células el complejo de Golgi se encuentra cerca del núcleo mientras que la red de sáculos del ER se extiende a partir del núcleo por todo el citosol. Estas distribuciones características dependen de las interacciones de los orgánulos con el citoesqueleto. Por ejemplo, la localización del ER y del complejo de Golgi depende de la existencia de una red intacta de microtúbulos. Si se despolimerizan experimentalmente los microtúbulos con un fármaco, el complejo de Golgi se fragmenta y se dispersa por toda la célula y la red del ER se colapsa hacia el centro celular (se describe en el Capítulo 16).

Los orígenes evolutivos explican las relaciones topológicas de los orgánulos

Para entender la relación que existe entre los compartimientos de la célula, resulta útil considerar cómo pueden haber evolucionado. Se cree que los precursores de las primeras células eucariotas fueron organismos parecidos a bacterias, los cuales generalmente tienen membrana plasmática pero no membranas internas. En estas células, por lo tanto, la mem-

Tabla 12–2 Cantidades relativas de tipos de membrana en dos tipos de células eucariotas

TIPO DE MEMBRANA	PORCENTAJE DE LA MEMBRANA CELULAR TOTAL	
	HEPATOCITO*	CÉLULA EXOCRINA PANCREÁTICA*
Membrana plasmática	2	5
Membrana del ER rugoso	35	60
Membrana del ER liso	16	<1
Membrana del complejo de Golgi	7	10
Mitocondria		
Membrana externa	7	4
Membrana interna	32	17
Núcleo		
Membrana interna	0,2	0,7
Membrana de vesículas secretoras	no determinado	3
Membrana de lisosomas	0,4	no determinado
Membrana de peroxisomas	0,4	no determinado
Membrana de endosomas	0,4	no determinado

*Estas dos células son de tamaño muy diferente: los hepatocitos tienen un volumen medio de 5000 μm^3 en comparación con los 1000 μm^3 de las células exocrinas pancreáticas. Las áreas totales de membrana por célula se estiman en 110.000 μm^2 y 13.000 μm^2 respectivamente.

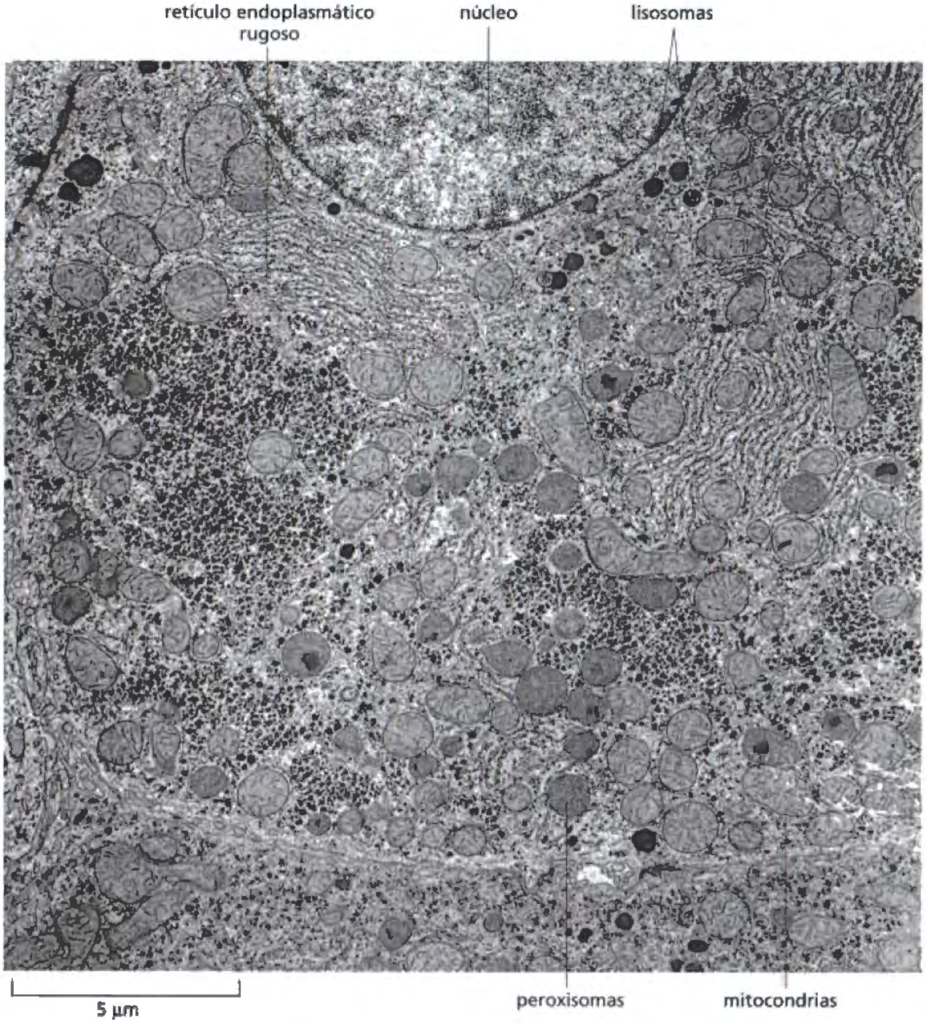


Figura 12–2 Electromicrografía de una parte de una célula hepática vista en sección transversal. Se señalan ejemplos de la mayoría de los principales compartimientos intracelulares. (Por cortesía de Daniel S. Friend.)

brana plasmática realiza todas las funciones dependientes de membrana, como el bombeo de protones, la síntesis de ATP y la síntesis de lípidos. No obstante, las células eucariotas actuales tienen una dimensión lineal entre 10 y 30 veces mayor y un volumen entre 1000 y 10.000 veces mayor que una bacteria típica como *E. coli*. Se podría proponer que la profusión de membranas internas responde en parte a una adaptación a este incremento en tamaño: las células eucariotas tienen una relación entre superficie y volumen mucho menor, de forma que probablemente su membrana plasmática es demasiado pequeña para desempeñar la gran cantidad de funciones vitales ligadas a membrana. El extenso sistema de membranas intracelulares de una célula eucariota compensa ese problema.

Como es evidente, la evolución de las membranas internas ha ido en paralelo con la especialización de sus funciones. Consideremos, por ejemplo, la formación de las *vesículas tilacoidales* en los cloroplastos. Estas vesículas se forman durante el desarrollo de los cloroplastos a partir de proplastidios en las hojas verdes de las plantas. Están rodeadas de una doble membrana y se desarrollan de acuerdo con las necesidades de las células diferenciadas: por ejemplo, en las células de la hoja se transforman en cloroplastos, pero en otros tipos celulares forman orgánulos que almacenan almidón, lípidos o pigmentos (**Figura 12–3A**). Cuando se transforman en cloroplastos, se forman regiones de membrana especializadas que se separan de la membrana interna del proplastidio. Estas vesículas forman un nuevo compartimiento especializado, el *tilacoide*, que contiene toda la maquinaria fotosintética del cloroplasto (Figura 12–3 B).

Otros compartimientos de la célula eucariota se pueden haber formado de una manera conceptualmente similar (**Figura 12–4**). Las invaginaciones y separación de estructuras intracelulares membranosas de la membrana plasmática generan orgánulos con un interior que es equivalente desde un punto de vista topológico al exterior de la célula. Veremos que estas relaciones topológicas existen para todos los orgánulos implicados en las vías secreto-

rias y endocíticas, incluyendo el ER, el complejo de Golgi, los endosomas y los lisosomas. Por lo tanto podemos pensar que todos estos orgánulos son miembros de la misma familia. Como se describirá en detalle en el próximo capítulo, sus interiores se comunican entre sí y con el exterior de la célula a través de *vesículas de transporte* que emergen por gemación de un orgánulo y se fusionan con otro (**Figura 12–5**).

Como describimos en el Capítulo 14, las mitocondrias y los cloroplastos difieren de los otros orgánulos rodeados de membrana porque poseen su propio genoma. La naturaleza de estos genomas y la estrecha similitud existente entre las proteínas de estos orgánulos y las de algunas bacterias actuales sugiere claramente que las mitocondrias y los cloroplastos evolucionaron a partir de bacterias que fueron "engullidas" por otras células con las que inicialmente vivieron en simbiosis (se explica en los Capítulos 1 y 14). De acuerdo con el esquema hipotético de la Figura 12–4B, la membrana interna de las mitocondrias y de los cloroplastos corresponde a la membrana plasmática original de las bacterias, mientras que el lumen de estos orgánulos evolucionó a partir del citoplasma bacteriano. Como podríamos esperar debido a su origen endocítico, estos dos orgánulos están formados por una doble membrana y permanecen aislados del extenso tráfico de vesículas que conecta el interior de la mayoría de los orgánulos delimitados por membrana entre sí y con el exterior de la célula.

El esquema evolutivo descrito anteriormente agrupa los principales compartimientos intracelulares de la células eucariotas, en cuatro grupos: (1) el núcleo y el citosol, que se comunican entre sí a través de los *complejos de poros nucleares* por lo que son topológicamente continuos (a pesar de tener funciones diferentes); (2) todos los orgánulos que actúan en las rutas de secreción y de endocitosis, incluyendo el ER, el complejo de Golgi, los endosomas y los lisosomas, las numerosas clases de vesículas de transporte que se desplazan entre ellos y posiblemente los peroxisomas; (3) las mitocondrias, y (4) los plastidios (sólo en plantas).

Las proteínas pueden desplazarse entre compartimientos de diferentes maneras

La síntesis de todas las proteínas empieza en el citosol, excepto las que son sintetizadas en los ribosomas de las mitocondrias y de los plastidios. Su destino siguiente depende de su secuencia de aminoácidos, que puede presentar señales de clasificación que dirigen su reparto hacia posiciones fuera del citosol. Muchas proteínas no presentan **señales de clasificación** y, en consecuencia, permanecen en el citosol como residentes permanentes. Sin embargo, muchas otras tienen señales de clasificación específicas que las dirigen desde el citosol hacia el núcleo, el ER, las mitocondrias, los plastidios o los peroxisomas; las señales de clasificación también pueden dirigir el transporte desde el ER hacia otros destinos celulares.

Para entender los principios generales por los que actúan las señales de clasificación, es importante distinguir tres sistemas fundamentales diferentes mediante los cuales las proteínas se desplazan desde un compartimiento a otro. Estos tres mecanismos se describen

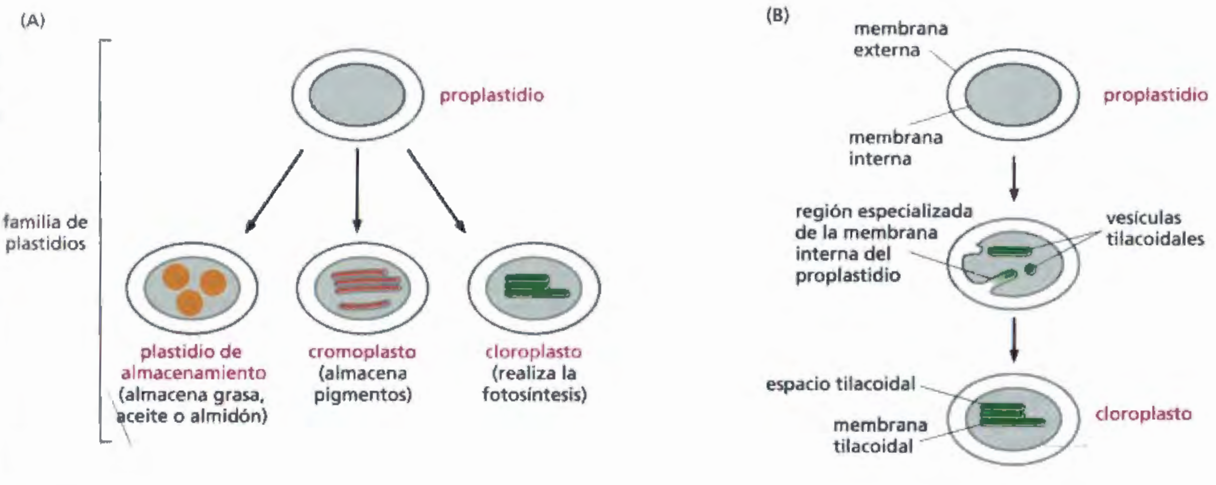


Figura 12–3 Desarrollo de los plastidios. (A) En las plantas, los proplastidios son heredados con el citoplasma de las células del huevo. Cuando una célula vegetal inmadura se diferencia, los proplastidios se desarrollan de acuerdo con las necesidades de la célula especializada: pueden convertirse en cloroplastos (p. ej. en las células de las hojas), en plastidios de almacenamiento que acumulan almidón (p. ej. en los tubérculos de patata) o aceite y gotas de lípidos (p. ej. en las semillas grasas), o cromoplastos que acumulan pigmentos (p. ej. en los pétalos de las flores). (B) Desarrollo del tilacoide. A medida que el cloroplasto se desarrolla, unas regiones de la membrana especializada se van separando por invaginación de la membrana interna del proplastidio, formando vesículas tilacoidales que madurarán convirtiéndose en el tilacoide maduro. La membrana del tilacoide forma un compartimiento separado, el espacio tilacoidal, que es estructural y funcionalmente diferente del resto del cloroplasto. Los tilacoides pueden crecer y dividirse de forma autónoma a medida que el cloroplasto prolifera.

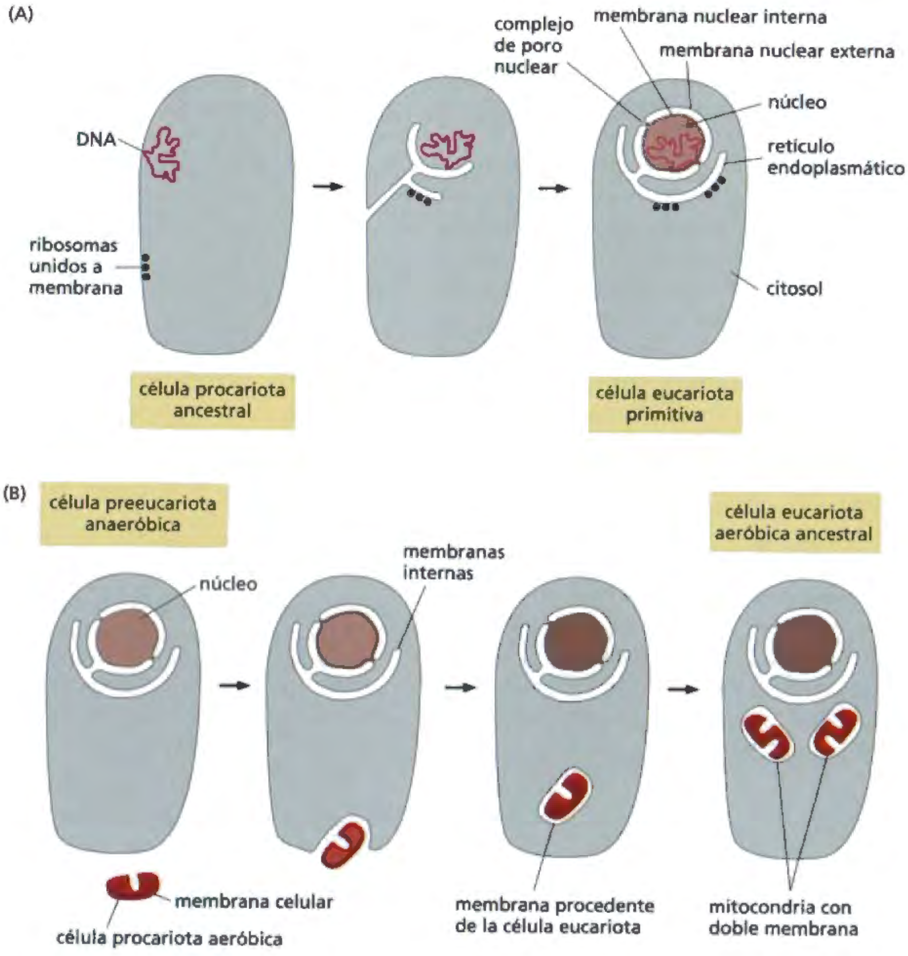


Figura 12–4 Esquema hipotético de los orígenes evolutivos de algunos orgánulos. Los orígenes de la mitocondria, de los cloroplastos, del ER y del núcleo celular podrían explicar las relaciones topológicas de estos compartimientos en las células eucariotas.

(A) Una posible vía para la evolución del núcleo celular y del ER. En algunas bacterias la molécula de DNA única, que contiene el cromosoma bacteriano, está unida a una invaginación de la membrana plasmática. Esta invaginación en una célula procariota primitiva podría haber evolucionado formando una envoltura del DNA, que permitiría todavía el acceso del DNA al citosol celular (como se requiere para la síntesis de proteínas). Se supone que esta envoltura podría haberse separado de la membrana plasmática, formándose un compartimiento nuclear rodeado de una doble membrana.

Como se ilustra, unos canales de comunicación denominados complejos de poro nuclear (NPC) atraviesan la envoltura nuclear. Dado que está rodeado por dos membranas que están en contacto y atravesadas por los NPC, el compartimiento nuclear es topológicamente equivalente al citosol; de hecho, durante la mitosis el contenido nuclear se mezcla con el citosol. El lumen del ER es continuo con el espacio entre las membranas nucleares interna y externa y es topológicamente equivalente al espacio extracelular (véase Figura 12–5).

(B) Parece que las mitocondrias (y los plastidios) se originaron cuando una bacteria fue incorporada por una célula preeucariota de un tamaño mayor. Este hecho podría explicar por qué contienen sus propios genomas y por qué el lumen de estos orgánulos se mantiene aislado del tráfico de membranas que interconecta el lumen de muchos otros compartimientos intracelulares.

más adelante, mostrándose el lugar donde ocurren en la **Figura 12–6**. En este capítulo describimos con detalle los dos primeros mecanismos y el tercero (*flechas verdes* en la Figura 12–6) en el Capítulo 13.

1. En el **transporte regulado**, las proteínas se desplazan entre el citosol y el núcleo (que son equivalentes en cuanto a su topología) a través de los complejos de poro de la envoltura del núcleo. El complejo de poro nuclear actúa como una puerta selectiva que puede transportar de forma activa macromoléculas específicas y complejos macromoleculares, aunque también permiten la difusión libre de moléculas pequeñas.
2. En el **transporte transmembrana**, unos *translocadores proteicos* transmembrana dirigen el transporte específico de proteínas a través de la membrana desde el citosol hacia un espacio que es topológicamente distinto. Por lo general, la molécula de proteína transportada tiene que desplegarse para poder deslizarse a través del translocador; de este modo por ejemplo tiene lugar el transporte inicial de determinadas proteínas desde el citosol hacia el lumen del ER o hacia el interior de las mitocondrias.

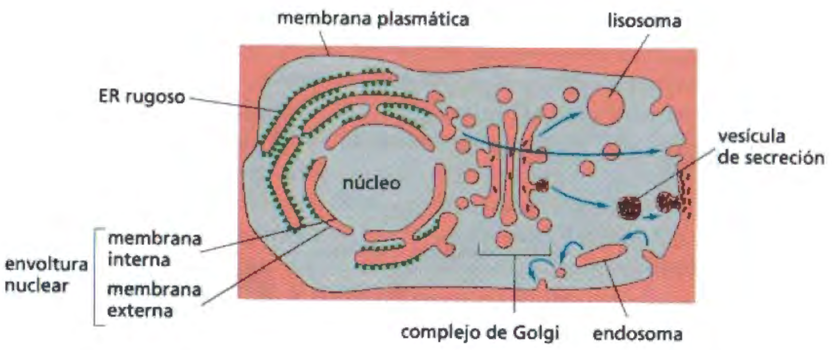


Figura 12–5 Relaciones topológicas entre los compartimientos de las vías secretora y endocítica de una célula eucariota. Los espacios topológicamente equivalentes se representan en *rojo*. Los ciclos de gemación y fusión permiten, en principio, que cualquier lumen se comunique con cualquier otro y con el exterior celular mediante vesículas de transporte. Las *flechas azules* indican la extensa red del tráfico de salida y de entrada de vesículas (se explica en el Capítulo 13). Algunos orgánulos, especialmente las mitocondrias, y los plastidios en células vegetales, no participan en esta comunicación sino que están aislados del tráfico entre orgánulos tal como se muestra en la figura.

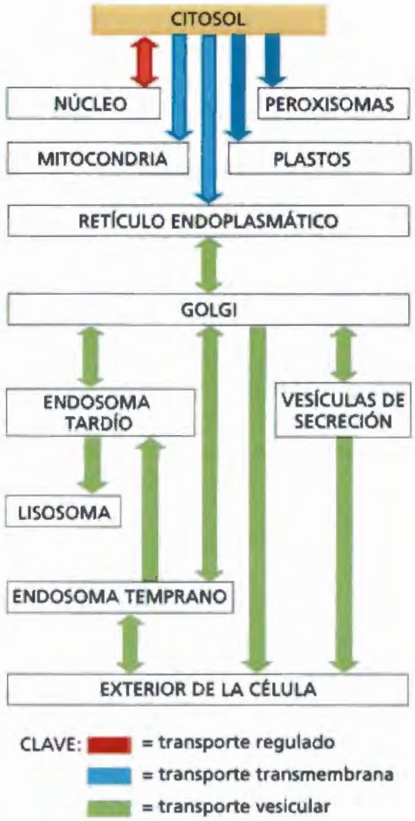


Figura 12–6 "Mapa de carreteras" simplificado del tráfico proteico. Las proteínas pueden desplazarse de un compartimiento a otro por medio de un transporte regulado (en *rojo*), un transporte transmembrana (en *azul*) o un transporte vesicular (en *verde*). La información para la organización de las señales que dirigen el camino de una determinada proteína a través del sistema, determinando su localización en la célula, está contenida en la secuencia de aminoácidos de cada proteína. El viaje comienza con la síntesis de una proteína sobre un ribosoma en el citosol y termina cuando la proteína alcanza su destino final. En cada una de las estaciones intermedias *(recuadros)* se toma una decisión respecto a si la proteína será retenida en ese compartimiento o será transportada más allá. En principio, tanto para retener la proteína en el compartimiento como para no retenerla se requiere una señal de clasificación.

En este capítulo y en el siguiente, se utilizará a menudo esta figura como referencia, destacando el color de la vía particular que se analiza en cada momento.

- En el **transporte vesicular**, intermediarios de transporte rodeados de membrana, que pueden ser vesículas de transporte pequeñas y esféricas o fragmentos de orgánulo grandes y de formas irregulares, conducen proteínas desde un compartimiento a otro. Las vesículas de transporte y los fragmentos de orgánulo están cargados de moléculas que se encuentran en el lumen del orgánulo, basta que geman y se separan de su membrana; entonces descargan su carga en un segundo compartimiento al fusionarse con la membrana que rodea este compartimiento (**Figura 12–7**). Por ejemplo, la transferencia de proteínas solubles desde el ER al complejo de Golgi tiene lugar por este mecanismo. Dado que las proteínas transportadas no atraviesan la membrana, el transporte vesicular sólo puede transportar proteínas entre compartimientos que son topológicamente equivalentes (véase Figura 12–5).

Por lo general, cada sistema de transporte de proteínas está controlado mediante señales de clasificación presentes en la proteína transportada, que son reconocidas por *receptores de clasificación* complementarios. Por ejemplo, si una proteína grande tiene que ser importada hacia el núcleo, debe tener una señal de clasificación que sea reconocida por los receptores de clasificación que la guiarán a través del complejo de poro nuclear. Si una proteína tiene que ser transferida de forma directa a través de una membrana, debe tener una señal de clasificación en la membrana que sea reconocida por el translocador. Del mismo modo, si una proteína tiene que ser incorporada a cierto tipo de vesículas o retenida en ciertos orgánulos, sus señales de clasificación deben ser reconocidas por un receptor complementario de la membrana apropiada.

Las secuencias señal dirigen a las proteínas a su destino celular correcto

La mayoría de señales de clasificación de las proteínas residen en una región continua de la secuencia de aminoácidos de 15-60 residuos de longitud característicos. A menudo estas **secuencias señal** se encuentran en el extremo N-terminal; una vez se ha completado el proceso de clasificación, unas **peptidasas señal** especializadas eliminan la secuencia señal de la proteína. En algunos casos, las señales de clasificación están compuestas por varias secuencias internas de aminoácidos que adoptan una disposición tridimensional característica de los átomos de la superficie de la proteína, denominadas una **región señal**.

Cada secuencia señal especifica un destino particular en la célula. En general, las proteínas que están destinadas a ser transferidas al ER tienen, en su extremo N-terminal, secuencias señal que en su parte central presentan entre 5 y 10 restos de aminoácidos hidrofóbicos. Muchas de estas proteínas pasarán después desde el ER al complejo de Golgi; no

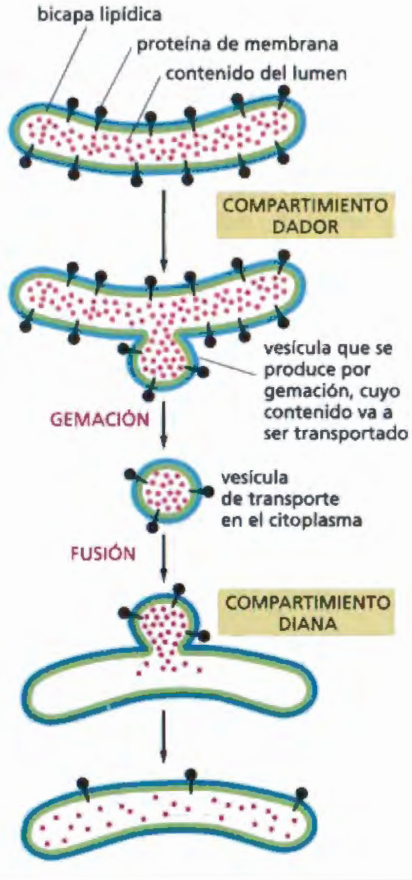


Figura 12–7 Gemación de vesículas y fusión durante el transporte vesicular. Las vesículas aparecen por gemación de un compartimiento (dador) y se fusionan con otro compartimiento (aceptor o diana). En el proceso, determinados componentes solubles *(puntos rojos)* son transferidos de un lumen a otro. Nótese que la membrana también es transferida y que la orientación original, tanto para las proteínas como para los lípidos en el compartimiento original, se mantiene en la membrana del compartimiento aceptor. Así pues, las proteínas de membrana conservan su orientación asimétrica, con los mismos dominios siempre orientados hacia el citosol.

obstante, las proteínas que presentan en su extremo C-terminal una secuencia señal determinada de cuatro aminoácidos son reconocidas como residentes en el ER y devueltas al mismo. Las proteínas destinadas a las mitocondrias tienen secuencias señal de otro tipo, en las que se alternan restos de aminoácidos cargados positivamente con restos de aminoácidos hidrofóbicos. Finalmente, las proteínas destinadas a los peroxisomas tienen una secuencia señal de tres aminoácidos característicos en su extremo C-terminal.

En la **Tabla 12–3** se muestran algunas secuencias señal específicas. La importancia que tiene cada una de estas secuencias señal en el destino de las proteínas se ha demostrado mediante experimentos en los que el péptido ha sido transferido desde una proteína a otra mediante técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, colocando la secuencia señal N-terminal específica para el ER, al principio de una proteína citosólica, se consigue que ahora la proteína se dirija al ER. Por tanto, las secuencias señal son tan necesarias como suficientes para el direccionamiento de las proteínas. Aunque sus secuencias de aminoácidos difieran en gran medida, las secuencias señal de todas las proteínas que tienen el mismo destino son funcionalmente intercambiables; parece que en el proceso de reconocimiento de la señal son más importantes las propiedades físicas que la propia secuencia de aminoácidos.

Las secuencias señal son reconocidas por receptores de clasificación que guían a las proteínas hacia el destino correcto, donde los receptores se separan de su carga. Los receptores actúan de forma catalítica: después de completar un ciclo de transporte vuelven a su punto de origen y son reutilizados. La mayoría de los receptores de clasificación reconocen clases de proteínas más que una sola especie proteica. Por lo tanto pueden ser considerados como sistemas públicos de transporte dedicados a la entrega de diferentes componentes a su destino correcto de la célula.

En el **Panel 12–1** se describen los principales métodos utilizados para estudiar cómo se dirigen las proteínas desde el citosol a un compartimiento específico y los mecanismos de su translocación a través de las membranas.

La mayoría de los orgánulos no se pueden construir *de novo*: necesitan información del propio orgánulo

Cuando una célula se reproduce y se divide, tiene que duplicar sus orgánulos. Normalmente las células realizan esta duplicación incorporando nuevas moléculas y, por tanto, agrandándolos; entonces, los orgánulos agrandados se dividen y se distribuyen entre las dos células hijas. Así, cada célula hija hereda de su madre un juego completo de membranas celulares especializadas. Esta herencia es esencial ya que una célula no puede fabricar de la nada estas membranas. Por ejemplo, si se elimina completamente el ER de la célula, ¿de qué forma puede la célula reconstruirlo? Como veremos más adelante, las proteínas de membrana que definen el ER y realizan muchas de sus funciones clave son productos del propio ER. No se puede fabricar un nuevo ER sin la existencia previa de un ER o al menos de una membrana que contenga los translocadores necesarios para importar proteínas específicas hacia el ER

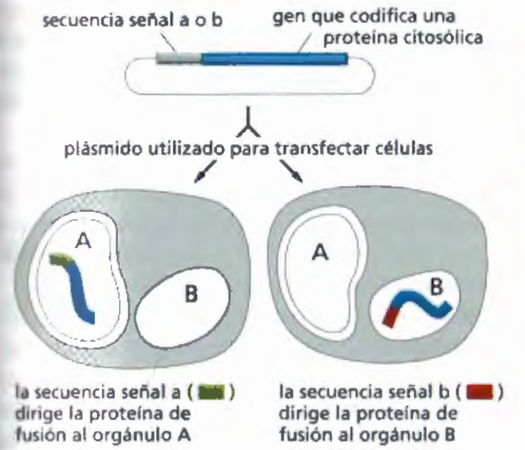
Tabla 12–3 Algunas secuencias señal típicas

FUNCIÓN DE LA SECUENCIA SEÑAL	EJEMPLO DE SECUENCIA SEÑAL
Importación al núcleo	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-
Exportación desde el núcleo	-Leu-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-Gly-Leu-Asp-Ile-
Importación a la mitocondria	$^{+}H_3N$-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu-
Importación a plastidios	$^{+}H_3N$-Met-Val-Ala-Met-Ala-Met-Ala-Ser-Leu-Gln-Ser-Ser-Met-Ser-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Ser-Asn-Ser-Phe-Leu-Gly-Gln-Pro-Leu-Ser-Pro-Ile-Thr-Leu-Ser-Pro-Phe-Leu-Gln-Gly-
Importación a los peroxisomas	-Ser-Lys-Leu-COO^-
Importación al ER	$^{+}H_3N$-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-
Retorno al ER	-Lys-Asp-Glu-Leu-COO^-

En color se destacan algunas de las características de los diferentes tipos de secuencias señal. Cuando se sabe que tienen importancia para la función de la secuencia señal, los residuos de aminoácidos cargados positivamente se muestran en *rojo* y los cargados negativamente en *verde*. De manera similar, los aminoácidos hidrofóbicos importantes se muestran en *blanco* y los aminoácidos hidroxilados más importantes se muestran en *azul*. $^{+}H_3N$ indica el extremo N-terminal de la proteína y COO^- el C-terminal.

APROXIMACIÓN POR TRANSFECCIÓN PARA DEFINIR SECUENCIAS SEÑAL

Una manera de demostrar que una secuencia señal es necesaria y suficiente para dirigir una proteína hacia un compartimiento intracelular determinado, consiste en generar una proteína de fusión en la que la secuencia señal se halle unida, mediante técnicas de ingeniería genética, a una proteína que normalmente reside en el citosol. Después de transfectar células con el cDNA que codifica esta proteína, se determina la localización de la proteína de fusión mediante inmunomarcaje o fraccionamiento celular.

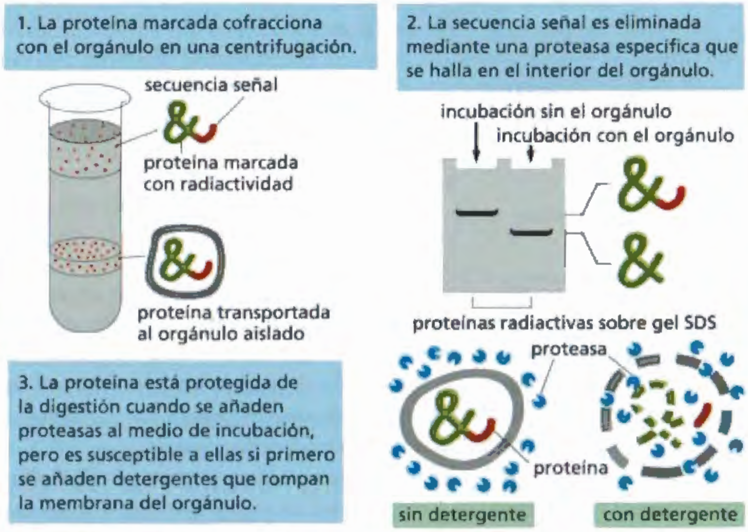


Alterando la secuencia señal mediante mutagénesis dirigida, puede determinarse cuáles de sus características son importantes para su función.

APROXIMACIÓN BIOQUÍMICA PARA ESTUDIAR EL MECANISMO DE TRANSLOCACIÓN DE LA PROTEÍNA

En este caso, una proteína marcada que contiene una secuencia señal específica es transportada *in vitro* al interior de orgánulos aislados. Generalmente la proteína marcada es producida por traducción de un mRNA que codifica la proteína en un sistema libre de células; se utilizan aminoácidos radiactivos para marcar la proteína acabada de sintetizar de forma que pueda distinguirse de las muchas otras proteínas que se hallan presentes en el sistema de traducción *in vitro*.

Por lo general, se utilizan tres métodos para determinar si la proteína marcada se ha translocado al orgánulo:



Utilizando estos ensayos *in vitro* puede determinarse qué componentes (proteínas, ATP, GTP, etc.) son necesarios para los procesos de transcripción.

APROXIMACIÓN GENÉTICA AL MECANISMO DE TRANSLOCACIÓN DE PROTEÍNAS



Para estudiar la translocación de proteínas, se utilizan habitualmente células de levadura con mutaciones en genes que codifican componentes de la maquinaria de translocación. Debido a que las células mutantes que no pueden translocar proteínas a través de sus membranas morirán, el truco consiste en diseñar una estrategia que permita aislar las mutaciones que sólo causan un defecto parcial en la translocación de proteínas.

Una estrategia consiste en utilizar la ingeniería genética para diseñar células especiales de levadura. Por ejemplo, la enzima histidinol deshidrogenasa reside normalmente en el citosol, donde es necesaria para producir el aminoácido esencial histidina a partir de su precursor histidinol. Se construye una cepa de levadura en la que el gen de la histidinol reductasa está sustituido por un gen modificado de forma artificial para que codifique una proteína de fusión con una secuencia señal extra que dirige la proteína al interior del retículo endoplasmático (ER). Cuando estas células se hacen crecer en ausencia de histidina, mueren debido a que toda la histidinol deshidrogenasa está secuestrada en el ER, donde no es funcional. Sin embargo, las células con mutaciones que inactivan parcialmente el mecanismo de translocación de las proteínas desde el citosol al ER sobrevivirán debido a que habrá suficiente cantidad de deshidrogenasa retenida en el citosol para producir la histidina necesaria.

A menudo se obtienen células en las que la proteína mutante de la maquinaria de translocación todavía actúa de forma parcial a temperatura normal pero que es completamente inactiva a temperaturas elevadas. Una célula que transporte una de estas mutaciones sensibles a la temperatura muere a temperaturas elevadas, tenga o no histidina, ya que no puede transportar ninguna proteína al ER. Este hecho permite identificar el gen normal que fue modificado por la mutación, mediante la transfección de la célula mutante con un vector plasmídico de levadura en el que se han clonado fragmentos al azar de DNA genómico: el fragmento específico de DNA que recupera la célula mutante cuando se hace crecer a una temperatura elevada será el que codifica la versión salvaje del gen mutante.

desde el citosol (incluyendo a los propios translocadores específicos del ER). Lo mismo es válido para mitocondrias, plastidios y peroxisomas (véase la Figura 12–6).

Así, parece que la información necesaria para construir un orgánulo no reside exclusivamente en el DNA que especifica las proteínas del orgánulo. También se requiere la información en forma de al menos una proteína característica de cada una de las proteínas de membrana del orgánulo; esta información es transmitida desde la célula progenitora a las células de la progenie en forma del propio orgánulo. Probablemente esta información es esencial para la propagación de la organización celular en compartimientos, al igual que la información del DNA es esencial para la propagación de las secuencias celulares de nucleótidos y de aminoácidos.

Sin embargo, como se expone con mayor detalle en el Capítulo 13, el ER produce de forma constante una corriente de vesículas de membrana que sólo incorporan un subconjunto de proteínas del ER, por tanto con una composición diferente a la del propio ER. De manera similar, la membrana plasmática constantemente produce varios tipos de vesículas endocíticas especializadas. De este modo, se pueden formar algunos orgánulos a partir de otros orgánulos y no es necesario que se hereden en el proceso de división celular.

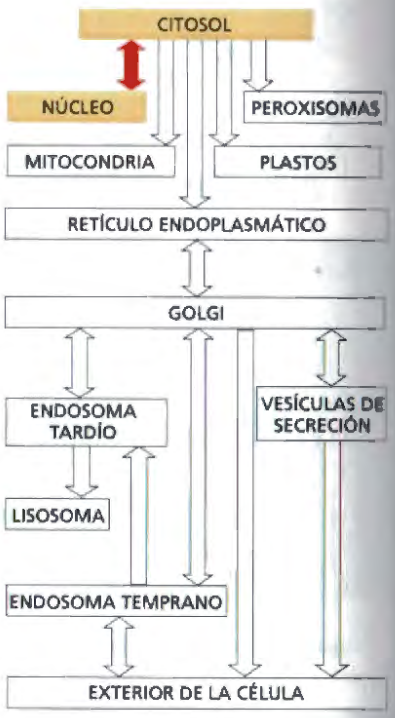
Resumen

Las células eucariotas contienen membranas intracelulares que encierran casi la mitad de su volumen total en compartimientos intracelulares individualizados llamados orgánulos. En todas las células eucariotas, los principales tipos de orgánulos son el retículo endoplasmático, el complejo de Golgi, el núcleo, las mitocondrias, los lisosomas, los endosomas y los peroxisomas; las células vegetales además contienen plastidios, como por ejemplo los cloroplastos. Cada orgánulo contiene proteínas características que desarrollan sus funciones características.

Cada nueva proteína de un orgánulo debe encontrar su camino desde el ribosoma donde ha sido sintetizada hasta el orgánulo donde actuará. Lo consigue siguiendo una vía específica, guiada por señales de clasificación que se encuentran en su secuencia de aminoácidos y que actúan como secuencias señal o como regiones señal. Las secuencias señal son reconocidas por receptores de clasificación complementarios que entregan la proteína en los orgánulos de destino. Las proteínas que actúan en el citosol no presentan secuencias o regiones señal y, por lo tanto, permanecen en el citosol después de ser sintetizadas.

Durante la división celular, los orgánulos como el ER y la mitocondria se distribuyen intactos entre las células hijas. Estos orgánulos contienen información necesaria para su construcción, lo que impide que puedan reconstruirse de novo.

TRANSPORTE DE MOLÉCULAS ENTRE EL NÚCLEO Y EL CITOSOL



La **envoltura nuclear** encierra el DNA y define el *compartimiento nuclear*. Esta envoltura está formada por dos membranas concéntricas que están perforadas por complejos de poro nuclear (**Figura 12–8**). A pesar de que la membrana nuclear interna y la externa son, de hecho, un continuo, presentan una composición proteica diferente. La **membrana nuclear interna** contiene proteínas que actúan como lugares de anclaje específicos de la cromatina y de la *lámina nuclear*, una red proteica que aporta soporte estructural a la envoltura nuclear. La membrana nuclear interna está rodeada por la **membrana nuclear externa**, que es continua con la membrana del ER. Como en el caso de la membrana del ER (trataremos de ella posteriormente), la membrana nuclear externa está tapizada por ribosomas que realizan la síntesis de proteínas. Las proteínas producidas por estos ribosomas son transportadas al espacio que queda entre las membranas nuclear interna y externa (el *espacio perinuclear*), el cual, a su vez, es continuo con el lumen del ER.

Existe un tráfico bidireccional continuo entre el citosol y el núcleo. La gran cantidad de proteínas que actúan en el núcleo –que incluye las histonas, las DNA y RNA polimerasas, las proteínas reguladoras de genes y las proteínas de procesamiento del RNA– son importadas de forma selectiva desde el citosol, donde son fabricadas, hasta el compartimiento nuclear. Al mismo tiempo, los tRNA y los mRNA son sintetizados en el compartimiento nuclear y luego son exportados al citosol. Al igual que el proceso de importación, el proceso de exportación también es selectivo; por ejemplo, los mRNA sólo son exportados si han sido modifi-

cados de forma correcta en el núcleo por reacciones de procesamiento de RNA. En algunos casos, el proceso de transporte es complejo. Por ejemplo, las proteínas ribosomales son fabricadas en el citosol e importadas al núcleo, donde se ensamblan con RNA ribosomales recién fabricados formando partículas. Estas partículas son exportadas de nuevo al citosol donde se ensamblan formando los ribosomas. Cada uno de estos pasos implica un transporte selectivo a través de la envoltura nuclear.

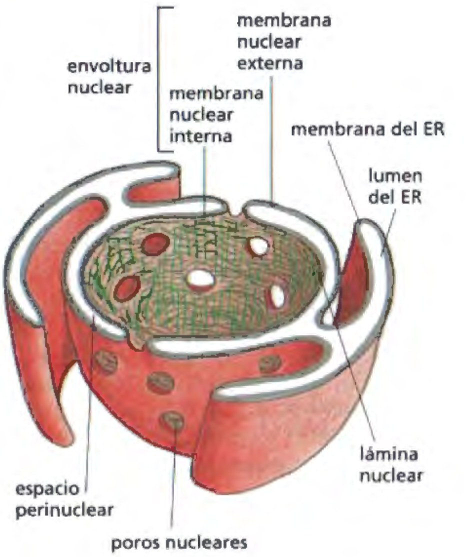


Figura 12–8 La envoltura nuclear. La doble membrana de la envoltura está atravesada por poros en los que se encuentran los NPC y es continua con el retículo endoplasmático. No se muestran los ribosomas que normalmente se hallan unidos a la cara citosólica de la membrana del ER y en la membrana externa del núcleo. La lámina nuclear es una red fibrosa que recubre la membrana nuclear interna.

Los complejos de poro nuclear atraviesan la envoltura nuclear

En todas las células eucariotas, la envoltura nuclear está perforada por elaboradas estructuras conocidas como **complejos de poro nuclear** (**NPC**: ***nuclear pore complexes***). En las células animales cada NPC tiene un peso molecular estimado de 125 millones de dalton y está formado por unas 30 proteínas diferentes o *nucleoporinas*, ordenadas según una sorprendente simetría octogonal (**Figuras 12–9**).

La envoltura nuclear de una célula típica de mamífero contiene entre 3000 y 4000 NPC y el tráfico que pasa a través de cada NPC es enorme: cada NPC puede transportar más de 500 macromoléculas por segundo y en ambos sentidos simultáneamente. No sabemos cómo puede coordinar el flujo de macromoléculas en ambos sentidos para evitar atascos y colisiones frontales.

Cada NPC contiene uno o más pasos acuosos a través de los cuales pueden difundir pasivamente pequeñas moléculas solubles en agua. Los investigadores han determinado que el tamaño efectivo de estos pasos inyectando en el citosol moléculas marcadas solubles en agua de diferentes tamaños y midiendo luego la velocidad de difusión hacia el núcleo. Las moléculas pequeñas (5000 dalton o menos) difunden con tanta rapidez que podemos considerar que la envoltura nuclear es libremente permeable a ellas. Sin embargo, las proteínas de mayor tamaño atraviesan los NPC con mucha más lentitud; cuanto mayor es una proteína más lentamente atraviesa los NPC. Las proteínas mayores de 60.000 dalton apenas pueden entrar en el núcleo por difusión pasiva. Parece que este tamaño límite para la difusión depende de la estructura de los NPC (**Figura 12–10**). Muchas proteínas NPC que recubren el poro central sólo contienen regiones desestructuradas que parecen formar un laberinto desordenado (semejantes a un banco de algas en el mar), bloqueando el paso de macromoléculas grandes pero dejando pequeños orificios que permiten la difusión de las moléculas pequeñas.

Dado que muchas proteínas celulares son demasiado grandes para difundir de forma pasiva a través de los NPC, el compartimiento nuclear y el citosol pueden mantener diferentes conjuntos de proteínas. Por ejemplo, los ribosomas citoplasmáticos maduros tienen un diámetro de unos 30 nm, por lo que no pueden difundir a través de los NPC de forma que la síntesis proteica quedará confinada en el citosol. Pero ¿cómo importa el núcleo las grandes moléculas que necesita, como las DNA y las RNA polimerasas cuyas subunidades tienen pesos moleculares de entre 100.000 y 200.000 dalton? Como explicaremos más adelante, éstas y muchas otras moléculas de proteína y de RNA se unen de forma específica a proteínas receptoras que los transportan activamente través de los NPC.

Las proteínas nucleares son dirigidas hacia el núcleo mediante señales de localización nuclear

Cuando las proteínas son experimentalmente extraídas del núcleo y reintroducidas de nuevo en el citosol, incluso las más grandes se vuelven a acumular en el núcleo de una forma eficiente. Ciertas señales de clasificación denominadas **señales de localización nuclear** son las responsables de este proceso de importación activo al núcleo. Estas señales se han definido con precisión utilizando la tecnología del DNA recombinante en numerosas proteínas y en proteínas que sólo entran en el núcleo de forma transitoria (**Figura 12–11**). En muchas proteínas, las señales consisten en una o dos secuencias cortas, ricas en los aminoácidos cargados positivamente lisina y arginina (véase Tabla 12–3, p. 702), con una secuencia precisa diferente de la de otras proteínas nucleares. Otras proteínas nucleares tienen señales diferentes, algunas de las cuales todavía no se han caracterizado.

Las señales de localización nuclear se localizan en casi en cualquier lugar de la secuencia de aminoácidos y parece que forman asas o parches en la superficie de las proteínas. Muchas de ellas actúan incluso cuando se unen como péptidos cortos a las cadenas latera-

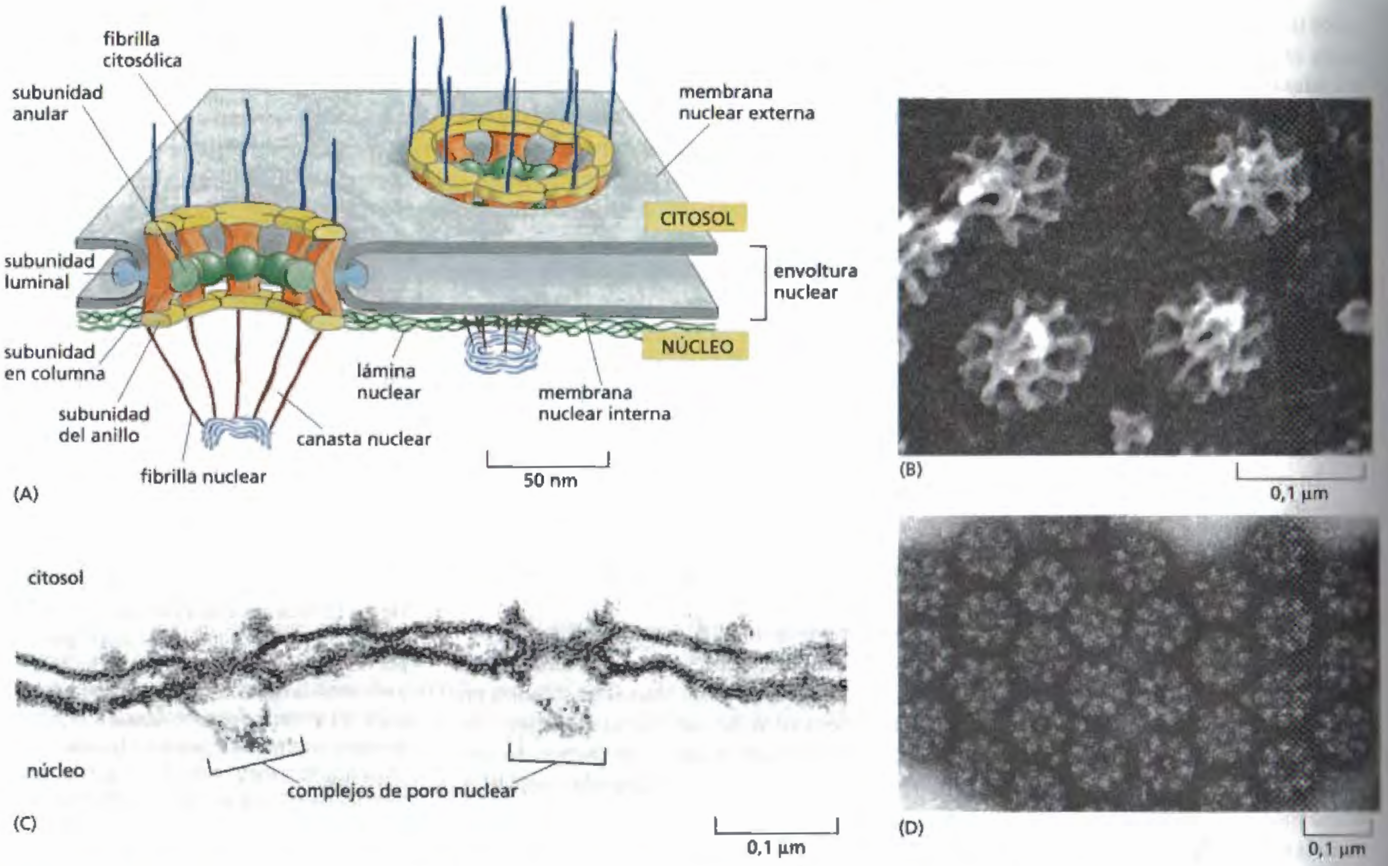


Figura 12-9 Disposición de los complejos de los NPC en la envoltura nuclear. (A) Esquema que muestra una pequeña región de la envoltura nuclear. En una sección transversal, el NPC parece estar formado por cuatro elementos: las subunidades en forma de columna, que forman el grueso de la pared del poro; las subunidades anulares, ubicadas en el centro; las subunidades luminales, que contienen proteínas transmembrana que anclan el complejo de poro a la membrana nuclear, y las subunidades del anillo, que forman las caras citosólica y nuclear del complejo. Además, existen fibrillas que sobresalen tanto desde la cara citosólica como desde la cara nuclear del NPC. En la parte nuclear, las fibrillas convergen formando estructuras en forma de cesta. Estudios de inmunolocalización en microscopía electrónica muestran que las proteínas que forman el núcleo del NPC se orientan simétricamente a través de la envoltura nuclear de forma que las caras nuclear y citosólica parecen idénticas. Por el contrario, las proteínas que forman las fibras son diferentes en el lado citosólico y el nuclear de los NPC. La simetría de ocho unidades centrada en un punto y de dos unidades centrada en un plano del núcleo de los NPC explica cómo puede formarse una enorme estructura con sólo unas 30 proteínas diferentes, ya que muchas de estas proteínas están presentes 16 copias (o múltiplos de 16). Los dominios desordenados del núcleo de las proteínas se extienden hacia el centro de los NPC (no mostrado), bloqueando la difusión pasiva de las grandes macromoléculas. (B) Una electromicrografía de barrido de la cara nuclear de la envoltura nuclear de un oocito (véase también la Figura 9–55). (C) Electromicroscopía de una sección ultrafina, en la que se muestra una vista lateral de dos NPC (*corchetes*), obsérvese que el interior y el exterior de las membranas nucleares son continuos en los bordes de los poros. (D) Esta electromicrografía muestra una imagen frontal de NPC teñidos negativamente. Se ha eliminado la membrana mediante extracción con detergentes. Obsérvese que algunos de los NPC contienen material en el centro; se cree que son macromoléculas en tránsito por estos NPC. (B, de M.W. Goldberg y T.D. Allen, *J. Cell Biol.* 119:1429-1440, 1992. Con la autorización de The Rockefeller University Press; C, cortesía de Werner Franke y Ulrich Scheer; D, cortesía de Ron Milligan.)

les de lisina de la superficie de proteínas citosólicas, lo que sugiere que la localización precisa de la señal dentro de la secuencia de aminoácidos no es importante. Además, mientras una de las subunidades de un complejo formado por muchos componentes presente una señal de localización nuclear, todo el complejo será importado al núcleo.

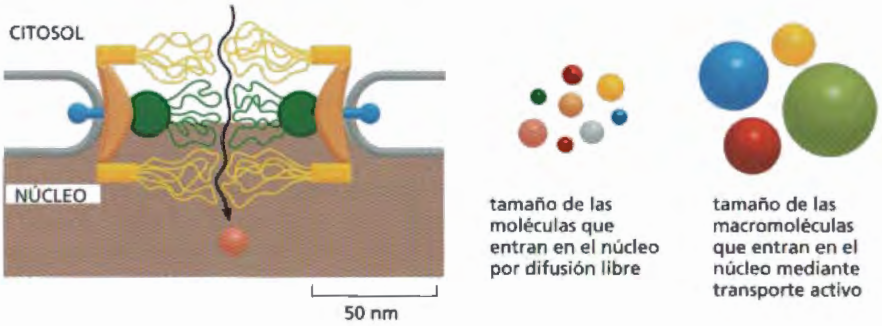


Figura 12-10 Un modelo para la difusión regulada por barrera del NPC. El dibujo muestra una vista lateral de un NPC. Las regiones desestructuradas de las proteínas que revisten el poro central forman una maraña, que bloquea la difusión pasiva de las grandes macromoléculas. Sin embargo, durante el transporte activo pueden pasar por el NPC incluso partículas de hasta 39 nm de diámetro.

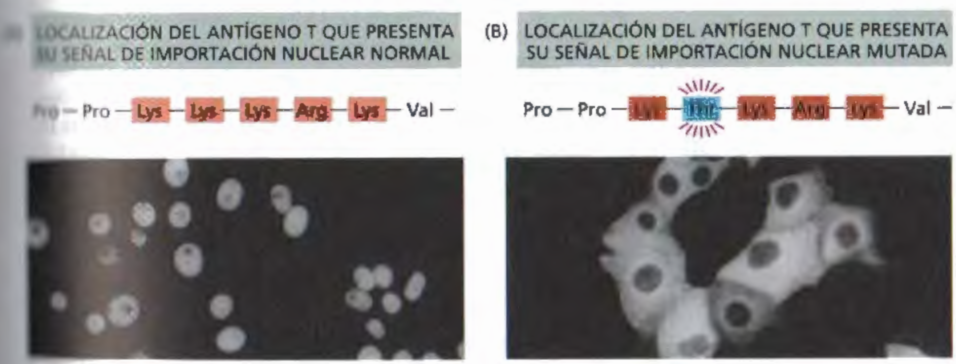


Figura 12-11 Función de una señal de localización nuclear. Micrografías obtenidas por inmunofluorescencia que muestran la localización en la célula del antígeno T del SV40 conteniendo o no una corta secuencia que actúa como señal de localización nuclear. (A) La forma normal de la proteína del antígeno T contiene la secuencia rica en lisina que se indica y que es importada a su lugar de acción en el núcleo, como se demuestra mediante una tinción inmunofluorescente con anticuerpos contra el antígeno T. (B) Si el antígeno T presenta una señal de localización nuclear alterada (una treonina que reemplaza a una lisina) permanece en el citosol. (De D. Kalderon, B. Roberts, W. Richardson y A. Smith, *Cell* 39:499-509, 1984. Con la autorización de Elsevier.)

Podemos visualizar el transporte activo de proteínas nucleares a través de los NPC recubriendo partículas de oro coloidal con una señal de localización nuclear, inyectando estas partículas en el citosol y siguiendo su destino mediante la técnica de microscopía electrónica (**Figura 12-12**). El transporte empieza cuando las partículas se unen a unas fibrillas semejantes a tentáculos que sobresalen hacia el citoplasma desde el borde del NPC y después se produce por el centro del NPC. Probablemente las regiones desestructuradas de las proteínas del NPC, que forman una barrera a la difusión de las grandes moléculas (que ya hemos mencionado), se separan y permiten que la partícula de oro pase a su través

El transporte de macromoléculas a través de los NPC se diferencia del transporte de proteínas a través de las membranas de otros orgánulos en que ocurre a través de un gran poro acuoso en lugar de a través de un transportador proteico que atraviesa una o más bicapas lipídicas. Por esta razón, a través de los NPC se pueden transportar las proteínas nucleares plegadas por completo y las subunidades de los ribosomas son transportadas hacia fuera del núcleo en forma de partículas ensambladas. Por el contrario, para poder ser transportadas a otros orgánulos, las proteínas tienen que estar desplegadas en su totalidad, como veremos más adelante. Sin embargo, imágenes de microscopía electrónica de partículas muy grandes atravesando los NPC parecen indicar que estas partículas se comprimen a medida que pasan por el poro, lo cual indica que se reestructuran durante el transporte. Como se describe en el Capítulo 6, la exportación de algunos mRNA muy grandes se ha observado con detalle (véase la Figura 6-39).

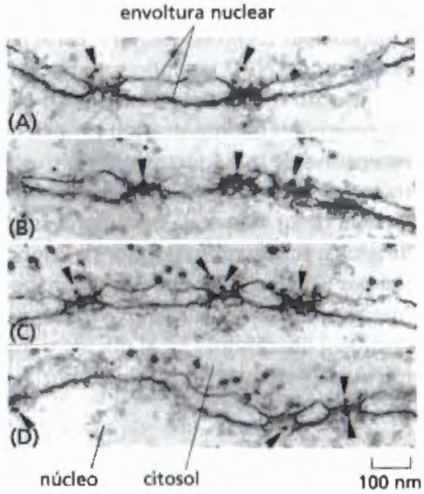


Figura 12-12 Observación de la importación activa a través del NPC. Esta serie de electromicrografías muestra esferas de oro coloidal *(puntas de flecha)* recubiertas con péptidos que contienen señales de localización nuclear entrando en el núcleo a través de los NPC. Las partículas de oro coloidal se inyectaron en el interior de células vivas, que fueron fijadas y preparadas para ser estudiadas con el microscopio electrónico a varios tiempos después de la inyección. (A) Las partículas de oro se ven primero en la proximidad de las fibras citosólicas del NPC. (B, C) Después migran hacia el centro de los NPC, donde primero sólo se ven en la cara citosólica. (D) Posteriormente aparecen en la cara nuclear. Estas partículas de oro coloidal tienen un diámetro mucho mayor que el canal de difusión del NPC y deben ser transportadas mediante transporte activo. (De N. Panté y U. Aebi, *Science* 273:1729-1732, 1996. Con la autorización de AAAS.)

Los receptores de importación nuclear se unen tanto a señales de localización nuclear como a proteínas NPC

Para que se inicie el transporte hacia el núcleo, muchas secuencias de localización nuclear han de ser reconocidas por **receptores de importación nuclear**, codificados por una familia de genes relacionados entre sí. Cada uno de los miembros de esta familia codifica una proteína receptora que está especializada en el transporte de un subconjunto de proteínas de carga –las que contienen señales de localización nuclear a las que se puede unir dicho receptor (**Figura 12-13**A).

Los receptores de importación son proteínas citosólicas solubles que se unen tanto a las secuencias de localización nuclear de la proteína que va a ser transportada como a proteínas NPC, algunas de las cuales forman las fibrillas que se introducen en el citosol. Estas fibrillas y muchas otras proteínas NPC, que recubren el centro del NPC y contribuyen a formar la barrera de difusión, incluyen un gran número de cortas secuencias repetidas de aminoácidos ricos en fenilalanina y glicina, por lo que se denominan *repeticiones FG* (a partir del código de una letra de los aminoácidos, que se describe en el Capítulo 3). Las repeticiones FG actúan como lugares de unión de los receptores de importación. Se cree que marcan el camino que siguen a través del NPC los receptores de importación y las proteínas que transportan. Estos complejos receptor-carga se desplazan a través de la vía de transporte mediante ciclos repetidos de unión, disociación y nueva unión, a secuencias FG repetidas adyacentes. De esta forma, los complejos saltan de una proteína NPC a otra para atravesar el laberíntico interior del NPC. Una vez en el interior del núcleo, los receptores de importación se separan de su carga y vuelven al citosol.

Los receptores de importación no siempre se unen directamente a las proteínas nucleares. En ocasiones participan proteínas adaptadoras adicionales que forman un puente

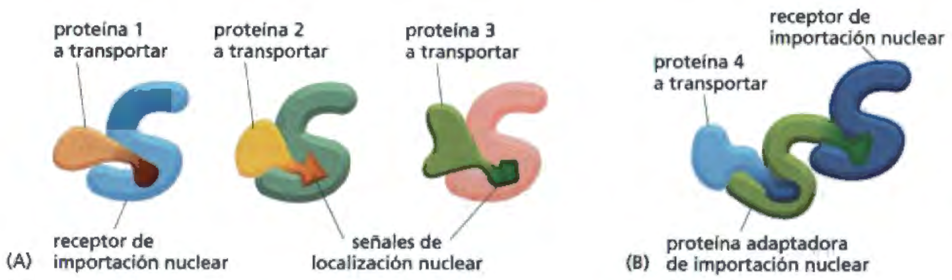


Figura 12–13 Receptores de importación al núcleo. (A) Muchos receptores de importación nuclear se unen tanto a los NPC como a las secuencias de localización nuclear sobre las proteínas que son transportadas. En este ejemplo, las proteínas transportadas 1, 2 y 3 contienen diferentes señales de localización nuclear y, por lo tanto, se unen a diferentes receptores nucleares de importación. (B) La proteína transportada 4 precisa de una proteína adaptadora para unirse a su receptor de importación nuclear. Los adaptadores están relacionados desde un punto de vista estructural con los receptores de importación nuclear y reconocen señales de localización nuclear en proteínas a transportar. También contienen señales de localización nuclear que les permiten unirse a un receptor de importación.

entre el receptor de importación y la proteína que va a ser transportada (Figura 12–13B). Algunas proteínas adaptadoras están relacionadas estructuralmente con los receptores de importación, lo que sugiere un origen evolutivo común. Utilizando varios receptores de importación y proteínas adaptadoras diferentes, las células reconocen el amplio repertorio de secuencias de localización nuclear que presentan las proteínas nucleares.

La exportación del núcleo funciona como la importación, pero en el sentido opuesto

La exportación nuclear de grandes moléculas, tales como las subunidades ribosomales y las moléculas de RNA, se realiza a través de los NPC, y también depende de un sistema selectivo de transporte. El sistema de transporte se basa en la presencia de **señales de exportación nuclear** en las moléculas a exportar, así como en la existencia de **receptores de exportación nuclear** complementarios. Estos receptores se unen a las señales de exportación y a las proteínas del NPC, guiando su carga a través del NPC hasta el citosol.

Muchos receptores nucleares de exportación están relacionados estructuralmente con los receptores de importación al núcleo y están codificados por la misma familia génica de **receptores de transporte nuclear**, o *carioferinas*. En la levadura hay 14 genes que codifican miembros de esta familia; en las células animales, el número es significativamente superior. A partir de su secuencia de aminoácidos no es posible deducir si un miembro de esta familia génica actúa como receptor de importación o de exportación nuclear. Como era de esperar, por lo tanto, los sistemas de transporte en la importación y en la exportación actúan de manera similar pero en sentido opuesto: los receptores de importación se unen a su carga en el citosol liberándola en el núcleo y son exportados hacia el citosol para su reutilización, mientras que los receptores de exportación funcionan de manera opuesta.

La GTPasa Ran impone una direccionalidad en el transporte a través de los NPC

La importación de las proteínas nucleares a través de los NPC concentra determinadas proteínas en el núcleo y aumenta así el orden en la célula. La célula obtiene la energía necesaria para este proceso a través de hidrólisis de GTP por la GTPasa monomérica **Ran**. Ran se encuentra tanto en el citosol como en el núcleo, y es necesaria para la importación y para la exportación nuclear.

Como otras GTPasas, la proteína Ran es un interruptor molecular que existe en dos estados conformacionales, dependiendo de si está unida a GDP o a GTP (se describe en el Capítulo 3). Dos proteínas reguladoras específicas de Ran disparan la transformación entre estos dos estados: una *proteína citosólica activadora de GTPasa* (*GAP: GTPase activating protein*), que induce la hidrólisis de GTP convirtiendo Ran-GTP en Ran-GDP, y un *factor nuclear intercambiador de guanina* (*GEF: guanine exchange factor*) que activa el intercambio de GDP por GTP convirtiendo Ran-GDP en Ran-GTP. Dado que *Ran-GAP* se localiza en el citosol y *Ran-GEF* en el núcleo, el citosol contiene sobre todo Ran-GDP y el núcleo Ran-GTP (**Figura 12–14**).

Este gradiente de las dos formas conformacionales de Ran dirige el transporte nuclear en la dirección apropiada (**Figura 12–15**). Por ejemplo, la unión de los receptores de importación a las repeticiones FG en la cara citosólica del NPC, se produce tanto cuando el receptor está unido a su carga como cuando está libre. Los receptores de importación saltan de una repetición FG a otra. Si alcanzan la cara nuclear del complejo de poro, Ran-GTP se une

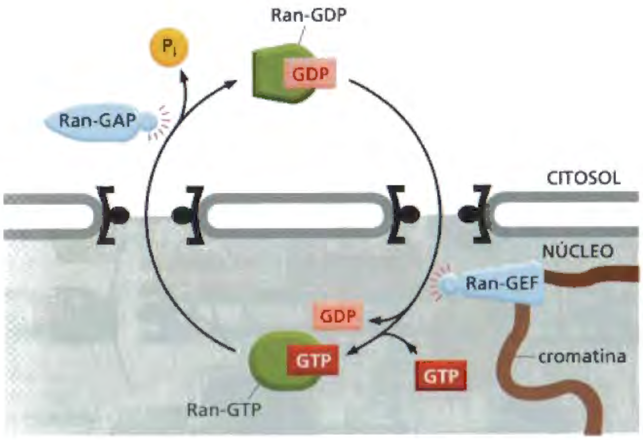


Figura 12–14 La compartimentación de Ran-GDP y Ran-GTP. La localización de Ran-GDP en el citosol y de Ran-GTP en el núcleo es consecuencia de la localización de dos proteínas reguladoras de Ran: la proteína activadora de la actividad GTPasa de Ran (Ran-GAP) que se localiza en el citosol, y el factor intercambiador de guanina de Ran (Ran-GEF), que se encuentra unido a la cromatina y que, por lo tanto, se encuentra en el núcleo.

a ellos y si llegan cargados con alguna molécula, la unión de Ran-GTP hace que los receptores de importación liberen su carga (**Figura 12–16**). Dado que en el citosol Ran-GDP no se une a los receptores cargados, la descarga únicamente se produce en la cara nuclear de los NPC. De esta forma, la localización nuclear de Ran-GTP da lugar a la direccionalidad.

Una vez que se libera la carga en el núcleo, el receptor de importación vacío unido a Ran-GTP es devuelto al citosol a través del complejo de poro. Allí, Ran-GAP activa a Ran-GTP y que hidrolice el GTP al que está unido, transformándose en Ran-GDP; entonces, el receptor de importación está de nuevo listo para otro ciclo de importación nuclear.

La exportación nuclear se realiza mediante un mecanismo similar, excepto que Ran-GTP en el núcleo favorece la unión de la carga a los receptores de exportación en lugar de disociarlos de ella. Cuando el receptor de exportación se desplaza a través del poro hacia el citosol, su Ran-GTP encuentra una Ran-GAP e hidroliza su GTP. Como resultado de ello, el receptor de exportación libera su carga y la Ran-GDP en el citosol. Los receptores de exportación vacíos son devueltos entonces al núcleo y completan el ciclo (véase la Figura 12–15).

El transporte a través de los NPC se regula controlando el acceso a la maquinaria transportadora

Algunas proteínas, como las que se unen a los mRNA recién sintetizados en el núcleo, presentan tanto señales de localización nuclear como señales de exportación del núcleo. Estas

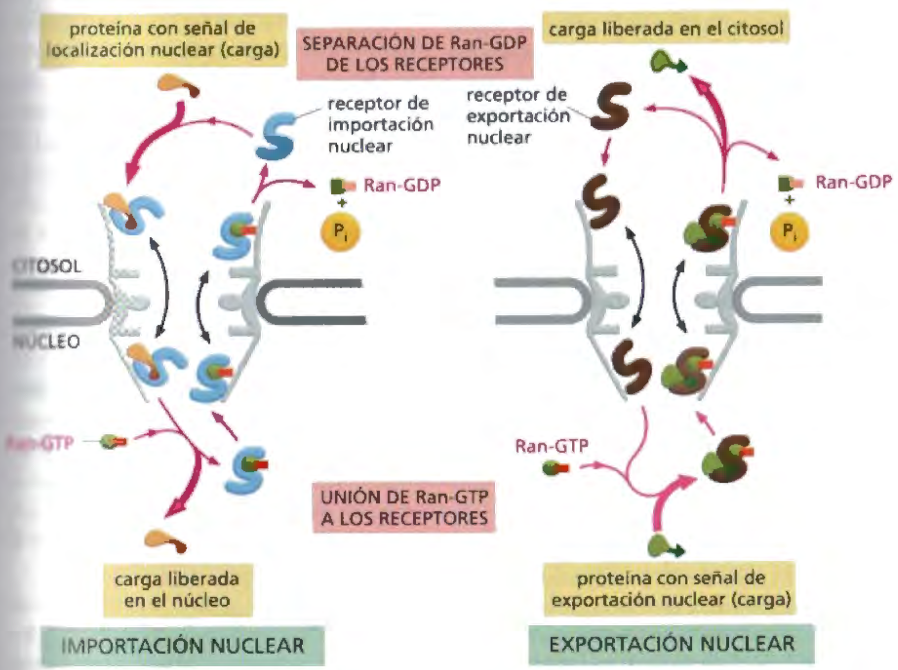


Figura 12–15 Modelo que explica cómo la hidrólisis de GTP por Ran en el citosol dirige el transporte nuclear. El desplazamiento, a través del NPC, de receptores de transporte nuclear cargados se produce a lo largo de las repeticiones FG que presentan ciertas proteínas NPC. La localización diferencial de Ran-GTP en el núcleo y de Ran-GDP en el citosol aporta direccionalidad (*flechas rojas*) tanto a la importación nuclear (*izquierda*) como a la exportación nuclear (*derecha*). Ran-GAP estimula la hidrólisis de GTP para producir Ran-GDP en el lado citosólico del NPC (véase la Figura 12–14).

Ran-GDP es importado al núcleo por su propio receptor de importación, específico para la conformación de Ran unida a GDP. El receptor Ran-GDP no está relacionado estructuralmente con las principales familias de receptores de transporte nuclear. Sin embargo, también se une a repeticiones de FG en proteínas de NPC y salta al otro lado del NPC.

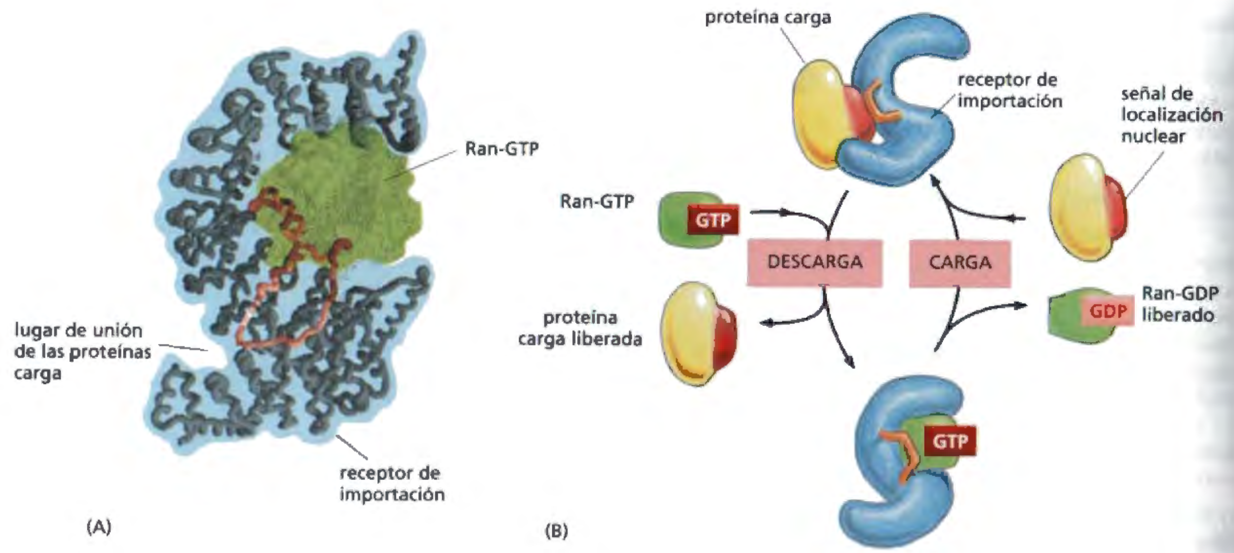


Figura 12–16 La unión de Ran-GTP puede provocar la liberación de la carga por el receptor de importación. (A) Estructura de los receptores de transporte nuclear que unen Ran-GTP. Los receptores están formados por motivos helicoidales α repetidos que se agrupan uno encima de otro, formando estructuras flexibles en forma de arco, que pueden adoptar varias conformaciones en respuesta a las proteínas de carga o a Ran-GTP. Obsérvese que las proteínas de carga y Ran-GTP se unen a varias regiones diferentes del arco. Ran-GTP está recubierto parcialmente por un bucle conservado (*rojo*) del receptor, que se cree que es importante para la unión de la carga cuando el receptor no está unido a Ran. (B) Ciclo de carga en el citosol y de descarga en el núcleo de un receptor de importación nuclear. (A, adaptado de Y.M. Chook y G. Blobel, *Nature* 399: 230-237, 1999. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

proteínas se desplazan de forma constante entre el núcleo y el citosol. La distribución en un momento dado de estas *proteínas lanzadera* dependerá de la relación entre sus velocidades de exportación y de importación al núcleo. Si la velocidad de importación es superior a la de exportación, se encontrarán sobre todo en el núcleo. Por el contrario, si la velocidad de exportación supera a la de importación, se encontrarán fundamentalmente en el citosol. Así pues, cambios en las velocidades de importación, de exportación o de ambas cambian la localización de la proteína.

Algunas proteínas lanzadera se desplazan de forma constante hacia dentro y fuera del núcleo. En otros casos, sin embargo, su transporte está estrictamente controlado. Como se describe en el Capítulo 7, las células controlan la actividad de algunas proteínas de regulación génica manteniéndolas fuera del núcleo hasta que son necesarias en dicho compartimiento (**Figura 12–17**). En muchos casos, las células controlan el transporte regulando las señales de localización y de exportación nucleares; éstas pueden ser activadas o inactivadas, mediante fosforilación de aminoácidos cercanos a las secuencias señal (**Figura 12–18**).

Otras proteínas de regulación génica se unen a proteínas citosólicas inhibidoras que las retienen en el citosol (probablemente mediante interacciones con el citoesqueleto o con orgánulos específicos) o enmascaran sus señales de localización nuclear impidiendo que interactúen con los receptores de importación nuclear. Un estímulo apropiado libera la proteína de regulación génica de su anclaje citosólico o de la proteína que lo enmascaraba, por lo que ahora será transportada al núcleo. Un ejemplo importante al respecto es la proteína reguladora latente que controla la expresión de los genes implicados en el metabolismo del colesterol. La proteína es producida y almacenada en una forma inactiva como una proteína transmembrana en el ER. Cuando se produce una carencia de colesterol, la proteína sale del ER hasta el complejo de Golgi, donde encuentra unas proteasas específicas que la cortan y liberan su dominio citosólico en el citosol. Este dominio es importado al núcleo donde activa la transcripción de genes necesarios tanto para la adquisición de colesterol como para su síntesis.

Como se explica con detalle en el Capítulo 6, las células controlan la exportación del mRNA desde el núcleo de una manera similar. Las proteínas que guían el mRNA hasta el exterior del núcleo se cargan sobre el RNA de forma que tiene lugar su síntesis y su maduración. Una vez alcanzan el citosol, las proteínas se separan del RNA y vuelven rápidamente al núcleo. Otros RNA, como los snRNA y los tRNA, son exportados por diferentes receptores de exportación nuclear.



Figura 12–17 Control del transporte nuclear en el embrión de la mosca. La proteína reguladora génica *dorsal* se expresa uniformemente en todo este embrión temprano de *Drosophila*, que se muestra en una sección transversal. La proteína ha sido teñida con una enzima acoplada a un anticuerpo que da lugar a un producto marrón. Sólo es activo en las células del lado ventral (*abajo*) del embrión, donde se encuentra en el núcleo. (Cortesía de Siegfried Roth.)

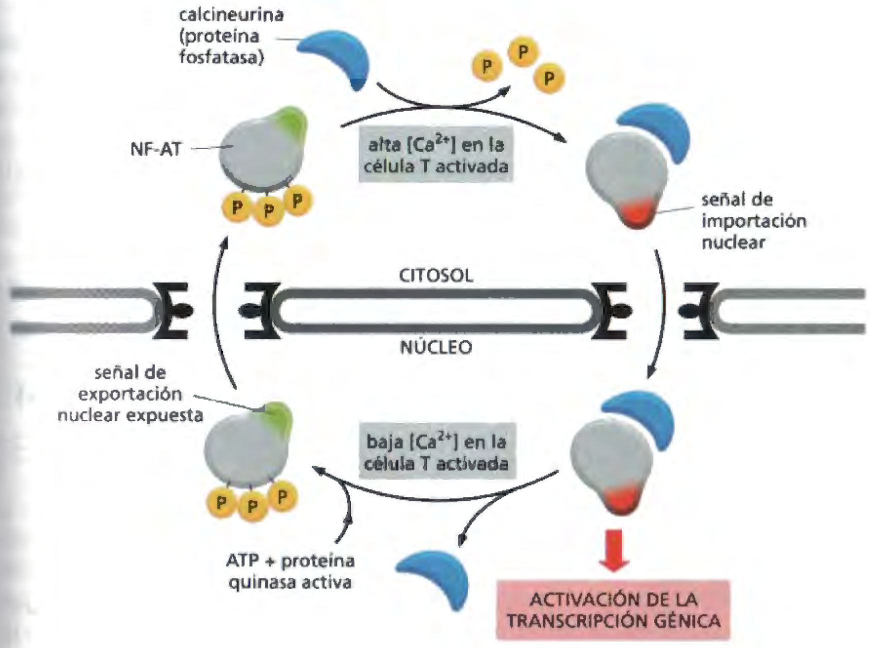


Figura 12–18 Control de la importación nuclear durante la activación de la célula T. <AGTT> El factor nuclear de las células T activadas (NF-AT: ***n**uclear **f**actor of **a**ctivated **T** cells*) es una proteína reguladora de genes que, en la célula en reposo, se encuentra en el citosol en un estado fosforilado. Cuando las células T están activadas por antígenos extraños (se explica en el Capítulo 25), aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular. A elevadas concentraciones de Ca^{2+}, la proteína fosfatasa calcineurina se une a NF-AT y se desfosforila. La desfosforilación deja expuestas señales de importación nuclear y oculta una señal de exportación del núcleo. El complejo formado por NF-AT y calcineurina es importado al núcleo, donde NF-AT activa la transcripción de varios genes que codifican proteínas de membrana necesarias para la activación de las células T.

La respuesta cesa cuando disminuyen los niveles de Ca^{2+}, liberando NF-AT a partir de calcineurina. La refosforilación de NF-AT inactiva las señales de importación nuclear, vuelve a exponer la señal nuclear de exportación y provoca que el NF-AT pase al citosol. Algunos de los medicamentos inmunosupresores más potentes, incluyendo la ciclosporina A y FK506, inhiben la capacidad de la calcineurina para desfosforilar NF-AT y de esta manera bloquean la acumulación nuclear de NF-AT y la activación de la célula T.

La envoltura nuclear se desorganiza durante la mitosis

La **lámina nuclear**, localizada sobre la cara nuclear de la membrana nuclear interna, es una red de subunidades proteicas interconectadas, denominadas **laminas nucleares**. Las laminas son un tipo especial de filamentos intermedios (descrito en el Capítulo 16) que polimerizan formando una red bidimensional (**Figura 12–19**). La lámina nuclear da forma y estabilidad a la envoltura nuclear, a la cual se halla anclada por la unión de los NPC y proteínas integrales de membrana de la membrana nuclear interna. La lámina también interacciona directamente con la cromatina, que a su vez lo hace con proteínas integrales de la membrana nuclear interna. Junto con la lámina, estas proteínas internas de membrana actúan como unión estructural entre el DNA y la envoltura nuclear.

Cuando el núcleo se desorganiza durante la mitosis, la lámina nuclear se despolimeriza. El desensamblaje es debido, al menos parcialmente, a la fosforilación directa de las laminas nucleares por acción de la quinasa dependiente de ciclina Cdk que es activada al inicio de la mitosis (descrito en el Capítulo 16). Al mismo tiempo, diferentes proteínas de la membrana nuclear interna son fosforiladas y los NPC se desensamblan y se dispersan por el citosol. Durante este proceso algunas proteínas NPC se unen a los receptores de importación nuclear, que desempeñan un papel importante en el reensamblaje de los NPC al final de la mitosis. Las proteínas de membrana de la envoltura nuclear –que ya no están unidas a los complejos de poro, cromatina o lámina nuclear– se dispersan a través de la membrana del RE. La proteína motor dineína, que se desplaza a lo largo de los microtúbulos (se describe en el Capítulo 17), participa de forma activa en separar la envoltura nuclear de la cromatina. En conjunto, estos procesos rompen las barreras que normalmente separan el núcleo y el citosol, de forma que las proteínas nucleares, que ya no están unidas ni a las membranas ni a los cromosomas, se diluyen en el citosol de la célula en división (**Figura 12–20**).

Al final de la mitosis, la envoltura nuclear se reorganiza sobre la superficie de los cromosomas. Además de su papel crucial en el transporte nuclear, Ran-GTPasa también actúa como marcador posicional para la cromatina durante la división celular, cuando los componentes del núcleo y del citosol están mezclados. Dado que Ran-GEF permanece unida a la cromatina después de que la envoltura nuclear se haya roto, las moléculas de Ran cercanas a la cromatina están fundamentalmente unidas a GTP en su conformación. Por el contrario, las moléculas de Ran alejadas tienen una gran facilidad de encontrarse con Ran-GAP, que está distribuida por el citosol, por lo que estas moléculas de Ran están sobre todo unidas a GDP en su conformación.

Por lo tanto, la cromatina de las células mitóticas está rodeada por una capa de Ran-GTP. Esta capa desplaza localmente los receptores de importación nuclear de las proteínas NPC, que empiezan el proceso de ensamblaje de los NPC unidos a la superficie de los cromosomas. Al mismo tiempo, las proteínas de la membrana nuclear interna y las laminas

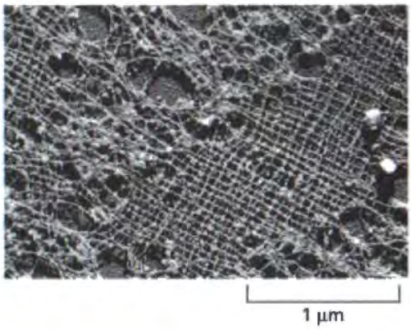


Figura 12–19 La lámina nuclear. Electromicrografía de una porción de la lámina nuclear en un oocito de *Xenopus* preparado por sublimación y sombreado metálico. La lámina está formada por una red regular de filamentos intermedios especializados. (Cortesía de Ueli Aebi.)

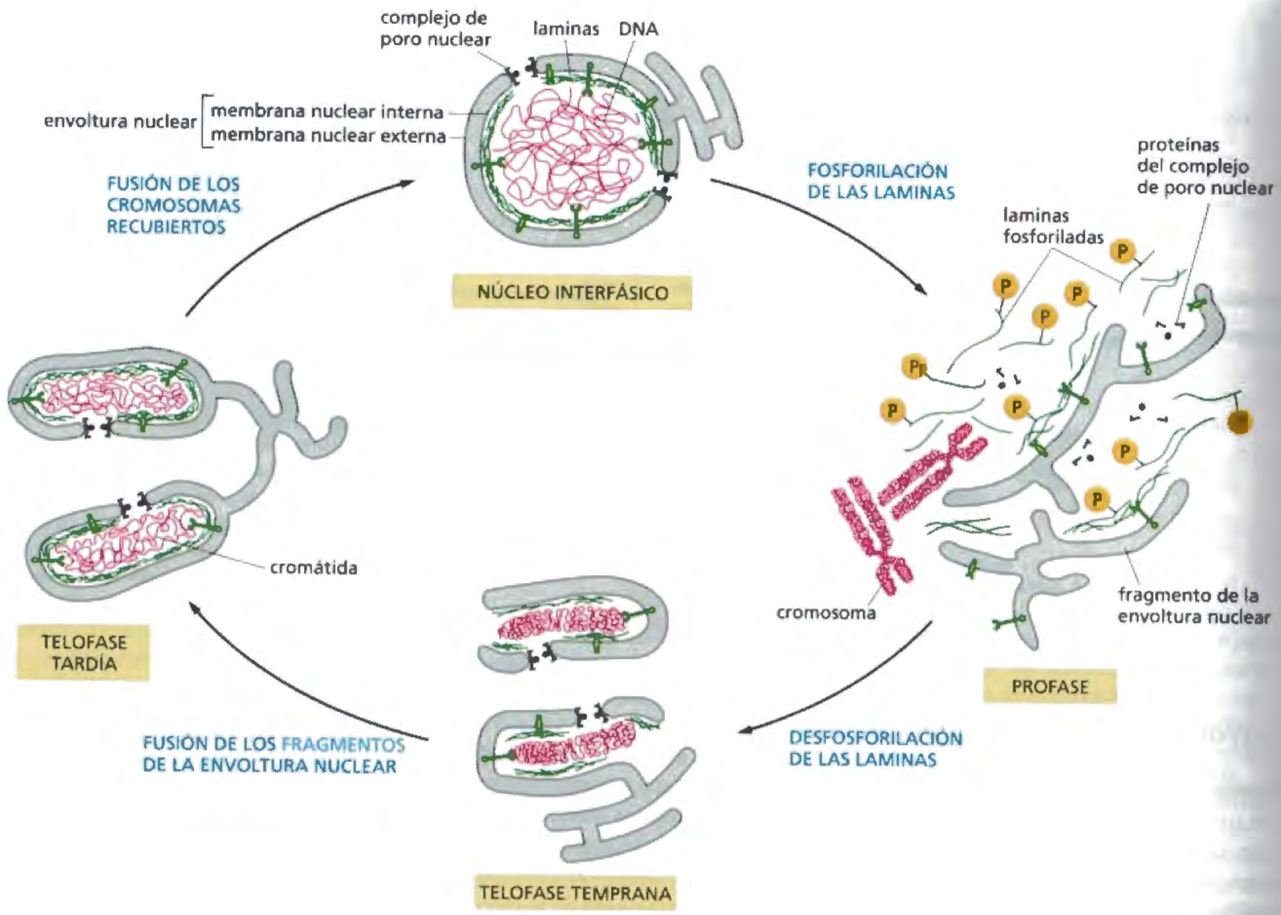


Figura 12-20 Rotura y nueva formación de la envoltura nuclear durante la mitosis. La fosforilación de las laminas induce el desensamblaje de la lámina nuclear, que contribuye a la rotura de la envoltura nuclear. Se cree que la desfosforilación de las laminas facilita la reversión de este proceso. Algunas nucleoporinas y proteínas del interior de la membrana nuclear siguen un ciclo análogo de fosforilación y desfosforilación; algunas de estas desfosforilaciones también participan en el proceso de reensamblaje mostrado.
Como ya hemos indicado, inicialmente la envoltura nuclear se repliega alrededor de las cromátidas descondensadas. Por último, cuando progresa la descondensacion, estas estructuras se funden formando un solo núcleo completo.

desfosforiladas se unen de nuevo a la cromatina. Las membranas del ER rodean grupos de cromosomas y continúan fusionándose hasta que se forma de nuevo una envoltura nuclear completa. Durante este proceso, los NPC inician la reimportación activa de proteínas que presentan secuencias de localización nuclear. Dado que inicialmente la nueva envoltura nuclear está situada muy cerca de la superficie de los cromosomas, al formarse el núcleo de nuevo excluye todas las proteínas de la célula excepto aquellas que están unidas a los cromosomas mitóticos y las que son importadas de forma selectiva a través de los NPC. De esta forma, todas las demás proteínas grandes se mantienen fuera del nuevo núcleo.

Las señales de localización nuclear no son eliminadas después del transporte hacia el núcleo, probablemente porque las proteínas nucleares tienen que ser importadas al núcleo varias veces después de cada división celular. Por el contrario, cuando una molécula de proteína ha sido importada a cualquier otro orgánulo rodeado de membrana, se transmite de generación a generación en el interior del compartimiento y no necesita ser translocada de nuevo. En este caso, por lo general la secuencia señal de estas moléculas es eliminada después de la translocación proteica.

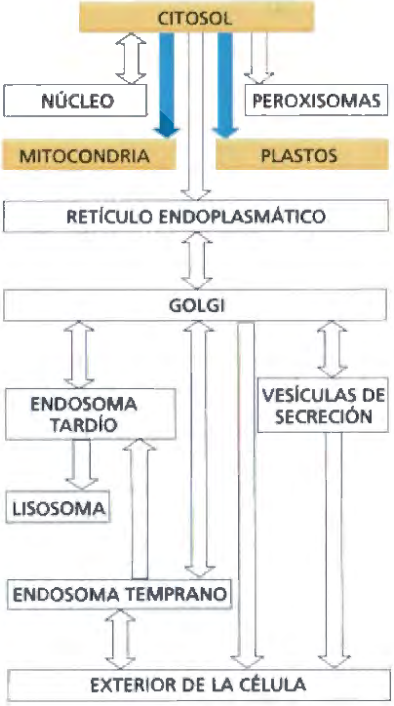
Como se expone en el Capítulo 17, la capa de Ran-GTP que envuelve la cromatina también es importante en el ensamblaje del huso mitótico en una célula en división.

Resumen

La envoltura nuclear está formada por una membrana nuclear interna y otra externa. La membrana nuclear externa es continua con la membrana del ER; el espacio entre ésta y la membrana nuclear interna es continuo con el lumen del ER. Las moléculas de RNA, que son fabricadas en el núcleo, y las subunidades ribosomales que son ensambladas también en el núcleo, son exportadas al citosol; por el contrario, todas las proteínas que son funcionales en el núcleo han sido sintetizadas en el citosol e importadas. El intenso tráfico de materiales entre el núcleo y el citosol tiene lugar a través de los complejos de poro nuclear (NPC) que proporcionan una vía de paso a través de la envoltura nuclear. Las moléculas pequeñas difunden pasivamente a través de los NPC, pero las grandes macromoléculas deben ser transportadas de forma activa.

Las proteínas que presentan señales de importación nuclear son transportadas de forma activa hacia el núcleo a través de los NPC mientras que las moléculas de RNA y las subunidades ribosomales recién fabricadas contienen señales de exportación nuclear que dirigen su transporte activo hacia fuera, a través de los NPC. Algunas proteínas, incluyendo los receptores de importación y los de exportación, viajan continuamente entre el citosol y el núcleo. La Ran-GTPasa aporta tanto la energía libre como la direccionalidad al transporte nuclear. Las células regulan el transporte de las proteínas nucleares y de las moléculas de RNA a través de los NPC controlando el acceso de estas moléculas a la maquinaria de transporte. Dado que las secuencias de localización nuclear no son eliminadas, las proteínas nucleares pueden ser importadas varias veces, tal como se requiere cada vez que el núcleo se reorganiza después de la mitosis.

TRANSPORTE DE PROTEÍNAS AL INTERIOR DE MITOCONDRIAS Y CLOROPLASTOS



Las mitocondrias y los cloroplastos son orgánulos rodeados por una doble membrana (se describe en el Capítulo 14). Están especializadas en la síntesis de ATP utilizando la energía producida mediante el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa en las mitocondrias, y mediante la fotosíntesis en los cloroplastos. A pesar de que ambos orgánulos contienen su propio DNA, sus ribosomas y otros componentes necesarios para la síntesis proteica, la mayoría de sus proteínas están codificadas en el núcleo celular y son importadas desde el citosol. Cada proteína importada tiene que alcanzar el subcompartimiento determinado en el que es funcional.

En las mitocondrias existen dos subcompartimientos: el **espacio de la matriz** y el **espacio intermembrana**. Estos compartimientos están definidos por las dos membranas mitocondriales concéntricas: la **membrana interna**, que forma extensas evaginaciones, las *crestas*, y encierra el espacio de la matriz, y la **membrana externa**, que se halla en contacto con el citosol (**Figura 12–21**A). En los cloroplastos existen estos dos subcompartimientos más otro adicional, el llamado *espacio tilacoidal*, que está delimitado por la *membrana tilacoidal* (Figura 12–21B). Cada uno de estos subcompartimientos de mitocondrias y cloroplastos contiene una dotación específica de proteínas.

Las mitocondrias y los cloroplastos se generan mediante el crecimiento de orgánulos preexistentes, seguido de su fisión (descrito en el Capítulo 14). Su crecimiento depende sobre todo de las proteínas que importa del citosol. Para ello es preciso que las proteínas sean transportadas a través de varias membranas de forma sucesiva y se sitúen adecuadamente. A veces, al proceso del desplazamiento de las proteínas a través de las membranas se le denomina *translocación de proteínas*. En esta sección explicamos cómo ocurre.

La translocación a la matriz mitocondrial depende de una secuencia señal y de translocadores de proteínas

Por lo general, las proteínas importadas a la **mitocondria** son captadas desde el citosol pocos segundos o minutos después de su liberación de los ribosomas. A diferencia de las pro-

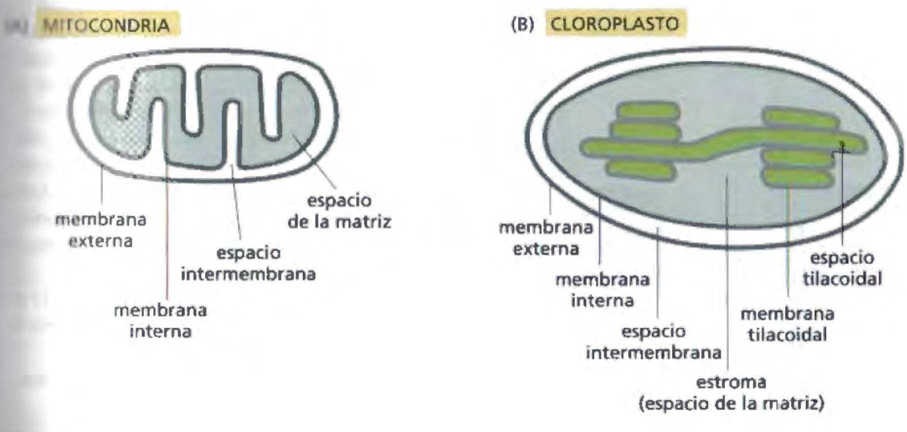


Figura 12–21 Subcompartimientos de la mitocondria y del cloroplasto. A diferencia de las crestas de la mitocondria (A), los tilacoides del cloroplasto (B) no están conectados a la membrana interna sino que forman un compartimiento con un espacio interno independiente (véase la Figura 12–3).

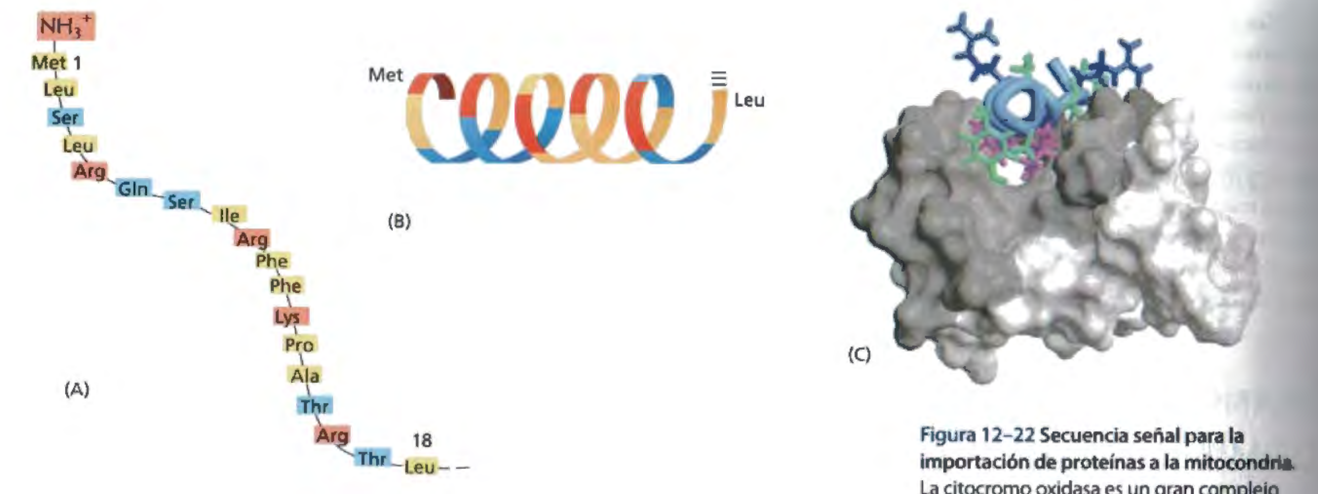


Figura 12-22 Secuencia señal para la importación de proteínas a la mitocondria. La citocromo oxidasa es un gran complejo multiproteico localizado en la membrana mitocondrial interna, donde actúa como la enzima terminal de la cadena de transporte electrónico (se explica en el Capítulo 14). (A) Los 12 primeros aminoácidos del precursor de la subunidad IV de esta enzima son suficientes como secuencia señal para dirigir el transporte de esta subunidad a la mitocondria. (B) Cuando la secuencia señal se pliega en forma de hélice α, los residuos de aminoácido cargados positivamente (*en rojo*) se agrupan en una cara de la hélice mientras que los residuos de aminoácido no polares (*en amarillo*) se hallan agrupados sobre todo en la cara opuesta. Los aminoácidos de cadena lateral polar no cargada se muestran en *azul*. Todas las secuencias señal que dirigen las proteínas a la matriz mitocondrial tienen la capacidad de formar una hélice α, que es reconocida por proteínas receptoras específicas en la superficie mitocondrial. (C) Estructura de la secuencia señal de la alcohol deshidrogenasa, otra enzima de la matriz mitocondrial, unida a un receptor de importación determinado por NMR. La hélice α anfifílica se une a esta cara hidrofóbica en la ranura del receptor. (C, adaptado de Y. Abe et al., *Cell* 100:551-560, 2000. Con la autorización de Elsevier.)

teínas que se translocan en el ER, que describimos después, las proteínas mitocondriales son primero sintetizadas completamente en el citosol como **proteínas precursoras mitocondriales** y después son translocadas a la mitocondria mediante un *mecanismo postraduccional*. Una o más secuencias señal dirigen todas las proteínas precursoras mitocondriales a su subcompartimiento mitocondrial adecuado. Muchas proteínas que entran en el espacio de la matriz tienen una secuencia señal en su extremo N-terminal que es eliminada de inmediato después de la importación por una peptidasa señal. Otras, incluyendo todas las de la membrana externa y algunas de la membrana interna, tienen una secuencia señal interna que no es eliminada. Las secuencias señal son necesarias y suficientes para inducir la importación y la correcta localización de las proteínas: cuando se utilizan técnicas de ingeniería genética para unir estas señales a cualquier proteína citosólica, las señales dirigen la proteína hacia el subcompartimiento mitocondrial adecuado.

Las secuencias señal que dirigen las proteínas precursoras al espacio de la matriz mitocondrial son las mejor conocidas. Todas ellas forman una hélice α anfifílica, en la que todos los restos cargados positivamente se localizan en un lado de la hélice y todos los restos hidrofóbicos no cargados se agrupan en el lado opuesto. Las proteínas receptoras que inician la translocación reconocen esta configuración más que la propia secuencia de aminoácidos (**Figura 12-22**).

La translocación de proteínas a través de las membranas mitocondriales está mediada por complejos proteicos formados por varias subunidades que actúan como **translocadores de proteínas** (**Figura 12-23**): el **complejo TOM** transfiere proteínas a través de la membrana

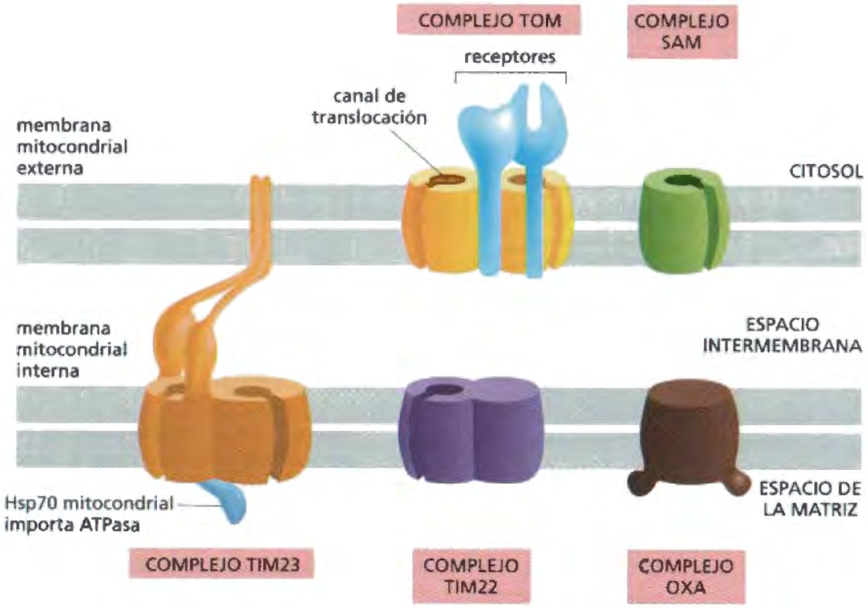


Figura 12-23 Translocadores proteicos en las membranas mitocondriales. Los complejos TOM, TIM, SAM y OXA son conjuntos de proteínas multiméricas de membrana que catalizan el transporte a través de las membranas mitocondriales. Los componentes proteicos de los complejos TIM22 y TIM23, que recubren el canal de translocación, son similares entre sí, lo que sugiere un origen evolutivo común. Uno de los componentes del centro de TIM23 contiene una hélice α que se extiende hacia fuera y se inserta en la membrana mitocondrial externa; la estructura de este complejo atraviesa a la vez dos membranas.

En la cara de la matriz, el complejo TIM23 está unido a un complejo proteico que contiene la proteína Hsp70, que actúa como un importador de ATPasa utilizando la hidrólisis del ATP para pasar proteínas por el poro.

externa y dos **complejos TIM,** los complejos TIM23 y TIM22, transfieren proteínas a través de la membrana interna. TOM y TIM son nombres que significan respectivamente translocadores de la membrana externa (*translocator of the outer membrane*) e interna (*translocator of the inner membrane*). Estos complejos contienen algunos componentes que actúan como receptores de los precursores de las proteínas mitocondriales y otros que forman los canales de translocación.

El complejo TOM es necesario para la importación de todas las proteínas mitocondriales codificadas por el núcleo celular. Es responsable del transporte de las secuencias señal hasta el espacio intermembrana y ayuda a insertar las proteínas transmembrana en la membrana externa. Entonces, unas proteínas en conformación de barril β, que son especialmente abundantes en la membrana externa, pasan sobre otro translocador, el **complejo SAM**, que le ayuda a plegarse de forma adecuada sobre la membrana externa. El complejo TIM23 transporta algunas proteínas solubles hasta el espacio de la matriz y facilita la inserción de las proteínas transmembrana en la membrana interna. El complejo TIM22 media la inserción de una subclase de proteínas de la membrana interna, incluyendo el transportador, que transportan ADP, ATP y fosfato hacia dentro y hacia fuera de la mitocondria. Un tercer translocador en la membrana mitocondrial interna es el **complejo OXA**, que media la inserción de las proteínas de membrana interna sintetizadas en la mitocondria. También participa en la inserción en algunas proteínas de membrana interna importadas inicialmente transportadas al espacio de la matriz por otros complejos.

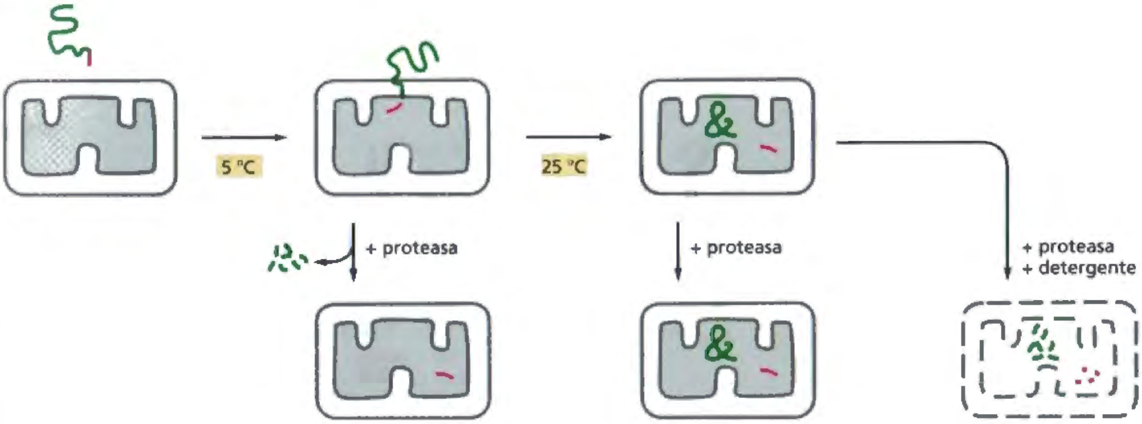
Los precursores de las proteínas mitocondriales son importados como cadenas polipeptídicas desplegadas

Casi todo lo que se conoce acerca de los mecanismos moleculares de la importación de proteínas por las mitocondrias procede de experimentos en los que se han utilizado sistemas de transporte reconstituidos, libres de células, en los que mitocondrias purificadas importan precursores proteicos marcados radiactivamente en un tubo de ensayo. Cambiando las condiciones de incubación es posible establecer los requerimientos bioquímicos para la importación.

Los precursores de proteínas mitocondriales no se pliegan en sus conformaciones nativas después de ser sintetizados, sino que permanecen desplegados en el citosol gracias a interacciones con otras proteínas. Algunas de estas proteínas *son proteínas chaperonas* de la *familia Hsp70* (descritas en el Capítulo 6) mientras que otras son específicas de las proteínas mitocondriales y se unen a sus secuencias señal. Todas las proteínas que interactúan contribuyen a evitar que los precursores de las proteínas se agreguen o se plieguen antes de entrar en contacto con el complejo TOM en la membrana mitocondrial externa. Como primera etapa en el proceso de importación, los precursores de importación del complejo TOM se unen a la secuencia señal del precursor de la proteína mitocondrial. En ese momento, las proteínas que interactúan se separan y la cadena polipeptídica desplegada es enviada –con la secuencia señal en primer lugar– a través del canal de translocación.

En principio, una proteína puede alcanzar el espacio de la matriz mitocondrial cruzando las dos membranas, primero una y luego la otra, o pasando a través de ambas membranas a la vez. Podemos distinguir entre estas dos posibilidades enfriando un sistema de

Figura 12–24 Las proteínas que son transportadas a la matriz mitocondrial atraviesan a la vez de forma transitoria tanto la membrana externa como la interna de la mitocondria. Cuando se incuban mitocondrias aisladas a 5 °C con un precursor de una proteína, el precursor sólo se transloca parcialmente a través de las membranas mitocondriales. En la matriz mitocondrial se elimina el péptido señal N-terminal (*en rojo*); pero la mayor parte de la cadena polipeptídica permanece fuera de la mitocondria donde es accesible a enzimas proteolíticas añadidas desde el exterior. Al volver a calentar la preparación a 25 °C, el proceso de translocación se completa. Cuando se halla en el interior de la mitocondria, la cadena polipeptídica está protegida de las enzimas proteolíticas añadidas. Como control, cuando se añade un detergente para romper las membranas mitocondriales, las proteínas importadas pueden ser degradadas por la misma proteasa.



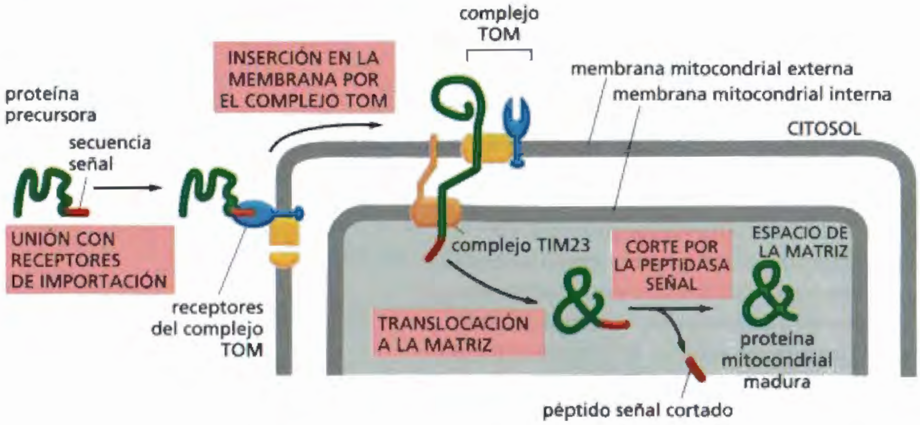


Figura 12-25 Importación de proteínas a la mitocondria. <ACGG> La secuencia señal N-terminal de la proteína mitocondrial precursora es reconocida por los receptores del complejo TOM. Entonces, la proteína es translocada por el complejo TIM23 de forma que transitoriamente atraviesa ambas membranas en los sitios de contacto o cerca de ellos. La secuencia señal es eliminada por acción de la peptidasa señal en la matriz y forma la proteína madura. La secuencia señal liberada es degradada con rapidez (no se muestra).

importación mitocondrial libre de células para detener las proteínas en algún paso intermedio del proceso de translocación. El resultado es que las proteínas paradas ya no contenían la secuencia señal de su extremo N-terminal, lo que indicaba que su extremo N-terminal ya había alcanzado el espacio de la matriz, donde se localiza la peptidasa señal. Sin embargo, la mayor parte de la proteína podía ser degradada desde el exterior de la mitocondria mediante proteasas añadidas exteriormente (**Figura 12-24**). Claramente, las proteínas precursoras pueden pasar a través de ambas membranas mitocondriales a la vez para entrar en el espacio de la matriz (**Figura 12-25**). Se cree que en primer lugar el complejo TOM transporta la secuencia señal a través de la membrana externa hasta el espacio intermembrana, donde se une al complejo TIM y abre el canal del complejo; entonces, la cadena polipeptídica entra en el espacio de la matriz o se inserta en la membrana interna.

Aunque por lo general los complejos TOM y TIM trabajan juntos transportando las proteínas precursoras a través de las dos membranas a la vez, también pueden actuar independientemente. Por ejemplo, en membranas externas aisladas, el complejo TOM puede translocar la secuencia señal de una proteína precursora mitocondrial a través de la membrana. De manera similar, si la membrana externa es eliminada de forma experimental de mitocondrias aisladas, el complejo TIM23 ahora expuesto, puede importar de forma eficiente proteínas precursoras al espacio de la matriz.

La hidrólisis de ATP y el potencial de membrana dirigen la importación de proteínas al espacio de la matriz

El transporte direccional requiere energía, que en la mayoría de los sistemas biológicos es aportada por la hidrólisis de ATP. La importación de proteínas por la mitocondria es impulsada por la hidrólisis de ATP en dos lugares discretos: uno en el exterior de la mitocondria y el otro en la matriz (**Figura 12-26**). Además, la importación de proteínas requiere otra fuente de energía, que es el potencial de membrana a través de la membrana mitocondrial interna.

El primer requerimiento de energía ocurre en las etapas iniciales del proceso de translocación, cuando el precursor de la proteína desplegada, unida a las chaperonas, interac-

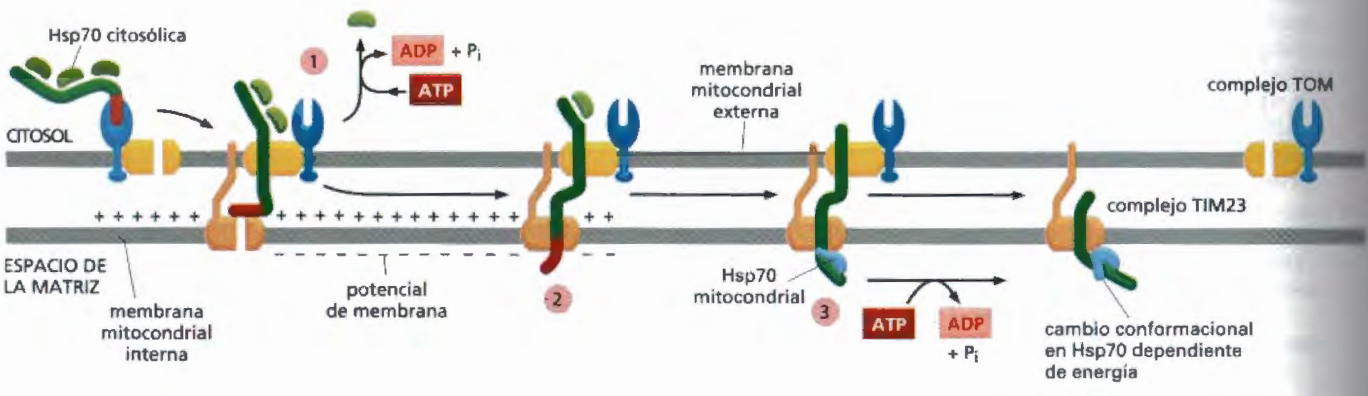


Figura 12-26 Papel de la energía en la importación de proteínas al interior de la matriz mitocondrial. (1) La proteína *Hsp70 citosólica* se separa de la proteína mediante un proceso que depende de la hidrólisis de ATP. Después de la inserción inicial de la secuencia señal y de las porciones adyacentes de la cadena polipeptídica en el complejo TOM, la secuencia señal interacciona con el complejo TIM. (2) La secuencia señal es translocada a la matriz; se trata de un proceso que requiere un potencial de membrana a través de la membrana interna. (3) La proteína *Hsp70 mitocondrial*, que forma parte de un complejo importador de ATPasa, se une a las regiones de la cadena polipeptídica a medida que se alcanza la matriz, "tirando" de la proteína hacia el canal de translocación.

ciona con los receptores de importación del complejo TOM. Como se describió en el Capítulo 6, la unión y la liberación de polipéptidos recién sintetizados de las chaperonas de la familia Hsp70 requiere la hidrólisis de ATP. El requerimiento de Hsp70 y ATP en el citosol puede ser obviado si la proteína precursora es desplegada artificialmente antes de ser añadida a las mitocondrias purificadas.

Una vez que la secuencia señal ha pasado a través del complejo TOM y se ha unido al complejo TIM, para que prosiga la translocación a través del canal de translocación TIM precisa de un potencial de membrana, que es el componente eléctrico del gradiente electroquímico de H^+ a través de la membrana interna (véase Figura 11–4). El gradiente electroquímico es mantenido por el bombeo de H^+ de la matriz hacia el espacio intermembrana, impulsado por los procesos de transporte de electrones de la membrana interna (se describe en el Capítulo 14). La energía del gradiente electroquímico de H^+ a través de la membrana interna no sólo colabora en la síntesis de la mayoría del ATP celular, sino que también conduce la translocación de las secuencias señal cargadas positivamente a través de los complejos TIM mediante electroforesis.

Las **Hsp70 mitocondriales** también desempeñan un papel crucial en el proceso de importación. Las mitocondrias que contienen formas mutantes de esta proteína son incapaces de importar proteínas precursoras. La Hsp70 forma parte de un ensamblaje proteico formado por muchas subunidades que se encuentra unido al lado de la matriz del complejo TIM23 y que actúa como un motor estirando la proteína precursora hacia el espacio de la matriz. De la misma forma que su "pariente" citosólica, la Hsp70 mitocondrial tiene una alta afinidad por las cadenas polipeptídicas desplegadas y se une con fuerza a una proteína de importación, en cuanto emerge desde el translocador TIM al interior del espacio de la matriz. A continuación, la Hsp70 libera la proteína en un proceso dependiente de ATP. Se cree que este ciclo de unión y separación de la proteína, dependiente de energía, es el que aporta la energía necesaria para completar la importación de una proteína una vez se ha insertado en el complejo TIM23 (véase la Figura 12–26).

Tras la interacción inicial con la Hsp70 mitocondrial, muchas proteínas importadas a la matriz son transferidas a otra proteína chaperona, la *Hsp60 mitocondrial*. Como se ha descrito en el Capítulo 6, la Hsp60 facilita el plegamiento del polipéptido desplegado mediante ciclos de unión y liberación con hidrólisis de ATP.

Las bacterias y las mitocondrias utilizan mecanismos similares para insertar porinas en su membrana externa

La membrana mitocondrial externa, del mismo modo que la membrana externa de las bacterias Gram-negativas (véase Figura 11–8), contiene una gran cantidad de proteínas preformadas denominadas porinas, por lo que es libremente permeable a iones inorgánicos y a metabolitos (aunque no a la mayoría de proteínas). Las porinas son proteínas en barril β (véase Figura 10–26) y en primer lugar son importadas a través del complejo TOM (Figura 12–27). A diferencia de otras proteínas de membrana, que están ancladas a la membrana a través de regiones de hélice α, el complejo TOM no puede llevar a cabo la integración de las porinas en la bicapa lipídica. En lugar de ello, las porinas son transportadas primero al espacio intermembrana, donde se unen de forma transitoria con proteínas chaperona especializadas que impiden que las porinas se agreguen; entonces, se unen al complejo SAM de la membrana externa, que inserta la porina en la membrana externa y le ayuda a plegarse de forma apropiada.

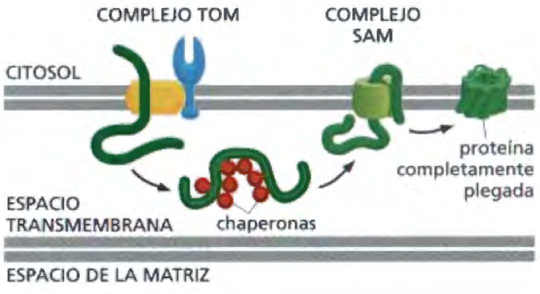


Figura 12–27 Integración de las porinas en la membrana mitocondrial externa. Después de la translocación a través del complejo TOM, unas proteínas en conformación de barril β se unen a chaperonas en el espacio intermembrana. Entonces el complejo SAM inserta en la membrana externa la cadena polipeptídica desplegada.

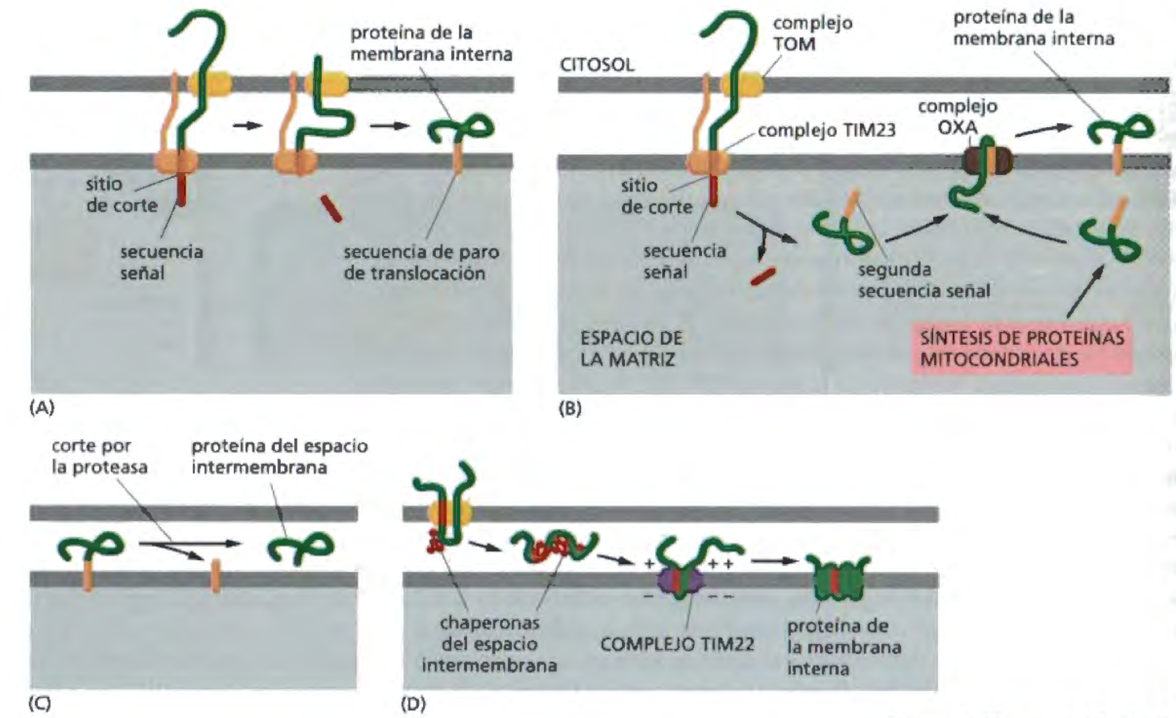


Figura 12–28 Importación de proteínas desde el citosol hacia la membrana mitocondrial interna y el espacio intermembrana. (A) La secuencia señal N-terminal (*rojo*) inicia el proceso de importación al espacio de la matriz (véase Figura 12–25). Una secuencia hidrofóbica (*naranja*) que sigue a la secuencia de direccionamiento a la matriz se une al translocador TIM23 de la membrana interna y detiene la translocación. El resto de la proteína es "estirada" hacia el espacio intermembrana, a través del translocador TOM de la membrana externa, y la secuencia hidrofóbica se libera dentro de la membrana interna. (B) Una segunda ruta de integración de la proteína en la membrana interna libera completamente la proteína en el espacio de la matriz. El corte de la secuencia señal (*rojo*), utilizado para la translocación inicial, desenmascara una secuencia señal hidrofóbica adyacente (*naranja*) en el nuevo segmento N-terminal. Entonces esta señal dirige la proteína al interior de la membrana utilizando la misma vía dependiente de OXA que inserta las proteínas que han sido codificadas por el genoma mitocondrial y traducidas en el espacio de la matriz. (C) Algunas proteínas solubles del espacio intermembrana también pueden seguir la vía que se muestra en (A) y (B) antes de quedar liberadas en el espacio intermembrana por acción de una segunda peptidasa señal que se activa en el espacio intermembrana y que elimina la secuencia señal hidrofóbica. (D) Los transportadores de metabolitos tienen secuencias señal internas y serpentean por el complejo TOM como un bucle. Entonces se unen en el espacio intermembrana con las chaperonas, que guían a las proteínas al complejo TIM22. El complejo TIM22 está especializado en la inserción de proteínas de paso múltiple en la membrana interna.

Una de las subunidades centrales del complejo SAM es homóloga a una proteína de membrana externa de las bacterias que colabora a insertar proteínas en barril β en la membrana exterior de la bacteria desde el espacio periplasmático (el espacio topológicamente equivalente al espacio intermembrana de las mitocondrias). Esta vía conservada para insertar proteínas en barril β constituye otra evidencia del origen endosimbióntico de las mitocondrias.

El transporte a la membrana mitocondrial interna y al espacio intermembrana mitocondrial se produce a través de varias vías

El mismo mecanismo que transporta proteínas al espacio de la matriz, utilizando los translocadores TOM y TIM23 (véase Figura 12–25), también media la translocación inicial de muchas proteínas que son destinadas a la membrana mitocondrial interna o al espacio intermembrana.

En la ruta de translocación más común, sólo entra en el espacio de la matriz la secuencia señal N-terminal de la proteína transportada (**Figura 12–28**A). Una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos situada estratégicamente tras la secuencia señal N-terminal, actúa como *secuencia de final de transferencia* e impide la transferencia posterior a través de la membrana interna. El complejo TOM estira el resto de la proteína a través de la membrana externa hacia el espacio intermembrana; entonces, la secuencia señal es eliminada en la matriz y la secuencia hidrofóbica, liberada de TIM23, queda anclada en la membrana interna.

En otra vía de transporte a la membrana interna o al espacio intermembrana, el complejo TIM23 inicialmente transloca toda la proteína al espacio de la matriz (Figura 12–28B). Una peptidasa señal de la matriz elimina la secuencia señal N-terminal, exponiendo una secuencia hidrofóbica en el extremo N-terminal. Esta secuencia señal guía la proteína al complejo OXA, que inserta en la membrana interna las proteínas que están codificadas y traducidas en la mitocondria (véase Figura 12-23). Muy pocas proteínas importadas utilizan esta vía. En la membrana plasmática de las bacterias y en la membrana tilacoidal de los cloroplastos se encuentran translocadores muy semejantes al complejo OXA y parece que colaboran en la inserción de proteínas de membrana mediante un mecanismo similar.

Muchas proteínas que utilizan esta vía hasta la membrana interna permanecen ancladas en ella a través de su secuencia señal hidrofóbica (véase Figura 12–28A y B). Otras, sin embargo, son liberadas en el espacio intermembrana por una proteasa que elimina el anclaje a la membrana (Figura 12–28C). Muchas de estas proteínas liberadas permanecen uni-

das a la superficie externa de la membrana mitocondrial interna como subunidades periféricas de complejos proteicos que también contienen proteínas transmembrana.

Las mitocondrias son el principal lugar de síntesis de ATP en la célula, pero también contienen numerosas enzimas metabólicas, como las del ciclo del ácido cítrico. Por ello, además de proteínas, las mitocondrias deben transportar pequeños metabolitos a través de sus membranas. A diferencia de la membrana externa, que presenta porinas que la hacen permeable a las moléculas pequeñas, la membrana interna no es permeable. Por el contrario, una familia de proteínas transportadoras específicas de metabolito transportan un gran número de pequeñas moléculas a través de la membrana interna. En levaduras estos transportadores comprenden una familia de 35 proteínas, siendo las más abundantes el transportador ATP, ADP y fosfato. Son proteínas transmembrana de multipaso que no tienen secuencias eliminables en su extremo N-terminal, pero que contienen secuencias señal internas. Cruzan el complejo TOM de la membrana externa y unas chaperonas del espacio intermembrana las guían al complejo TIM22, que las inserta en la membrana interna mediante un proceso que requiere el potencial de membrana, pero no Hsp70 mitocondrial ni ATP (Figura 12–28D). Es probable que la distribución energéticamente favorable de las regiones hidrofóbicas transmembrana en la membrana interna también colabore en el desarrollo de este proceso.

Dos secuencias señal dirigen las proteínas a la membrana tilacoidal de los cloroplastos

El transporte de proteínas hacia el interior de los **cloroplastos** se parece al transporte al interior de las mitocondrias. Ambos procesos se producen después de la traducción, utilizan diferentes complejos translocadores en cada membrana, requieren energía y utilizan secuencias señal N-terminales anfifílicas que son eliminadas después de haber sido utilizadas. Sin embargo, con excepción de algunas de las moléculas de chaperona, los componentes proteicos de los complejos de translocación son diferentes. Además, mientras que las mitocondrias utilizan el gradiente electroquímico de H^+ a través de su membrana interna para impulsar el transporte, los cloroplastos, que tienen un gradiente electroquímico de H^+ a través de su membrana tilacoidal pero no a través de su membrana interna, utilizan la hidrólisis de GTP y de ATP para impulsar energéticamente la importación a través de su doble membrana. Las similitudes funcionales pueden ser, por tanto, la consecuencia de una evolución convergente, reflejo de los requerimientos comunes de la translocación de proteínas a través de una doble membrana.

A pesar de que las secuencias señal para la importación al interior de los cloroplastos son semejantes a las descritas para el transporte a las mitocondrias, una misma célula vegetal tiene tanto mitocondrias como cloroplastos y las proteínas deben distribuirse de manera adecuada entre ambos compartimientos. En plantas, por ejemplo, si una enzima bacteriana se une de forma experimental a una secuencia N-terminal de una proteína mitocondrial, se dirige específicamente a las mitocondrias, mientras que si se une en un experimento a una secuencia N-terminal de una proteína de cloroplasto, penetra en los cloroplastos. Por lo tanto, es probable que los receptores de importación a cada orgánulo distingan entre las secuencias señal diferentes.

Los cloroplastos tienen otro compartimiento rodeado de membrana, el **tilacoide**. Muchas proteínas de los cloroplastos, entre las que se encuentran las subunidades proteicas del sistema fotosintético y de la ATP sintasa (descrita en el Capítulo 14), se hallan localizadas en la membrana tilacoidal. Como los precursores de algunas proteínas mitocondriales, el transporte de estas proteínas precursoras desde el citosol hasta su destino final se produce mediante dos etapas. Primero pasan a través de la doble membrana en lugares de contacto especiales hasta el espacio de la matriz (llamado **estroma**, en los cloroplastos) y luego son translocadas a la membrana tilacoidal o al espacio tilacoidal (**Figura 12–29**A). Los precursores de estas proteínas tienen una secuencia señal hidrofóbica del tilacoide situada a continuación de la secuencia señal N-terminal del cloroplasto. Cuando la secuencia señal N-terminal ha sido utilizado para importar la proteína al estroma, es eliminada por una proteasa señal del estroma, desenmascarando la secuencia señal del tilacoide, que inicia el transporte a través de la membrana del tilacoide.

Existen al menos cuatro vías a través de las cuales las proteínas se integran en la membrana tilacoidal, que se diferencian por la necesidad de chaperonas del estroma y de fuentes de energía (Figura 12–29B).

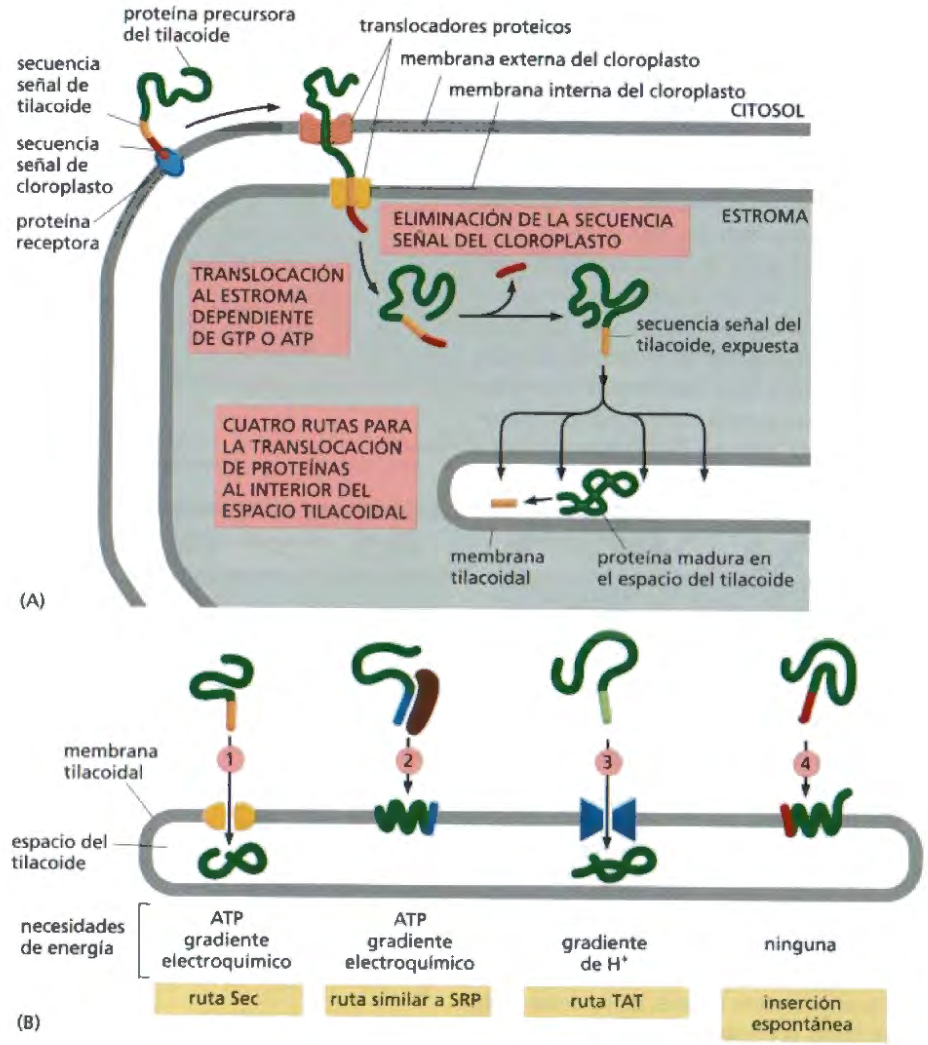


Figura 12–29 Translocación de un precursor proteico de cloroplasto al interior del espacio tilacoidal. (A) La proteína precursora contiene una secuencia señal N-terminal de direccionamiento al cloroplasto (*en rojo*), seguida inmediatamente por una secuencia señal de direccionamiento al tilacoide (*en naranja*). La secuencia señal del cloroplasto inicia la translocación hacia el estroma a través de un sitio de contacto mediante un mecanismo similar al que se utiliza para la translocación de las proteínas precursoras hacia la matriz mitocondrial. Entonces, se elimina la secuencia señal y la señal de direccionamiento al tilacoide es desenmascarada, lo que inicia la translocación a través de la membrana del tilacoide. (B) La translocación hacia el espacio del tilacoide o a su membrana puede seguir una de las al menos cuatro rutas posibles: (1) la *ruta Sec*, denominada así porque se utilizan componentes que son homólogos a las proteínas Sec, proteínas implicadas en la translocación de proteínas a través de la membrana bacteriana (se describe más adelante); (2) una *ruta similar a SRP*, denominada así porque en ella participa el homólogo en el cloroplasto a la partícula de reconocimiento de la señal, o SRP (descrito más adelante); (3) la *ruta TAT* (*twin arginine translocation*; translocación de dos argininas gemelas), denominada así porque hay dos argininas críticas en la secuencia señal que dirige las proteínas en esta ruta, que depende del gradiente de H^+ a través de la membrana del tilacoide, y (4) una *ruta de inserción espontánea* que parece que no necesita ningún translocador de proteínas.

Resumen

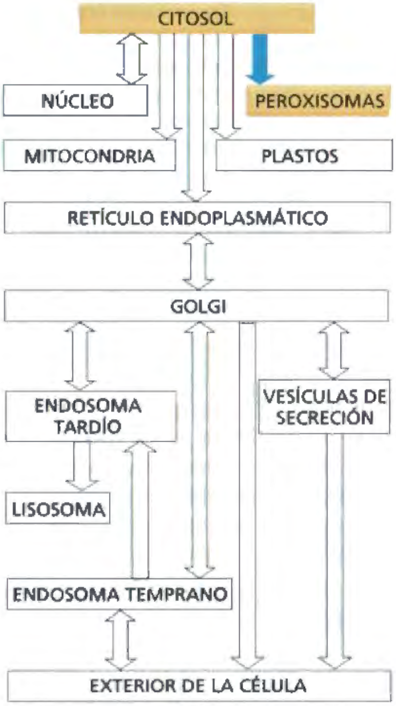
A pesar de que las mitocondrias y los cloroplastos tienen sus propios sistemas genéticos, sólo producen una pequeña proporción de sus propias proteínas. De hecho, ambos orgánulos importan desde el citosol la mayoría de sus proteínas y utilizan mecanismos similares. En ambos casos, las proteínas son transportadas en un estado desplegado, a través de las membranas externa e interna, hasta el estroma. En las mitocondrias, la translocación está impulsada tanto por lo hidrólisis de ATP como por el potencial de membrana a través de la membrana interna, mientras que en los cloroplastos la translocación sólo está impulsada por la hidrólisis de GTP y de ATP. Las proteínas chaperonas de la familia de las Hsp70 citosólicas mantienen las proteínas precursoras en un estado desplegado y un segundo grupo de proteínas Hsp70 del espacio de la matriz o del estroma "estiran" la cadena polipeptídica al interior del orgánulo. Sólo son translocadas las proteínas que contienen una secuencia señal específica. La secuencia señal puede estar localizada en el extremo N-terminal y después de la importación se elimina, o es interna y se retiene. El transporte a la membrana interna a veces utiliza una segunda secuencia señal hidrofóbica que es desenmascarada cuando se elimina la primera secuencia. En los cloroplastos, la importación desde el estroma hasta el tilacoide se realiza por varias rutas que se diferencian por las chaperonas y por las fuentes de energía.

PEROXISOMAS

Los **peroxisomas** se diferencian de las mitocondrias y de los cloroplastos en muchos aspectos, entre los que cabe destacar que estos orgánulos están rodeados por una sola membrana y no presentan ni DNA ni ribosomas. Dado que no tienen genoma, todas sus proteínas están codificadas en el núcleo. Los peroxisomas adquieren la mayor parte de sus proteínas me-

mente importación selectiva desde el citosol aunque algunas de ellas entran a la membrana del peroxisoma a través del ER.

Dado que no volveremos a tratar de los peroxisomas en otro apartado, antes de hablar de su biosíntesis vamos a detenernos a considerar algunas de las funciones de esta familia diversa de orgánulos. Todas las células eucariotas tienen peroxisomas. Contienen enzimas oxidativas, como la *catalasa* y la *urato oxidasa* a concentraciones tan altas que en algunas células los peroxisomas se reconocen en electromicrografías por la presencia de un nucleoide cristalino (**Figura 12–30**).



Como en el caso de las mitocondrias, los peroxisomas son los principales lugares de utilización de oxígeno. Una hipótesis es que los peroxisomas sean un vestigio de un orgánulo antiguo, que en los antecesores primitivos de las células eucariotas realizaba todo el metabolismo del oxígeno. Cuando el oxígeno producido por las bacterias fotosintéticas se acumuló en la atmósfera, podría haber resultado altamente tóxico para la mayoría de las células. Los peroxisomas pudieron haber contribuido a disminuir la concentración de oxígeno en estas células, a la vez que permitían utilizar su reactividad química para llevar a cabo reacciones útiles de oxidación.

De acuerdo con este punto de vista, el desarrollo posterior de las mitocondrias hizo que los peroxisomas se volvieran obsoletos, dado que muchas de las reacciones bioquímicas –que antes se realizaban en los peroxisomas sin producir energía– fueron acopladas a la formación de ATP por medio de la fosforilación oxidativa. Por lo tanto, las reacciones de oxidación que realizan en la actualidad los peroxisomas podrían ser aquellas cuyas funciones no fueron asumidas por las mitocondrias.

Los peroxisomas utilizan el oxígeno molecular y el peróxido de hidrógeno para realizar reacciones de oxidación

Los peroxisomas se denominan así porque generalmente contienen una o más enzimas que utilizan oxígeno molecular para eliminar átomos de hidrógeno de sustratos orgánicos específicos (designados como R) a través de una reacción de oxidación que produce *peróxido de hidrógeno* (H_2O_2).

$$RH_2 + O_2 \rightarrow R + H_2O_2$$

La *catalasa* utiliza el H_2O_2 generado por otras enzimas del orgánulo para oxidar diversas sustancias –como fenoles, ácido fórmico, formaldehído y alcohol– mediante una reacción de "peroxidación": $H_2O_2 + R'H_2 \rightarrow R' + 2H_2O$. Este tipo de oxidación es particularmente importante en el hígado y en las células de riñón, donde los peroxisomas destoxifican una gran variedad de moléculas tóxicas que entran en la circulación. Alrededor del 25% del etanol que bebemos es oxidado a acetaldehído de esta manera. Además, cuando se acumula un exceso de H_2O_2 en la célula, la catalasa lo transforma en H_2O mediante la reacción:

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

Una de las principales funciones de las reacciones de oxidación realizadas en los peroxisomas es la rotura de las moléculas de ácidos grasos. El proceso llamado *β oxidación* acorta las cadenas de los ácidos grasos de forma secuencial en bloques de dos átomos de carbono cada vez, transformando los ácidos grasos en acetil CoA. Entonces, los peroxisomas exportan el acetil CoA al citosol para su reutilización en reacciones biosintéticas. En células de mamífero, la β oxidación tiene lugar tanto en mitocondrias como en peroxisomas; sin embargo en levaduras y en células vegetales esta importante reacción sólo se realiza en los peroxisomas

Una función biosintética esencial de los peroxisomas en animales es la catálisis de las primeras reacciones de la síntesis de *plasmalógenos*, que son los fosfolípidos más abundantes de la mielina (**Figura 12–31**). Una deficiencia de plasmalógenos provoca profundas anormalidades en la mielinización de los axones de las células nerviosas, que es una de las causas de que muchas deficiencias peroxisomales provoquen anomalías neurológicas.

Los peroxisomas son orgánulos muy diversos: distintas células de un mismo organismo pueden contener incluso distintos conjuntos de enzimas. También se adaptan de manera destacable a condiciones cambiantes. Por ejemplo, las células de levadura que crecen con azúcar tienen peroxisomas pequeños, pero cuando crecen en metanol desarrollan peroxisomas gran-

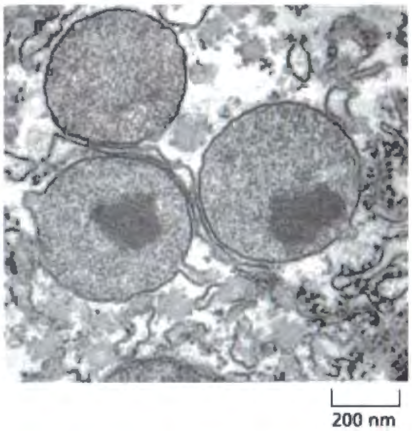
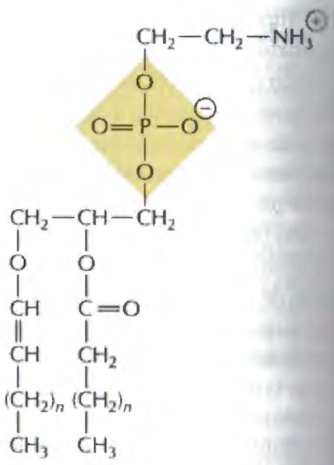


Figura 12–30 Electromicrografía de tres peroxisomas en una célula de hígado de rata. Las inclusiones paracristalinas electrodensas están formadas por la enzima urato oxidasa. (Por cortesía de Daniel S. Friend.)

Figura 12-31 Estructura del plasmalógeno. Los plasmalógenos son muy abundantes en las cubiertas mielínicas que aíslan los axones de las células nerviosas. Constituyen entre el 80 y el 90% de los fosfolípidos de las membranas de mielina. Además de un grupo de cabeza etanolamina y de una cadena larga de ácido graso unido al mismo núcleo glicerol fosfato de los fosfolípidos, los plasmalógenos contienen un alcohol graso poco común que se une mediante un enlace éter (*abajo a la izquierda*).



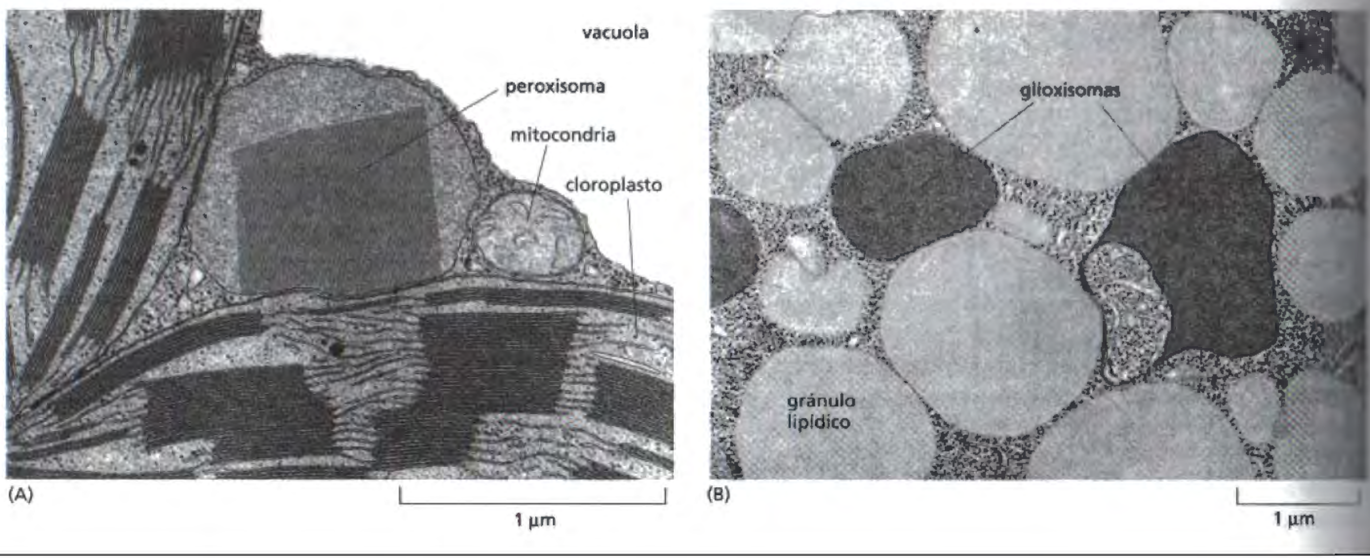
des que oxidan metanol; y cuando crecen con ácidos grasos, desarrollan grandes peroxisomas capaces de degradar ácidos grasos hasta acetil CoA por medio de la β oxidación.

También son importantes en las plantas. Se han estudiado en profundidad dos tipos de peroxisomas vegetales. Uno de ellos está presente en las hojas, donde participa en la fotorrespiración (se describe en el Capítulo 14) (**Figura 12-32A**). El otro tipo de peroxisomas se halla presente en las semillas en germinación, donde transforma los ácidos grasos almacenados en los lípidos de las semillas en azúcares necesarios para el crecimiento de la planta joven. Dado que esta conversión de grasas en azúcares se realiza a través de una serie de reacciones conocidas como el *ciclo del glioxilato*, estos peroxisomas también son denominados *glioxisomas* (Figura 12-32B). En el ciclo del glioxilato, dos moléculas de acetil CoA, producidas por la degradación de un ácido graso en el peroxisoma, son utilizadas para fabricar ácido succínico, el cual sale del peroxisoma y es transformado en glucosa. El ciclo del glioxilato no tiene lugar en las células animales, por lo que los animales son incapaces de transformar los ácidos grasos en carbohidratos.

Una corta secuencia señal dirige la importación de proteínas hacia los peroxisomas

Una secuencia específica de tres aminoácidos (Ser-Lys-Leu), localizada en el extremo C de muchas proteínas peroxisomales, actúa como señal de importación (véase Tabla 12-3, p. 702). Otras proteínas peroxisomales tienen una secuencia señal cerca del extremo N. Si cualquiera de estas secuencias se une experimentalmente a una proteína citosólica, la proteína es importada a los peroxisomas. El proceso de importación es aún bastante desconocido, aunque se sabe que están implicadas proteínas receptoras solubles en el citosol que reconocen las secuencias de direccionamiento y proteínas de anclaje en la superficie citosólica del peroxisoma. Al menos 23 proteínas diferentes, denominadas **peroxinas**, participan como elementos del proceso de importación que es impulsado por la hidrólisis de ATP. Un complejo de al menos seis peroxinas diferentes forman un translocador de membrana. Dado que incluso las proteínas oligoméricas no tienen que desplegarse para ser importadas al peroxisoma, el mecanismo es diferente del que utilizan las mitocondrias y los cloroplastos. Al menos un receptor de importación soluble, la peroxina Pex5, acompaña a la proteína importada durante todo el proceso hasta el interior del peroxisoma y, después de liberarse de la

Figura 12-32 Electromicrografía de dos tipos de peroxisomas encontrados en células vegetales. (A) Peroxisoma con un núcleo paracristalino de una célula del mesófilo de una hoja de tabaco. Se cree que la estrecha asociación entre el peroxisoma y el cloroplasto facilita el intercambio de materiales entre estos orgánulos durante la fotorrespiración. (B) Peroxisomas de una célula almacenadora de lípidos en un cotiledón de una semilla de tomate, 4 días después de germinar. En este caso, los peroxisomas (glioxisomas) están asociados con gotitas de lípidos en los que se almacena grasa, lo cual refleja el papel central de estos glioxisomas en la movilización de los lípidos y en su utilización para la gluconeogénesis durante la germinación de la semilla. (A, de S.E. Frederick y E.H. Newcomb, *J Cell Biol.* 43: 343-353, 1969. Con la autorización de The Rockefeller Press; B, de W.P. Wergin, P.J. Gruber y E.H. Newcomb, *J. Ultrastruct. Res.* 30: 533-557,1970. Con la autorización de Academic Press.)



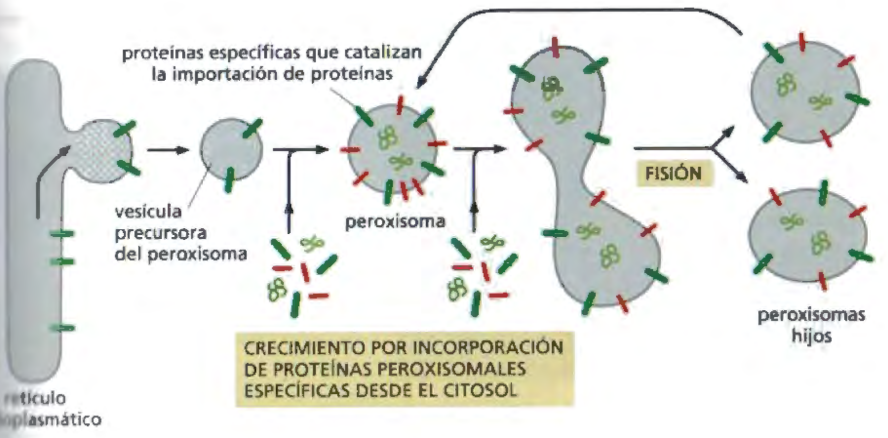


Figura 12–33 Modelo que explica cómo proliferan los peroxisomas y cómo pueden generarse nuevos peroxisomas. Se cree que las vesículas precursoras de los peroxisomas aparecen por gemación del ER. No se conoce el mecanismo que impulsa el inicio de esta reacción ni cómo se seleccionan únicamente las proteínas peroxisomales para poder empaquetarlas en esas vesículas –y no proteínas del ER o proteínas destinados a otros lugares en la célula. Las vesículas precursoras de los peroxisomas pueden fundirse con otras o con peroxisomas ya formados. La membrana de los peroxisomas contiene proteínas receptoras de importación. Los ribosomas citosólicos sintetizan proteínas peroxisomales, incluyendo nuevas copias del receptor de importación, que después serán importadas al orgánulo. Probablemente también son importados los lípidos necesarios para el crecimiento de la membrana de las vesículas precursoras de los peroxisomas, aunque algunos de ellos pueden provenir de forma directa del ER. (Más adelante se describirá el transporte de los lípidos sintetizados en el ER a través del citosol hasta otros orgánulos.)

carga, vuelve de nuevo al citosol. Estos aspectos del transporte al peroxisoma recuerdan los procesos de transporte de proteínas al núcleo.

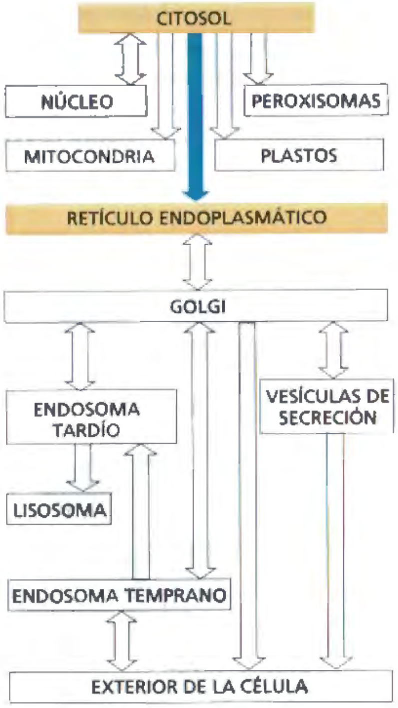
La importancia de este proceso de importación y de los peroxisomas se pone dramáticamente de manifiesto en la enfermedad hereditaria humana denominada *síndrome Zellweger,* en el que un defecto en las proteínas de importación a los peroxisomas conduce a una deficiencia peroxisomal profunda. Estos individuos, cuyas células presentan peroxisomas "vacíos", tienen graves anormalidades en el cerebro, hígado, y riñones, y mueren poco después de nacer. La responsable de una forma de esta enfermedad es una mutación en el gen que codifica una proteína integral de la membrana de los peroxisomas, la peroxina Pex2, implicada en la importación de proteínas. La presencia de un receptor de importación defectuoso para la secuencia señal N-terminal provoca una enfermedad peroxisomal hereditaria más leve.

Se ha planteado la cuestión de si los nuevos peroxisomas aparecen a partir de peroxisomas preexistentes por crecimiento y fisión del orgánulo –y por tanto se replican de una forma autónoma como hemos mencionado para el caso de las mitocondrias y de los plastidios– o derivan como un compartimiento especializado del retículo endoplasmático (ER). En realidad, de algún modo son ciertos algunos aspectos de ambos puntos de vista (**Figura 12–33**). La mayoría de las proteínas de membrana de los peroxisomas se sintetizan en el citosol y se insertan en la membrana de peroxisomas preexistentes, mientras que otras se integran primero en la membrana del ER desde donde viajan como vesículas especializadas precursoras de los peroxisomas. Estas vesículas precursoras pueden fusionarse unas con otras y empezar a importar proteínas peroxisomales adicionales utilizando su propia maquinaria de importación de proteínas para crecer y forma un peroxisoma maduro, el cual puede entrar en el ciclo de crecimiento y fisión.

Resumen

Los peroxisomas están especializados en la realización de reacciones de oxidación que utilizan oxígeno molecular. Generan peróxido de hidrógeno, que es utilizado con fines oxidativos, y contienen catalasa que destruye el exceso. Como las mitocondrias y los cloroplastos, los peroxisomas son orgánulos autorreplicantes. Pero como no contienen ni DNA ni ribosomas, todas sus proteínas están codificadas en el núcleo. Algunas de estas proteínas se transportan al peroxisoma desde el ER, pero la mayoría de ellas son sintetizadas en el citosol. Una secuencia específica de tres aminoácidos situada cerca del extremo C de muchas de estas proteínas citosólicas actúa como una señal de importación peroxisomal. El mecanismo de importación de proteínas es diferente del de mitocondrias y cloroplastos, ya que incluso las proteínas oligoméricas pueden ser importadas desde el citosol sin desplegarse.

RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO



Todas las células eucariotas tienen un **retículo endoplasmático (ER**: *endoplasmic reticulum*). Normalmente, su membrana constituye más de la mitad del total de la membrana de la célula (véase la Tabla 12–2, p. 697). El ER está organizado en forma de una red laberíntica de túbulos ramificados y de sáculos aplanados que se extiende por todo el citoplasma

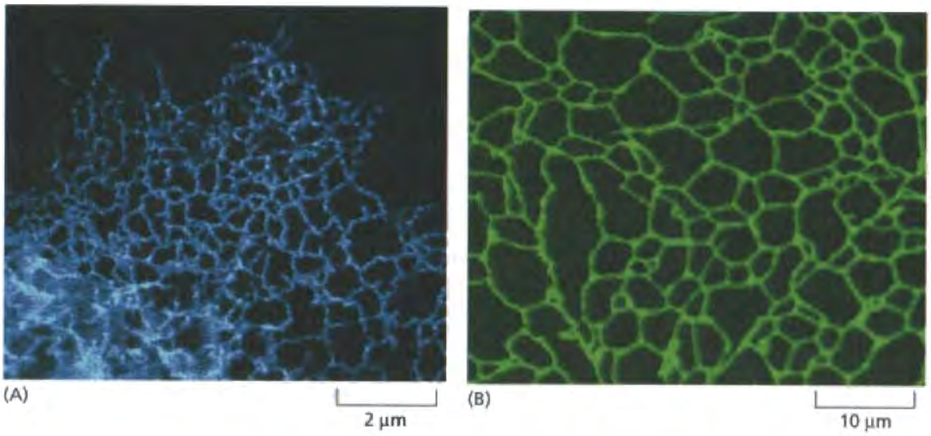


Figura 12–34 Micrografías de fluorescencia del retículo endoplasmático. <TCGT> (A) Parte de la red del ER en una célula de mamífero en cultivo, teñida con un anticuerpo que se une a una proteína retenida en el ER. El ER se extiende como una red por todo el citoplasma de la célula, de forma que todas las regiones del citosol se hallan cercanas a alguna porción de la membrana del ER. (B) Parte de la red del ER en una célula vegetal que ha sido modificada genéticamente para expresar una proteína fluorescente en el ER. (A, cortesía de Hugh Pelham; B, cortesía de Petra Boevink y Chris Hawes.)

(**Figura 12–34**). Los túbulos y los sáculos están interconectados y su membrana es continua con la membrana nuclear externa. Así, la membrana del ER y la membrana nuclear forman una lámina continua que define un único espacio interno denominado **lumen del ER** o también el *espacio de las vesículas del ER*, y que a menudo ocupa más del 10% del volumen celular total (véase la Tabla 12–1, p. 697).

El ER tiene un papel central en la biosíntesis celular y también constituye un almacén intracelular de Ca^{2+} utilizado en las señalizaciones celulares (se describe en el Capítulo 15). La membrana del ER es el lugar de producción de todas las proteínas transmembrana y lípidos de la mayoría de los orgánulos celulares, incluyendo el propio ER, el complejo de Golgi, los lisosomas, los endosomas, las vesículas secretoras y la membrana plasmática. La membrana del ER también fabrica la mayor parte de los lípidos de las membranas de las mitocondrias y de los peroxisomas. Además, casi todas las proteínas que serán secretadas al exterior celular –además de las que acabarán en el lumen del ER, en el complejo de Golgi o en los lisosomas– son transportadas inicialmente al lumen del ER.

El ER es estructural y funcionalmente diverso

Diferentes funciones del ER son esenciales para cada célula, pero la importancia relativa de cada una de ellas varía mucho entre los diferentes tipos celulares. Para asumir diversas demandas funcionales, diferentes regiones del ER se han especializado enormemente. Esta especialización funcional implica cambios extraordinarios de la estructura del ER, de forma que diferentes tipos celulares pueden presentar distintos tipos característicos de membrana de ER. Uno de los más destacables en el *ER rugoso*.

Las células de mamífero empiezan a importar la mayoría de proteínas al ER antes de que la cadena polipeptídica se haya acabado de sintetizar, es decir, que la importación es un proceso **cotraduccional** (**Figura 12–35**A). Por el contrario, la importación de las proteínas a

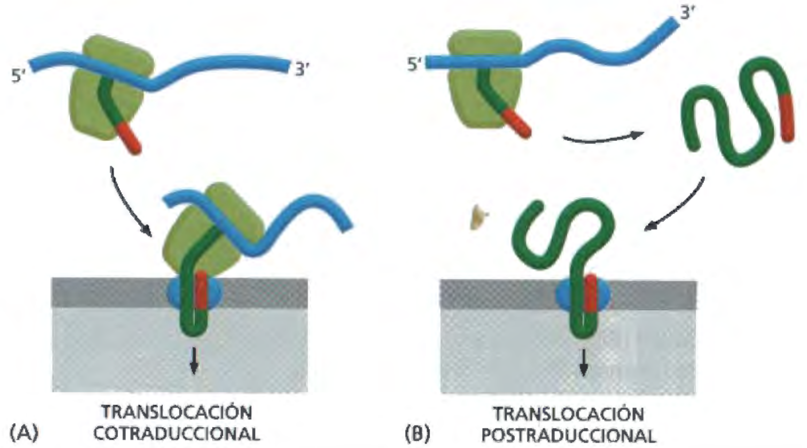
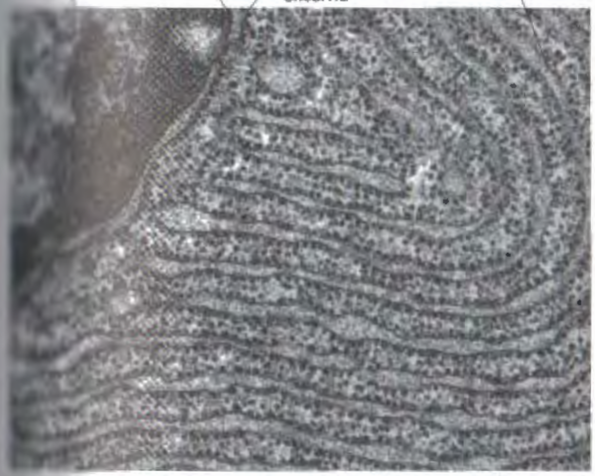
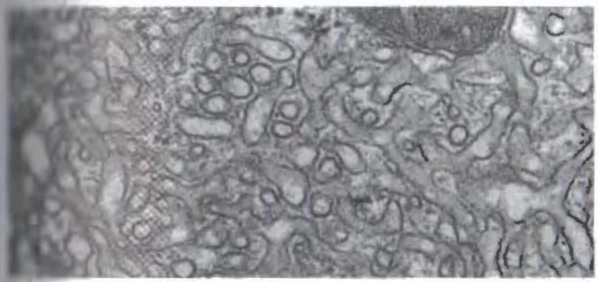


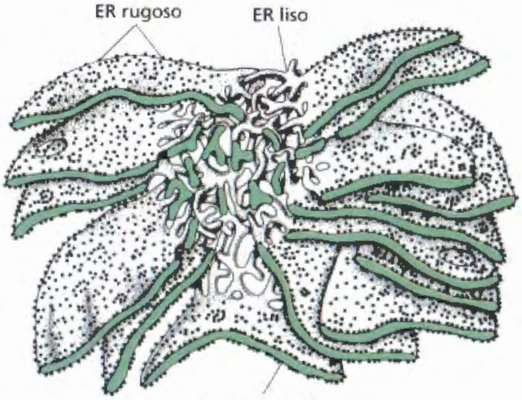
Figura 12–35 Translocación cotraduccional y postraduccional de proteínas. (A) Durante la translocación cotraduccional, los ribosomas se unen a la membrana del ER. (B) Por el contrario, después del proceso de translocación postraduccional, los ribosomas completan la síntesis de la proteína y la liberan.



(A)



(B)



(C)

Figura 12-36 El ER rugoso y liso. (A) Electromicrografía que muestra el ER rugoso en una célula pancreática exocrina, que cada día sintetiza y secreta grandes cantidades de enzimas digestivas. El citosol está lleno de sáculos del ER saturados de ribosomas y estrechamente apilados. En la parte superior izquierda se observa una porción del núcleo y de su envoltura; nótese que la membrana nuclear externa, que es continua con el ER, también está recubierta de ribosomas. (B) Abundante ER liso en una célula secretora de hormonas esteroideas. Esta electromicrografía muestra una célula de Leydig secretora de testosterona del testículo humano. (C) Reconstrucción tridimensional de una región de ER liso y rugoso en una célula hepática. El ER rugoso forma pilas de sáculos aplanados orientadas, con un espacio luminal de entre 20 y 30 nm de ancho. El ER liso está conectado a estos sáculos formando una red de tubos finos de un diámetro de entre 30 y 60 nm. (A, cortesía de Lelio Orci; B, cortesía de Daniel S. Friend; C, de R.V. Krstić, Ultrastructure of the Mammalian Cell. New York: Springer-Verlag, 1979.)

las mitocondrias, a los cloroplastos, al núcleo, y a los peroxisomas es un proceso **postraduccional** (Figura 12-35B). En el transporte cotraduccional, el ribosoma que está sintetizando la proteína está unido directamente a la membrana del ER y permite que un extremo de la proteína se esté translocando al ER mientras el resto de la cadena polipeptídica todavía se está fabricando. Estos ribosomas unidos a la membrana tapizan la superficie del ER, generando regiones denominadas **retículo endoplasmático rugoso** o **ER rugoso** (**Figura 12-36**A).

Las regiones del ER que carecen de ribosomas unidos se denominan **retículo endoplasmático liso** o **ER liso**. La mayoría de las células tienen regiones escasas de ER liso; el ER está constituido por zonas lisas y zonas rugosas. Las áreas del ER liso a partir de las que se generan las vesículas de transporte que contienen proteínas y lípidos acabados de sintetizar para ser transportados hasta el complejo de Golgi se denominan *ER de transición*. En determinadas células especializadas, el ER liso es abundante y desempeña otras funciones. Por ejemplo predomina en células especializadas en metabolismo lipídico como son las células que sintetizan hormonas esteroideas a partir del colesterol; el ER liso muy desarrollado acomoda las enzimas que fabrican colesterol y que lo modifican dando lugar a las hormonas (véase la Figura 12-36B).

El principal tipo celular del hígado, el *hepatocito*, también tiene un RE liso abundante. Es el principal lugar de producción de *partículas lipoproteicas*, que transportan lípidos por la corriente sanguínea a otros lugares del organismo. Las enzimas que sintetizan los componentes lipídicos de las partículas están localizadas en la membrana del ER liso, que también contiene enzimas que catalizan series de reacciones que destoxifican los fármacos liposolubles y compuestos producidos por el metabolismo que resultan perjudiciales. Las *reacciones de destoxificación* más estudiadas están catalizadas por la familia de enzimas de la familia de la *citocromo P450* las cuales catalizan una serie de reacciones en las que fármacos insolubles en agua o metabolitos, que de otro modo podrían acumularse a niveles tóxicos en las membranas celulares, son convertidos en moléculas lo bastante hidrosolubles como para abandonar la célula y ser secretadas por la orina. El ER rugoso no puede albergar un número suficientemente elevado de éstas y de otras enzimas necesarias para estos procesos, por lo

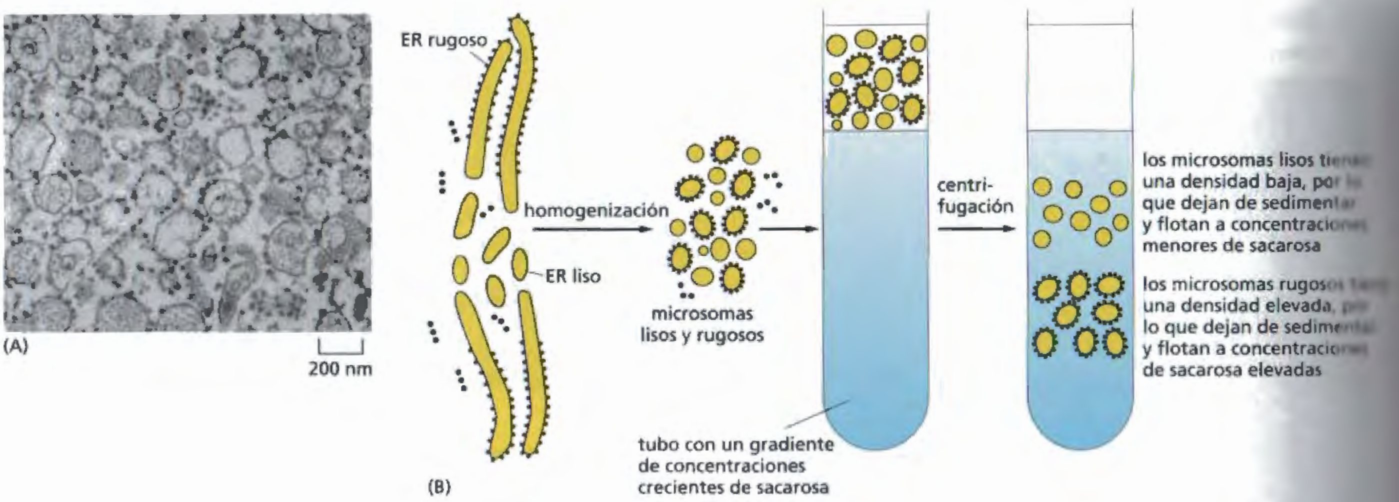


Figura 12–37 Procedimiento de aislamiento para purificar microsomas rugosos y lisos a partir del ER. (A) La electromicrografía de una sección ultrafina de fracciones de un ER rugoso purificado muestra una gran abundancia de vesículas recubiertas de ribosomas. (B) Cuando se sedimentan los dos tipos de microsomas hasta el equilibrio a través de un gradiente de sacarosa, se separan los dos tipos de microsomas en base a sus diferentes densidades. (A, cortesía de George Palade.)

cual una proporción importante de membranas del hepatocito corresponde por lo general a ER liso (Figura 12–36C; véase la Tabla 12–2).

Otra función crucial del ER en la mayoría de células eucariotas es la de secuestrar Ca^{2+} del citosol. La liberación de Ca^{2+} al citosol a partir del ER, y su posterior recaptura, se produce en muchas respuestas rápidas a las señales extracelulares, tal como se explica en el Capítulo 15. Una bomba de Ca^{2+} transporta Ca^{2+} desde el citosol hasta el lumen del ER, donde elevadas concentraciones de proteínas de unión a Ca^{2+} facilitan la acumulación de Ca^{2+}. En algunos tipos celulares, quizás en la mayoría de ellos, existen regiones específicas del ER especializadas en el almacenamiento de Ca^{2+}. Por ejemplo, las fibras musculares tienen una abundante región especializada del ER liso, llamada *retículo sarcoplasmático*. La liberación y la posterior recaptación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplasmático dispara respectivamente la contracción rápida y la relajación de las miofibrillas durante cada ronda de un ciclo de contracción muscular (descrito en el Capítulo 16).

Para estudiar las funciones y las características bioquímicas del ER es necesario aislarlo. En principio esto puede parecer una tarea imposible ya que el ER está muy entremezclado con otros componentes del citoplasma. Afortunadamente, cuando los tejidos o las células se rompen por homogeneización, el ER se rompe en fragmentos que se vuelven a sellar formando numerosas vesículas pequeñas (de unos 100-200 nm de diámetro) y cerradas denominadas **microsomas**. Los microsomas resultan bastante fáciles de purificar. Para el bioquímico, los microsomas representan versiones auténticas en miniatura del ER, que todavía son capaces de translocar proteínas, glicosilar proteínas, captar y liberar Ca^{2+} y sintetizar lípidos. Los microsomas derivados del ER rugoso están tapizados de ribosomas y reciben el nombre de *microsomas rugosos*. Los ribosomas se encuentran siempre en la superficie exterior de dichos microsomas y su interior es bioquímicamente equivalente al espacio del lumen del ER (**Figura 12–37**A).

En estos homogenados celulares también se encuentran muchas vesículas de tamaño similar al de los microsomas rugosos, pero sin ribosomas. Estos *microsomas lisos* derivan en parte de porciones lisas del ER y en parte de fragmentos vesiculados de la membrana plasmática, del complejo de Golgi, de los endosomas y de las mitocondrias (la proporción depende del tipo de tejido de que se trate). Por consiguiente, mientras que los microsomas rugosos derivan de porciones del ER rugoso, el origen de los "microsomas lisos" preparados a partir de células homogeneizadas no resulta fácil de determinar. Una excepción importante la constituye los microsomas lisos preparados a partir del hígado o de células musculares. Debido a las enormes cantidades de ER liso o de retículo sarcoplasmático respectivamente, la mayor parte de los microsomas lisos presentes en homogenados de estos tejidos derivan del ER liso. Los ribosomas unidos a los microsomas rugosos hacen que estos microsomas sean más densos que los lisos. Como resultado de ello, se utiliza la centrifugación de equilibrio para separar los microsomas rugosos de los lisos (Figura 12–37B). Los microsomas han resultado piezas clave en la determinación de los aspectos moleculares de la función del ER, como se explica a continuación.

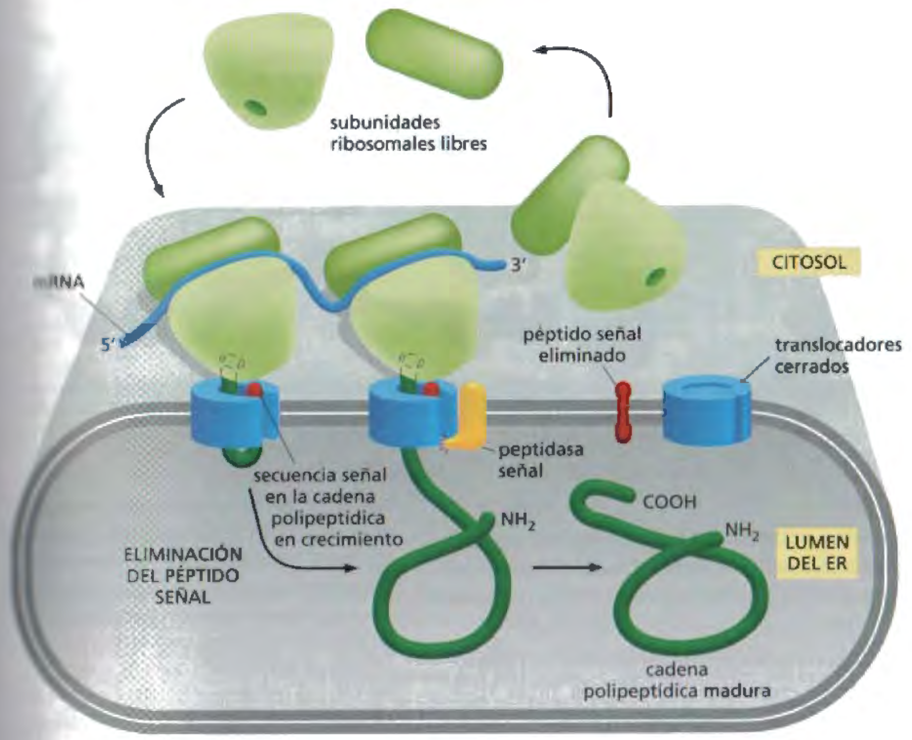


Figura 12-38 La hipótesis señal. Visión simplificada de la translocación de una proteína a través de la membrana del ER, tal como se propuso originalmente. Cuando la secuencia señal emerge del ribosoma, dirige al ribosoma hacia un translocador del ER que forma un poro en la membrana a través del cual el polipéptido se transloca. Una peptidasa señal, que está estrechamente asociada con el translocador, corta la secuencia señal durante la traducción y la proteína madura es liberada en el lumen del ER justo después de su síntesis. El translocador se cierra hasta que se une el ribosoma, de modo que se mantiene en todo momento la barrera de permeabilidad de la membrana.

Las secuencias señal fueron descubiertas en proteínas importadas al ER rugoso

El ER captura determinadas proteínas desde el citosol a medida que son sintetizadas. Estas proteínas son de dos tipos: *proteínas transmembrana*, que sólo son parcialmente translocadas a través de la membrana del ER y que, por tanto, se mantienen incluidas en ella, *y proteínas solubles en agua*, que son translocadas por completo a través de la membrana del ER y liberadas al lumen del ER. Algunas de las proteínas transmembrana actúan en el ER, pero muchas otras están destinadas a residir en la membrana plasmática o en la membrana de otro orgánulo. Las proteínas solubles en agua están destinadas a residir en el lumen de un orgánulo o a la secreción. Todas estas proteínas, con independencia de su destino posterior, son dirigidas a la membrana del ER por una **secuencia señal** que inicia su translocación a través de un mecanismo habitual.

Las secuencias señal (y con ellas la estrategia basada en la utilización de un péptido señal para dirigir el transporte de proteínas) fueron descubiertas por primera vez, a principios de la década de 1970, en proteínas de secreción translocadas a través de la membrana del ER como primer paso hacia su descarga final de la célula. En el experimento clave, el mRNA codificante de una proteína de secreción fue traducido mediante ribosomas *in vitro*. Cuando de este sistema libre de células se omitían los microsomas, la proteína sintetizada era ligeramente mayor que la proteína normal secretada; esta longitud extra era debida a la presencia de un *péptido líder* N-terminal. No obstante, en presencia de microsomas derivados del ER rugoso se producía una proteína de tamaño correcto. De acuerdo con la *hipótesis de la señal*, el líder es una secuencia señal que dirige la proteína secretada hacia la membrana del ER, donde es hidrolizada por una *peptidasa de señal* de la membrana del ER antes de que la cadena polipeptídica se complete (**Figura 12-38**). Los sistemas libres de células en los que se produce transporte de proteínas han proporcionado potentes procedimientos de ensayo para identificar, purificar y estudiar los diversos componentes de la maquinaria molecular responsable del proceso de importación de proteínas al ER.

Una partícula de reconocimiento de señal (SRP) dirige los péptidos señal de ER a un receptor específico de la membrana del ER

El péptido señal es guiado hasta la membrana del ER por lo menos mediante dos componentes: una **partícula de reconocimiento de la señal** (**SRP**: *signal-recognition particle*), que se une

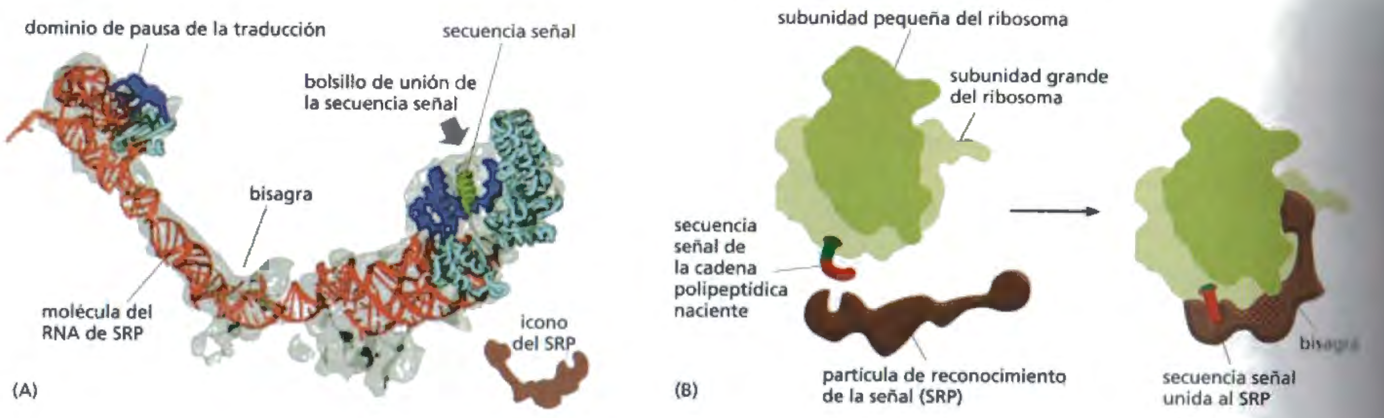


Figura 12–39 Partícula de reconocimiento de la señal (SRP: *signal-recognition particle*) (A) Una SRP de mamífero es un complejo alargado en forma de rodillo, formado por seis subunidades proteicas y una molécula de RNA (se muestra en *rojo*). El RNA del SRP constituye el esqueleto que une el dominio del SRI, que contiene el bolsillo de unión de la secuencia señal, al dominio responsable de pausar la traducción. La forma tridimensional del SRP (mostrada en *gris*) se determinó por microscopía crioelectrónica. Las estructuras cristalinas de las diferentes piezas del SRP están encajadas en la envoltura y se muestran como diagramas de varillas. Una secuencia señal unida se muestra como una *hélice verde*. (B) SRP unido al ribosoma, visualizado por microscopía crioelectrónica. El SRP se une a la subunidad mayor del ribosoma de forma que su bolsillo de unión a la secuencia señal queda situado cerca del lugar de aparición de la cadena naciente y su dominio de pausa de la traducción queda en la interfase entre las subunidades del ribosoma, donde interfiere con la unión del factor de elongación. (Adaptado de M. Halic et al., *Nature* 427:808-814, 2004. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

al péptido señal y viaja de forma cíclica entre la membrana del ER y el citosol, y un **receptor de SRP** presente en la membrana del ER. La SRP es una partícula compleja formada por seis cadenas polipeptídicas unidas a una pequeña molécula de RNA (**Figura 12–39**). En todas las células se han encontrado SRP y su receptor, lo cual indica que este mecanismo de direccionamiento de proteínas apareció pronto en la evolución y que ha sido muy conservado.

Las secuencias señal del ER varían mucho en su composición de aminoácidos, pero todas ellas tienen ocho o más aminoácidos no polares en su centro (véase la Tabla 12–3, p. 702). ¿De qué forma el SRP puede unirse a secuencias tan diferentes? La respuesta se ha obtenido a partir de la estructura deducida de un cristal de proteína SRP, en la que se observa que el lugar de unión de la secuencia señal es un gran bolsillo hidrofóbico recubierto con metioninas. Dado que las metioninas tienen una cadena lateral no ramificada y flexible, el bolsillo es suficientemente plástico para acomodar secuencias señales hidrofóbicas diferentes en secuencia, forma y tamaño.

La SRP es una estructura semejante a un rodillo que envuelve la subunidad mayor del ribosoma, de forma que uno de sus extremos se une a la secuencia señal cuando ésta emerge del ribosoma formando parte del péptido acabado de sintetizar. El otro extremo bloquea el lugar de unión del factor de elongación, en la interfase entre las subunidades mayor y menor del ribosoma (Figura 12–39). Este bloqueo para la síntesis de proteínas en cuanto el péptido señal ha salido del ribosoma. Probablemente esta pausa da tiempo suficiente al ribosoma para unirse a la membrana del ER antes de que se complete la síntesis de la cadena polipeptídica, asegurando así que la proteína no se liberará al citosol. Este dispositivo de seguridad puede ser especialmente importante en el caso de las hidrolasas secretadas y las lisosomales, que liberadas en el citosol podrían tener consecuencias negativas; sin embargo, las células que secretan grandes cantidades de hidrolasas toman la precaución añadida de disponer en su citosol de elevadas concentraciones de inhibidores de hidrolasas. La pausa también asegura que grandes porciones de una proteína que se puede plegar formando una estructura compacta, no lo haga antes de alcanzar el translocador de la membrana del ER. Así, a diferencia de la importación postraduccional de proteínas a la mitocondria y a los cloroplastos, las proteínas chaperonas no son necesarias para mantener desplegadas las proteínas.

Cuando el complejo ribosoma-SRP se ha formado, se une al receptor de SRP, que es un complejo proteico integral de membrana embebido en la membrana del ER rugoso. Esta interacción une el complejo SRP-ribosoma a un translocador de proteínas. Tanto el SRP como el receptor de SRP son entonces liberados y el translocador transfiere la cadena polipeptídica en crecimiento a través de la membrana (**Figura 12–40**).

Este proceso de transferencia cotraduccional da lugar a dos poblaciones de ribosomas en el citosol, separadas espacialmente. Los **ribosomas unidos a membrana**, anclados a la cara citosólica de la membrana del ER, participan en la síntesis de proteínas que se translocan al ER. Los **ribosomas libres**, no unidos a ninguna membrana, sintetizan todas las demás proteínas codificadas por el genoma nuclear. Los ribosomas unidos a membrana y los ribosomas libres son estructural y funcionalmente idénticos. Sólo se diferencian en el tipo de proteína que están sintetizando en un momento dado.

Dado que sobre una sola molécula de mRNA se pueden unir muchos ribosomas de forma simultánea, por lo general se forman *polirribosomas*, que quedan unidos a la membrana del ER dirigidos por las secuencias señal de muchas cadenas polipeptídicas en crecimiento (**Figura 12–41**A). Los ribosomas individuales asociados con una molécula de mRNA de este

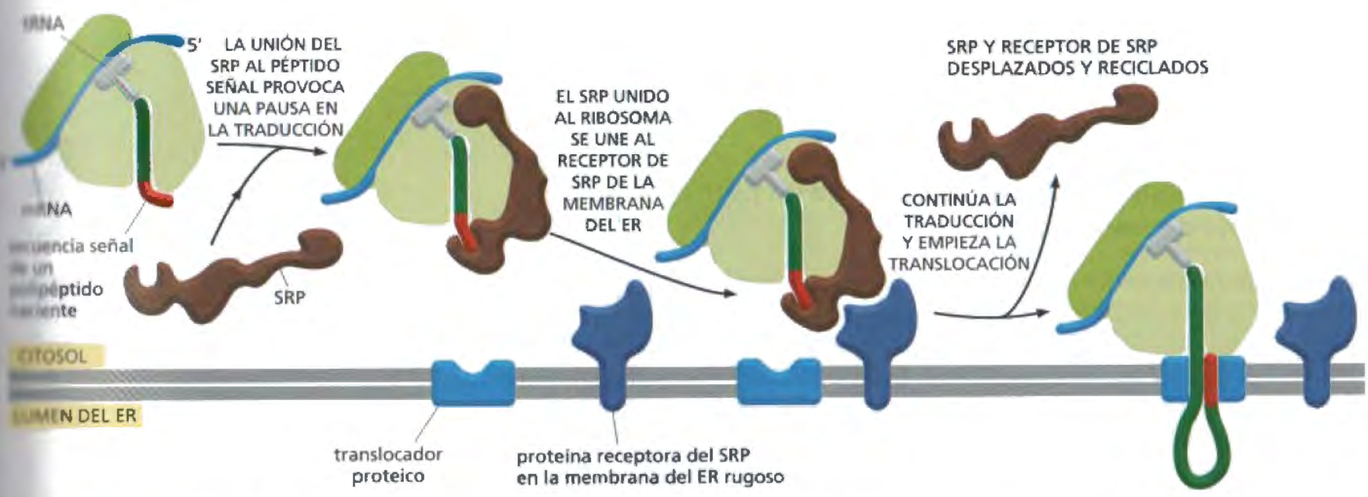


Figura 12-40 Manera en que las secuencias señal de ER y la SRP dirigen los ribosomas a la membrana del ER. <TTCC> Se cree que la SRP y la proteína receptora de SRP actúan de forma concertada. La SRP se une a la secuencia señal y al ribosoma, induciendo una pausa en la traducción. El receptor de SRP de la membrana del ER, que está formado por dos cadenas polipeptídicas, une el complejo SRP-ribosoma y lo dirige al translocador. A través de una reacción todavía muy poco conocida, la SRP y su receptor son liberados, dejando al ribosoma unido al translocador en la membrana del ER. Entonces el translocador inserta la cadena polipeptídica en la membrana y la transloca a través de la bicapa lipídica. Una de las proteínas de SRP y las dos cadenas del receptor de SRP contienen lugares de unión a GTP, por lo que parece que los cambios conformacionales que ocurren durante los ciclos de unión a GTP e hidrólisis (descritos en el Capítulo 15) aseguran que la liberación de SRP sólo se produzca después de que el ribosoma se una de forma correcta al translocador de la membrana del ER. El translocador está cerrado hasta que el ribosoma se ha unido a él, con lo que la barrera de permeabilidad que tiene la membrana del ER se mantiene siempre.

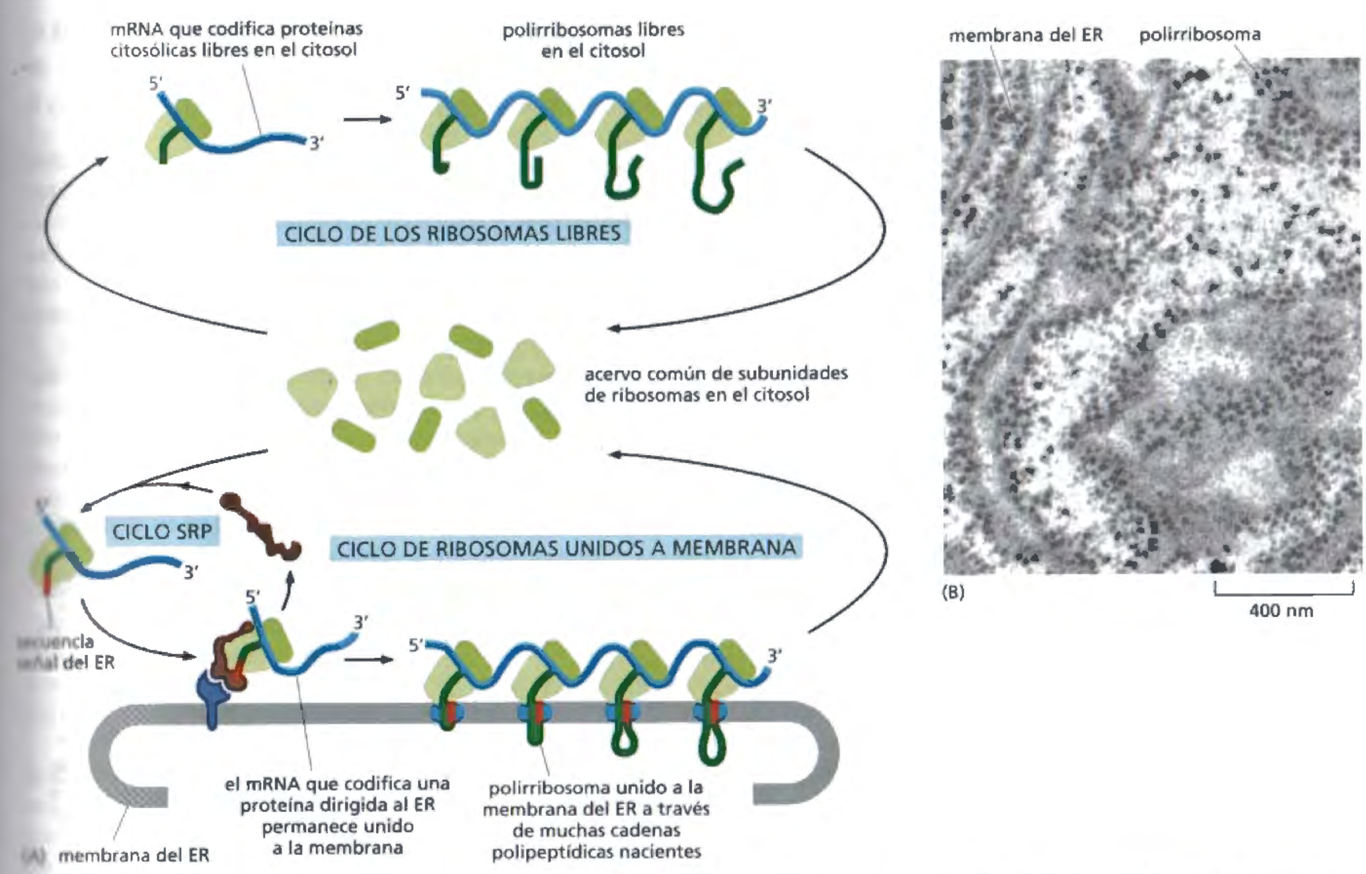


Figura 12-41 Ribosomas libres y ribosomas unidos a la membrana. (A) Un conjunto común de ribosomas sintetizan tanto las proteínas que permanecerán en el citosol como las que serán transportadas al ER. La secuencia señal de ER de una nueva cadena polipeptídica se une a un SRP, que dirige al ribosoma que la está traduciendo hacia la membrana del ER. La molécula de mRNA permanece unida de forma permanente al ER formando parte de un polirribosoma, mientras los ribosomas que se desplazan por esta cadena son reciclados; al final de cada ciclo de síntesis proteica, las subunidades ribosomales se separan y se reincorporan al conjunto común de subunidades de ribosomas del citosol. (B) Electromicrografía de una sección de polirribosomas unidos a la membrana del ER. El plano de la sección corta en algunos lugares el ER rugoso paralelo a la membrana y ofrece un aspecto de patrón en forma de rosetón de los polirribosomas. (B, cortesía de George Palade.)

tipo pueden volver al citosol cuando han acabado el proceso de traducción y mezclarse con el acervo de ribosomas libres. Sin embargo, el mRNA permanecerá unido a la membrana del ER a través de la población cambiante de ribosomas, cada uno de los cuales lo une transitoriamente a la membrana a través de su translocador (Figura 12–41B).

La cadena polipeptídica pasa a través de un poro acuoso del aparato de translocación

Durante mucho tiempo fue objeto de controversia si las cadenas polipeptídicas son transferidas a través de la membrana del ER en contacto directo con la bicapa lipídica o a través de un poro de un translocador proteico. El debate finalizó con la identificación del translocador; se demostró que forma un poro acuoso en la membrana a través del cual la cadena polipeptídica atraviesa la membrana. El corazón del translocador, denominado **complejo Sec61**, está formado por tres subunidades altamente conservadas desde las bacterias hasta las células eucariotas. Recientemente se ha determinado la estructura de Sec61 mediante cristalografía de rayos X. La estructura sugiere que unas hélices α de la subunidad mayor envuelven un poro central a través del cual la cadena polipeptídica atraviesa la membrana (**Figura 12–42**). El poro se cierra mediante una corta hélice que parece que mantiene cerrado el translocador cuando está inactivo y que se desplaza hacia un lado cuando participa en la transferencia de la cadena polipeptídica. De acuerdo con este modelo, el poro es una estructura cerrada dinámicamente que se abre de forma transitoria cuando una cadena polipeptídica atraviesa la membrana. Es importante que un translocador inactivo mantenga cerrado el poro de forma que la membrana permanezca impermeable a los iones, como el Ca^{2+}, ya que en caso contrario podrían salir del ER.

La estructura del complejo Sec61 sugiere que el poro también puede abrirse a lo largo de una junta de uno de sus lados. Esta apertura permite que una cadena peptídica que se está translocando acceda al corazón hidrofóbico de la membrana, un proceso que es importante tanto para la liberación al interior de la membrana del péptido señal una vez cortado de la cadena (véase Figura 12–38) como para la integración en la bicapa, de proteínas de membrana, como se describirá más adelante.

En las células eucariotas, cuatro complejos Sec61 forman un gran ensamblaje translocador que se puede visualizar sobre los ribosomas tras la solubilización con detergentes de las membranas del ER (**Figura 12–43**). Es probable que en un translocador eucariota no participen directamente en la translocación de la proteína los cuatro complejos Sec61. Algunos de ellos tienen que estar inactivos, proporcionando lugares de unión para el ribosoma y para proteínas accesorias que colaboran en el plegamiento de la cadena polipeptídica a medida que entra en el ER. De acuerdo con este punto de vista, los ribosomas unidos forman una unión estrecha con el translocador, de modo que el espacio del interior del ribosoma forma un continuo con el lumen del ER y no pueden escaparse moléculas del ER. Alternativamente, la estructura del complejo Sec61 sugiere que el poro del translocador puede formar un diafragma unido con fuerza alrededor de la cadena que se está translocando e impedir que se escapen del ER otras moléculas.

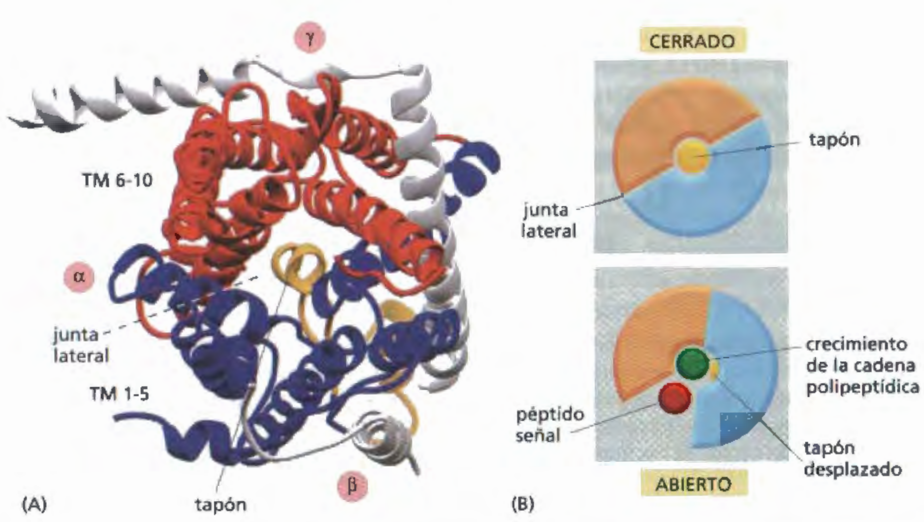


Figura 12–42 Estructura del complejo Sec61. (A) Vista superior de la estructura del complejo Sec61 de la arquea *Methanococcus jannaschii*, desde el lado citosólico de la membrana. En *azul* y en *rojo*, se muestra la subunidad α de Sec61; las dos pequeñas subunidades β y γ se muestran en *gris*. La corta hélice *amarilla* forma un tapón que sella el poro cuando el translocador está cerrado. Para abrirlo, el complejo se reorganiza retirando la hélice del camino de translocación. Parece que el poro del complejo Sec61 también puede abrirse lateralmente a lo largo de una junta. (B) Los modelos de los estados cerrado y abierto del translocador ilustran cómo podría ser liberada a la membrana una secuencia señal después de la apertura de la junta lateral. (A, de B. van der Berg et al., *Nature* 427:36-44, 2004. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

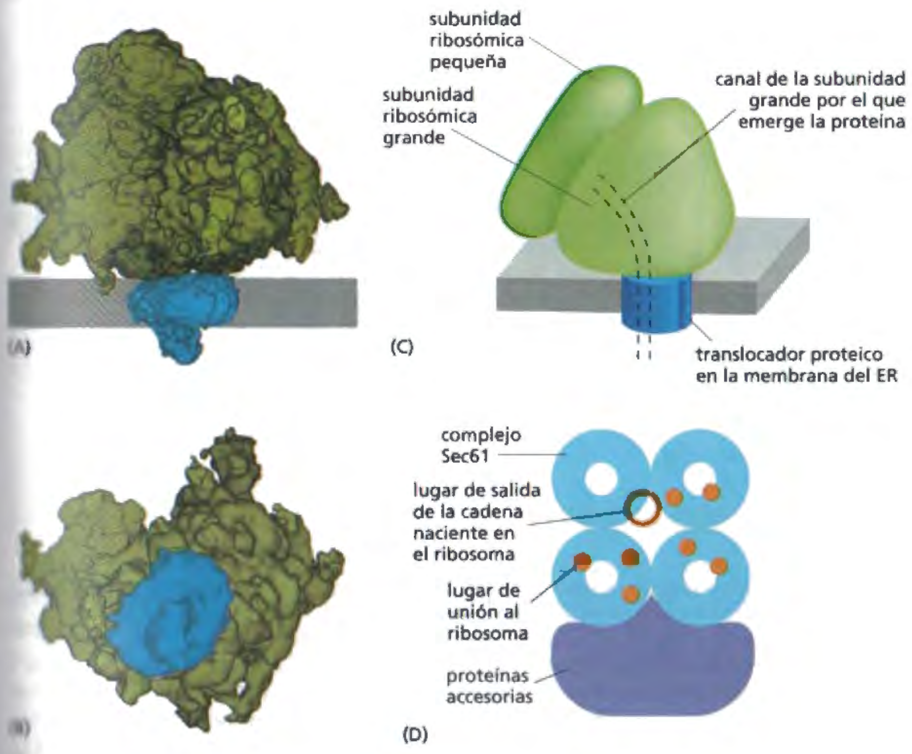


Figura 12–43 Un ribosoma unido a la proteína translocadora eucariota. (A) Reconstrucción del complejo a partir de imágenes tangenciales obtenidas mediante microscopía electrónica. (B) Una visión del translocador visto desde el lumen del ER. Se cree que el translocador tiene cuatro copias del complejo Sec61. (C) Esquema de un ribosoma unido a membrana que se une al translocador con el túnel de la subunidad mayor del ribosoma, a través del cual la cadena polipeptídica en crecimiento sale del ribosoma (véase Figura 6–70). (D) Un modelo esquemático de cómo se pueden organizar en el translocador cuatro complejos Sec61 y varias proteínas accesorias. Los *puntos rojos* indican los sitios de unión al ribosoma, vistos en una reconstrucción por microscopía electrónica; la *circunferencia roja* muestra la posición del final del túnel de salida del ribosoma. No se conoce cuál de los cuatro complejos Sec61 participa activamente en la translocación de la proteína. Los dominios de las proteínas accesorias se extienden a través de la membrana y forman la protuberancia luminal que se ve de perfil en (A). (A, B y C, adaptado de J.F. Ménétret et al., *J. Mol. Biol.* 348:445-457, 2005. Con la autorización de Academic Press.)

La translocación a través de la membrana del ER no siempre requiere que se esté produciendo el crecimiento de la cadena polipeptídica

Como hemos visto, la translocación de proteínas en el interior de las mitocondrias, los cloroplastos y los peroxisomas es postraduccional, es decir, que se produce después de que la proteína haya sido completamente sintetizada y se haya liberado al citosol, mientras que por lo general la translocación a través de la membrana del ER tiene lugar durante la traducción (es decir, es cotraduccional). Este fenómeno explica por qué los ribosomas se unen a la membrana del ER pero no a otros orgánulos.

Sin embargo, algunas proteínas sintetizadas por completo son importadas por el ER, lo cual demuestra que la translocación no siempre requiere de la traducción. La translocación proteica postraduccional es especialmente frecuente a través de la membrana del ER en células de levaduras y a través de la membrana plasmática bacteriana (la cual se cree que está relacionada desde un punto de vista evolutivo con el ER; véase la Figura 12–4). Para poder realizar una translocación postraduccional, el translocador necesita proteínas accesorias que introduzcan el polipéptido en el poro e impulsen la translocación (**Figura 12–44**). En las bacterias, la proteína motor de translocación, la *ATPasa SecA*, se une a la cara citosólica del translocador, donde sufre cambios conformacionales impulsados por la hidrólisis de ATP. Cada vez que una molécula de ATP es hidrolizada, una porción de SecA se introduce en el poro de translocación y empuja a su interior un corto fragmento de la proteína transportada. Como resultado de este mecanismo de trinquete, la proteína SecA empuja de forma progresiva a la cadena polipeptídica de la proteína transportada a través de la membrana.

Las células eucariotas utilizan un juego diferente de proteínas accesorias del complejo Sec61. Estas proteínas atraviesan la membrana del ER y utilizan un pequeño dominio en la cara luminal de la membrana del ER para situar una proteína chaperona similar a Hsp70 (denominada *BiP*: ***binding protein***; proteína de unión) sobre la cadena polipeptídica a medida que ésta emerge en el lumen del ER. La translocación unidireccional es impulsada mediante ciclos de unión y liberación de BiP, como se ha descrito previamente para las proteínas Hsp70 mitocondriales que atraen las proteínas a través de las membranas mitocondriales.

Las proteínas que son transportadas al interior del ER, mediante un mecanismo de translocación postraduccional, en primer lugar son liberadas en el citosol, donde evitan plegarse uniéndose a chaperonas, como hemos descrito al considerar las proteínas destinadas a las mitocondrias y a los cloroplastos.

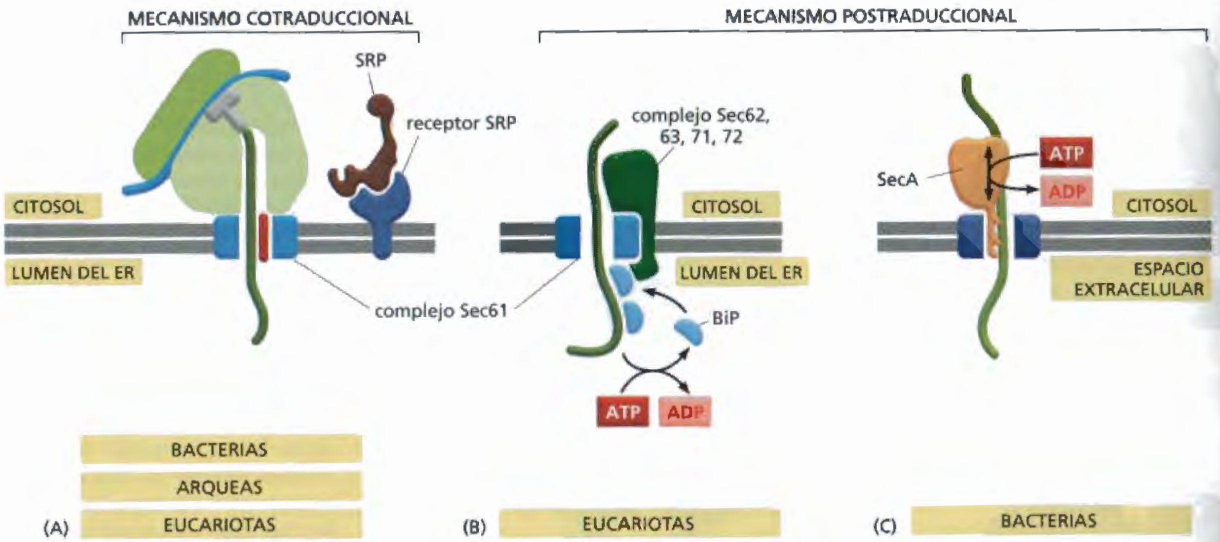


Figura 12-44 Tres maneras mediante las que se produce la translocación de proteínas a través de translocadores estructuralmente similares. (A) Translocación cotraduccional. El ribosoma es arrastrado a la membrana por el SRP y su receptor y se engarza con la proteína translocadora Sec61. La cadena polipeptídica en crecimiento se desliza a través de la membrana a medida que se sintetiza. No hace falta energía adicional, ya que el único camino posible para la cadena en crecimiento es atravesar la membrana. (B) Translocación postraduccional en células eucariotas. Un complejo adicional formado por las proteínas Sec62, Sec63, Sec71 y Sec72 se une al translocador Sec61 y deposita las moléculas BiP sobre la cadena que se transloca a medida que esta emerge en el lumen del ER. Ciclos de unión y separación de BiP impulsados por la hidrólisis de ATP atraen la proteína hacia el lumen, un mecanismo que recuerda el mecanismo de importación de proteínas mitocondriales de la Figura 12-26. (C) Translocación postraduccional en bacterias. La cadena polipeptídica completa es introducida en el translocador de la membrana plasmática desde el lado citosólico por la ATPasa SecA. Los cambios conformacionales impulsados por la hidrólisis de ATP producen un desplazamiento similar al de un pistón en SecA, que empuja en cada ciclo aproximadamente 20 aminoácidos de la cadena polipeptídica a través del poro del translocador. La vía Sec utilizada por el translocador proteico a través del tilacoide en los cloroplastos utiliza un mecanismo similar (véase Figura 12-29B).
Mientras que tanto los translocadores Sec61, SRP como el receptor de SRP se encuentran en todos los organismos, SecA sólo se encuentra en bacterias y las proteínas Sec62, Sec63, Sec71 y Sec72 en células eucariotas. (Adaptado de P. Walter y A.E. Johnson. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 10:87-119, 1994. Con la autorización de Annual Reviews.)

En las proteínas transmembrana de paso único, queda una sola secuencia señal interna de ER, en la bicapa lipídica, que adopta forma de hélice α y atraviesa la membrana

Parece que la secuencia señal de la cadena polipeptídica en crecimiento desencadena la apertura del poro de la proteína translocadora: después de que la secuencia señal se ha liberado del SRP y que la cadena en crecimiento ha alcanzado una longitud suficiente, la secuencia señal se une a un sitio de unión situado en el mismo poro y abre así el poro. Por lo tanto, la secuencia ER es reconocida dos veces: primero por un SRP en el citosol y después por un lugar de unión en el poro del translocador proteico, donde actúa como **señal de inicio de transferencia** (o péptido de inicio de transferencia) que abre el poro (en la **Figura 12-45** se ilustra para el caso de una proteína soluble del ER). El reconocimiento dual colabora a asegurar que únicamente entrarán en el lumen del ER las proteínas adecuadas.

Mientras está unida al poro de translocación, una secuencia señal está en contacto no sólo con el complejo Sec6l, que forma las paredes del poro, sino también con el núcleo lipídico hidrofóbico de la membrana. Este hecho fue demostrado mediante experimentos de entrecruzamiento en los que se pueden unir de forma covalente la secuencia señal y las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos. Cuando la cadena polipeptídica naciente ha crecido bastante, la peptidasa señal de ER corta las secuencias señal y las libera desde el poro a la membrana plasmática, donde rápidamente son degradadas a aminoácidos por otras proteasas de la membrana del ER. Para liberar la secuencia señal en la membrana, el translocador debe abrirse de forma lateral. Por lo tanto, el translocador se abre en dos direcciones: formando un poro a través de la membrana que permite a las regiones hidrofílicas de las proteínas atravesar la bicapa lipídica o lateralmente dentro de la membrana permitiendo que las regiones hidrofóbicas de las proteínas puedan situarse en el interior de la bicapa. La apertura lateral del poro es una etapa crucial durante el proceso de integración de las proteínas de membrana.

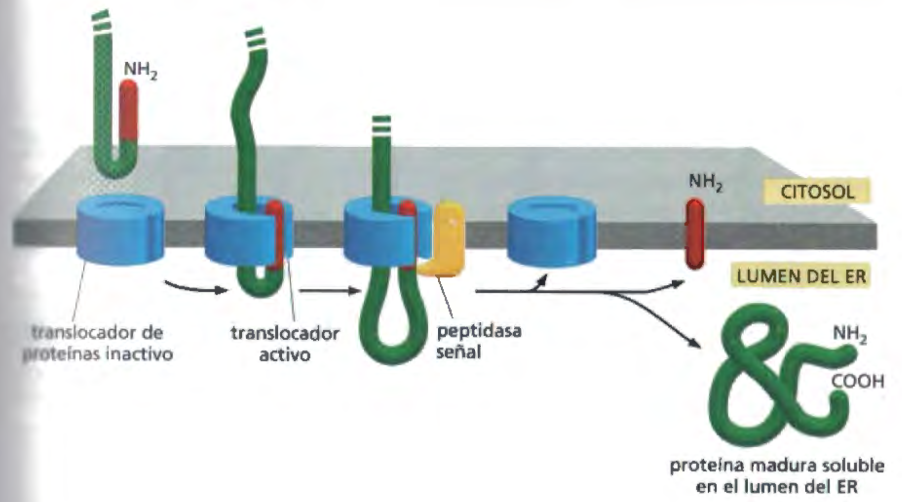


Figura 12–45 Modelo que explica cómo puede ser translocada una proteína soluble a través de la membrana del ER. Al unirse a la secuencia señal del ER (que actúa como señal de inicio de translocación), el translocador abre el poro de translocación permitiendo el paso de la cadena polipeptídica a través de la bicapa lipídica como un bucle. Cuando toda la cadena polipeptídica ha sido translocada, el poro se cierra y se abre lateralmente para que la secuencia señal difunda en la bicapa, donde es degradada con rapidez. (En esta y en las tres figuras que siguen, se han omitido los ribosomas para mayor claridad.)

La integración de las proteínas de membrana requiere que algunas zonas de la cadena polipeptídica sean translocadas a través de la bicapa lipídica mientras que otras no lo sean. A pesar de esta complejidad adicional, todos los tipos de inserción de las proteínas de membrana son variantes de la secuencia de acontecimientos descrita para la transferencia de proteínas solubles en la luz del ER. Empezaremos describiendo las tres vías a través de las cuales las **proteínas transmembrana de paso único** (véase Figura 10–19) son insertadas en el ER.

En el caso más sencillo, una secuencia señal N-terminal inicia la translocación igual que en el caso de una proteína soluble, pero un segmento hidrofóbico adicional de la cadena polipeptídica para el proceso de transferencia antes de que toda la cadena polipeptídica se haya translocado. Esta **señal de paro de la translocación** ancla la proteína en la membrana después de que la secuencia señal del ER (señal de inicio de translocación) haya sido liberada del translocador y eliminada (**Figura 12–46**). El mecanismo de apertura lateral del poro transfiere la secuencia de paro al interior de la bicapa, donde permanece como un segmento transmembrana único en forma de hélice α, con el extremo N-terminal de la proteína en la cara luminal de la membrana y el extremo C en la cara citosólica.

En los otros dos casos, la secuencia señal no se localiza en el extremo N-terminal de la proteína sino que es interna. Al igual que ocurre en las secuencias señal N-terminales, el SRP también se une a una secuencia interna. El SRP une el ribosoma que sintetiza la proteína a la membrana del ER y actúa como señal de inicio de transferencia que empieza la translocación de la proteína. Después de liberarse del translocador, la secuencia interna

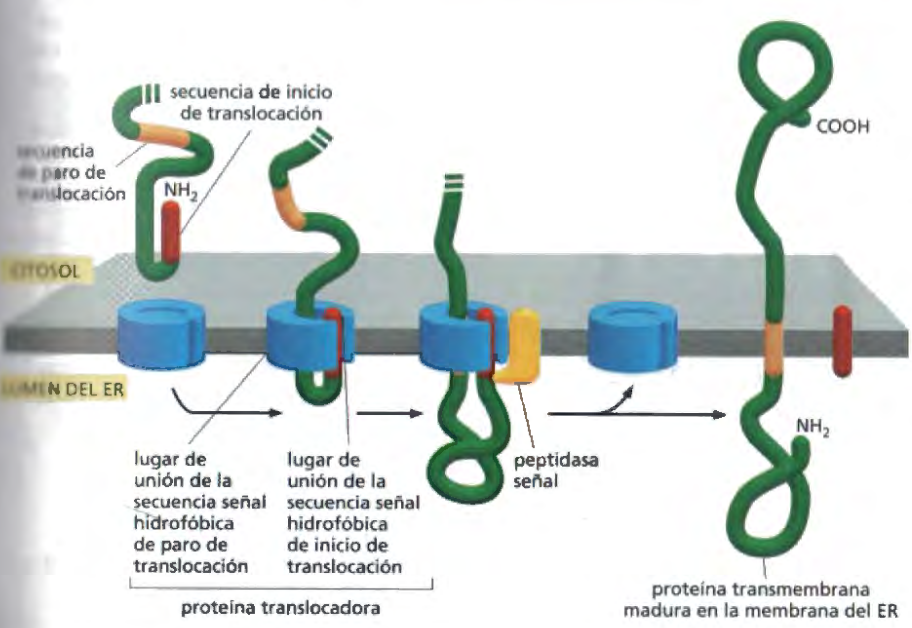


Figura 12–46 Cómo se integra en la membrana del ER una proteína transmembrana de paso único después de la eliminación de la secuencia señal. En este modelo, el proceso de translocación cotraduccional se inicia por una secuencia señal N-terminal del ER (*en rojo*) que actúa como señal de inicio de translocación, como en la Figura 12–45. Sin embargo, además de la secuencia de inicio de translocación, la proteína también contiene una secuencia de paro de translocación (*en naranja*). Cuando la secuencia señal de paro de translocación entra en el translocador e interactúa con un lugar de unión determinado, el translocador cambia de conformación y descarga la proteína lateralmente en la bicapa lipídica.

de inicio de transferencia permanece en la bicapa lipídica como una hélice α que atraviesa la membrana.

Las secuencias internas de inicio de transferencia se pueden unir al aparato de translocación en una de las dos orientaciones; este hecho determina qué segmento proteico (el anterior o el posterior del péptido de inicio de transferencia) se desplazará a través de la membrana hacia el lumen del ER. En un caso, la proteína de membrana resultante tendrá su extremo C-terminal en la cara luminal (paso A en la **Figura 12–47**) mientras que en el otro caso, en el lado luminal estará su extremo N-terminal (paso B en la Figura 12–47). La orientación de la secuencia de inicio de translocación depende de la distribución de los aminoácidos cargados vecinos, tal como se describe en la figura.

Combinaciones de señales de inicio y de paro de translocación determinan la topología de las proteínas transmembrana de paso múltiple

En las **proteínas transmembrana de paso múltiple**, la cadena polipeptídica atraviesa repetidamente, de una parte a otra, la bicapa lipídica (véase la Figura 10–19). Se cree que en estas proteínas un péptido señal interno actúa como señal de inicio de transferencia iniciando la translocación, la cual continúa hasta que se alcanza un péptido de paro de translocación. Por ejemplo, en las proteínas de doble paso, el polipéptido se libera de la bicapa en esta etapa (**Figura 12–48**). En las proteínas de paso múltiple, más complejas, en las cuales existen muchas hélices α hidrofóbicas que atraviesan la bicapa, una segunda secuencia de inicio de

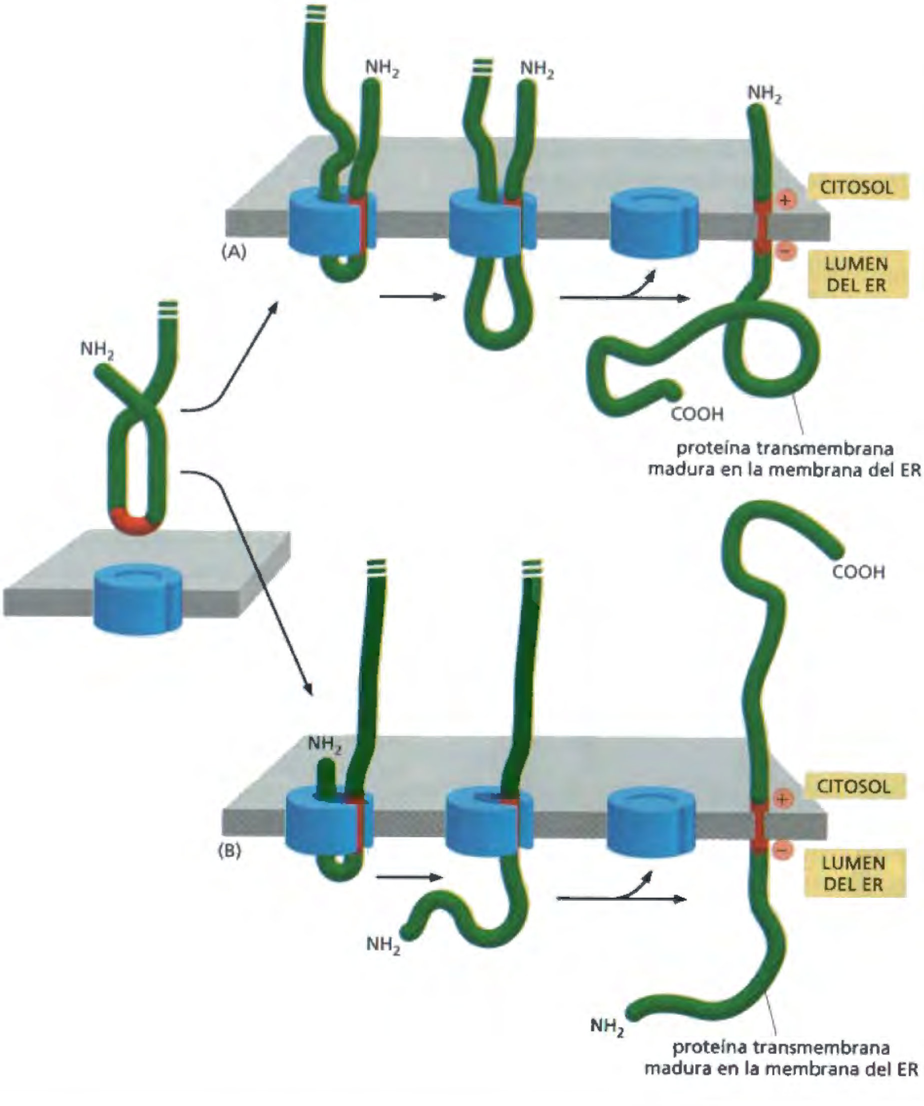


Figura 12–47 Integración de una proteína transmembrana de paso único con una secuencia señal interna en la membrana del ER. Una secuencia señal interna del ER, que actúa como señal de inicio de translocación, puede unirse al translocador de una de las dos vías diferentes, guiando al lumen del ER tanto el segmento C-terminal (vía A) como el segmento N-terminal (vía B) de una proteína de membrana. Las proteínas son dirigidas a una u otra de las dos vías según las características de la cadena polipeptídica que flanquea la secuencia interna de inicio de la transferencia: si en la cadena hay más aminoácidos cargados positivamente inmediatamente *antes* del núcleo hidrofóbico de la secuencia de inicio de translocación de los que hay después, la proteína de membrana se inserta en el translocador en la orientación mostrada en la vía A, mientras que si hay más aminoácidos cargados positivamente justo *después* del núcleo hidrofóbico de la secuencia de inicio de translocación, la proteína de membrana se insertará en el translocador en la orientación mostrada en la vía B. Debido a que no se puede iniciar la translocación antes de que la secuencia de inicio de translocación salga del ribosoma, la translocación del fragmento N-terminal de la proteína mostrada en (B) solamente tendrá lugar tras la síntesis completa de esta secuencia.

Obsérvese que existen dos rutas que permiten la inserción de una proteína transmembrana de paso único cuyos aminoácidos N-terminal se sitúen en el lumen del ER: el que se muestra en la Figura 12–46 y el que se muestra en (B).

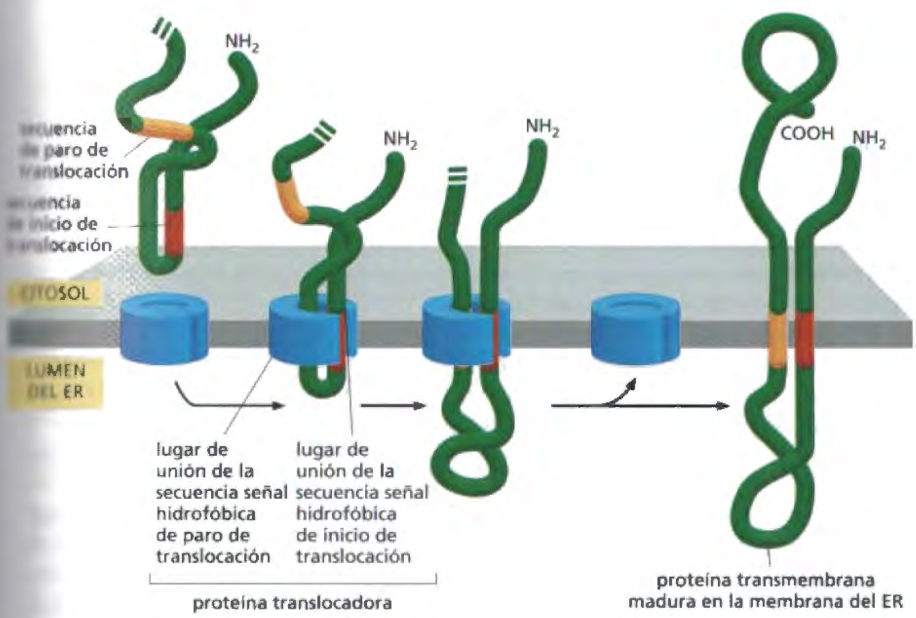


Figura 12–48 Integración en la membrana del ER de una proteína transmembrana de paso doble con una secuencia señal de ER interna. En esta proteína, una secuencia señal de ER interna actúa como señal de inicio de translocación (como en la Figura 12–47) e inicia la translocación de la región C-terminal de la proteína. En algún momento después de que la secuencia de paro de translocación penetre en el translocador, éste descarga lateralmente la secuencia en la membrana.

translocación reinicia la translocación de la cadena, la cual se produce hasta que se alcanza la siguiente secuencia de final de translocación, y así sucesivamente para posteriores secuencias de inicio y de final de translocación (**Figura 12–49**).

Una secuencia señal hidrofóbica determinada actuará como una secuencia de inicio o de paro dependiendo de su localización en la cadena polipeptídica, ya que su función se puede cambiar si se modifica su posición en la proteína mediante técnicas de DNA recombinante. Así, la distinción entre secuencias de inicio y de paro de translocación depende, fundamentalmente, del orden en el que se suceden en la cadena polipeptídica naciente. Parece que la SRP empieza buscando los segmentos hidrofóbicos de la cadena polipeptídica desplegada empezando por su extremo N-terminal, y va progresando hacia el extremo C-terminal, en la misma dirección en la que se va sintetizando la proteína. La SRP reconoce el primer segmento apropiado y, por lo tanto, fija la "pauta de lectura" correspondiente para la integración en la membrana: tras el inicio de la translocación, el translocador reconoce el próximo segmento hidrofóbico en el sentido de la translocación como una secuencia de paro de translocación, lo cual originará que la región de la cadena polipeptídica comprendida entre ambos segmentos hidrofóbicos se inserte a través de la membrana. Un proceso similar de búsqueda continúa hasta que todas las regiones hidrofóbicas de la proteína se han insertado en la membrana.

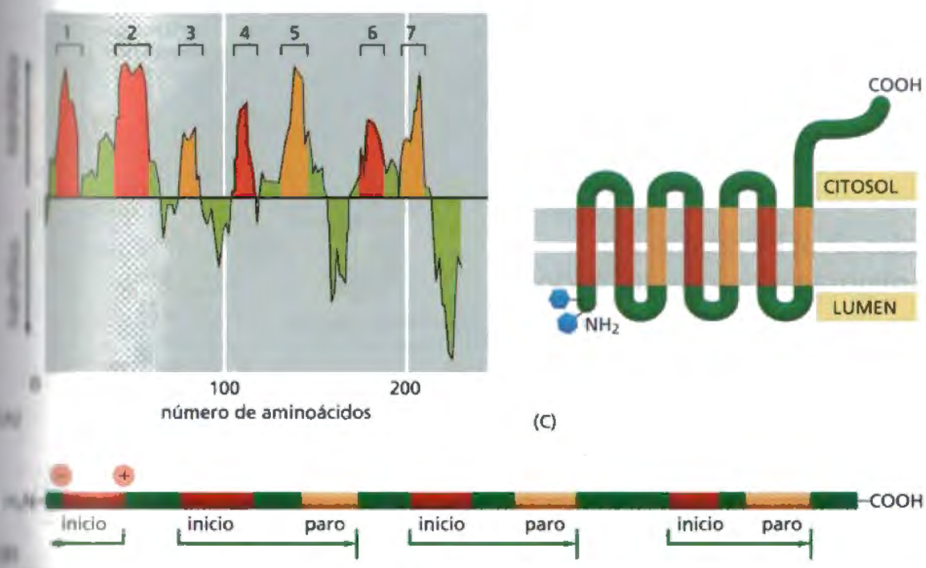


Figura 12–49 Inserción de la rodopsina, una proteína de membrana de paso múltiple, en la membrana del ER. La rodopsina es la proteína sensible a la luz de los fotorreceptores de las células de la retina de los mamíferos (descrita en el Capítulo 15). (A) Un gráfico de hidrofobicidad identifica siete cortas regiones hidrofóbicas en la rodopsina. (B) La región hidrofóbica próxima al N-terminal actúa como señal de inicio de translocación, haciendo que la región N-terminal anterior atraviese la membrana del ER. Los péptidos hidrofóbicos siguientes actuarán alternativamente como señales de inicio y de paro de translocación. (C) La rodopsina integrada por completo tiene su extremo N-terminal situado en el lumen del ER y su extremo C-terminal localizado en el citosol. Los *hexágonos azules* representan oligosacáridos unidos covalentemente. Las flechas indican las parejas de señales de inicio y de paro que se han insertado en el translocador.

Puesto que las proteínas de membrana siempre son insertadas a partir de la cara citosólica del ER, si se sigue este sistema programado todas las copias de la misma cadena polipeptídica tendrán la misma orientación general en la bicapa. Esto genera una membrana del ER asimétrica en la que los dominios de proteína expuestos en una cara son diferentes de los que están expuestos en la otra cara. Esta asimetría se mantiene durante los diversos procesos de gemación y fusión de membrana que se producen al transportar las proteínas fabricadas en el ER a otras membranas celulares (explicado en el Capítulo 13). Por lo tanto, la vía por la cual una proteína recién sintetizada es insertada en la membrana del ER determina la orientación de la proteína también en otras membranas.

Cuando en el laboratorio se disocian proteínas de una membrana y se reconstituyen en vesículas lipídicas artificiales, por lo general se obtiene una mezcla al azar de orientaciones dentro-fuera de las proteínas. Por ello, parece que la asimetría de las proteínas que se observa en las membranas celulares no es debida a las propiedades inherentes de la proteína sino que es el resultado del proceso por el que las proteínas son insertadas en la membrana del ER desde el citosol.

Las cadenas polipeptídicas translocadas se pliegan y se ensamblan en el lumen del ER rugoso

Muchas de las proteínas presentes en el lumen del ER sólo están en tránsito, *en ruta* hacia otros destinos; sin embargo, otras residen normalmente en el ER y se hallan en elevadas concentraciones. Estas **proteínas residentes del ER** presentan en su extremo C-terminal una **señal de retención en el ER** de cuatro aminoácidos, que es responsable de que la proteína quede retenida en el ER (véase la Tabla 12–3; descrito en el Capítulo 13). Algunas de estas proteínas actúan como catalizadores que ayudan a otras muchas proteínas, que son translocadas al ER, a plegarse y a ensamblarse de forma correcta.

Una proteína importante residente en el ER es la *proteína disulfuro isomerasa (PDI)*, que cataliza la oxidación de los grupos sulfhidrilo libres (SH) de las cisteínas formando enlaces disulfuro (S–S). Casi todas las cisteínas de los dominios proteicos expuestos al espacio extracelular o al lumen de los orgánulos en la vía endocítica o secretora están unidos por enlaces disulfuro. Por el contrario, se forman muy pocos enlaces disulfuro en los dominios expuestos al citosol debido a que es un ambiente reductor.

Otra proteína residente del ER es la proteína chaperona **BiP**. Ya hemos explicado cómo BiP atrae las proteínas después de su traducción hacia el interior del ER a través del translocador del ER. Como otras chaperonas, BiP reconoce a las proteínas plegadas de forma incorrecta, así como a las subunidades proteicas que aún no se han ensamblado en sus complejos oligoméricos. Realiza esta función uniéndose a secuencias de aminoácidos expuestos que normalmente están escondidos en el interior de las cadenas polipeptídicas que están plegadas o ensambladas de forma correcta. Un ejemplo de un lugar de unión de BiP es una secuencia de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos que habitualmente estarían ocultos en una lámina β. Cuando BiP se ha unido a la proteína, evita su agregación y ayuda a mantener las proteínas en el ER (y por tanto fuera del complejo de Golgi y de otras etapas posteriores de la ruta de secreción). Como en el caso de otros miembros de la familia de proteínas Hsp70, que se unen a proteínas no plegadas y facilitan su importación a las mitocondrias y a los cloroplastos, la proteína BiP hidroliza ATP obteniendo la energía necesaria para ayudar a las proteínas a translocarse postraduccionalmente al interior del ER. También facilita el plegado de éstas y otras proteínas.

La mayoría de proteínas sintetizadas en el ER rugoso son glucosiladas por la adición de un oligosacárido común unido a *N*

La adición covalente de azúcares a las proteínas es una de las principales funciones biosintéticas del ER. Alrededor de la mitad de las proteínas eucariotas están glucosiladas. La mayoría de las proteínas solubles y unidas a la membrana que son fabricadas en el lumen del ER –incluyendo las destinadas a ser transportadas al complejo de Golgi, los lisosomas, la membrana plasmática o al espacio extracelular– son **glucoproteínas**. Por el contrario, muy pocas proteínas del citosol están glucosiladas y las que lo están contienen una modificación de azúcares muy sencillo: la adición de un grupo *N*-acetilglucosamina a un residuo serina o treonina de la proteína.

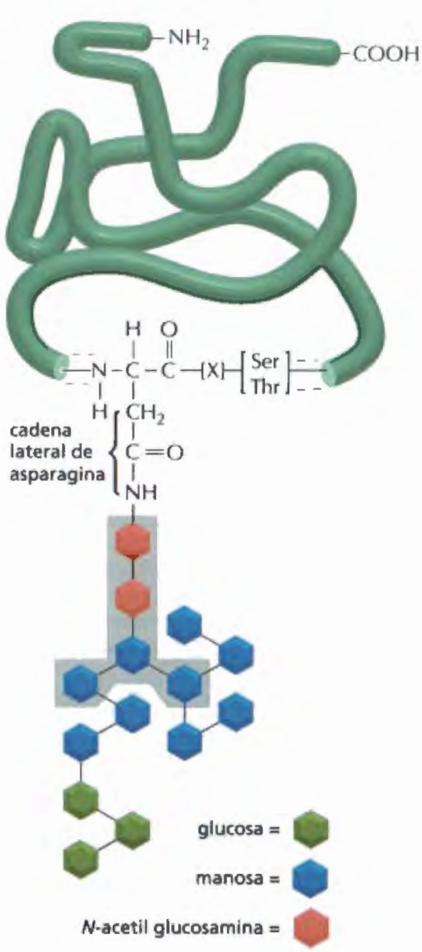


Figura 12–50 El precursor del oligosacárido unido a asparagina (unido a *N*) que es añadido a la mayoría de las proteínas en la membrana del ER rugoso. Los cinco residuos de azúcar mostrados en la *zona gris* forman la "región central" de este oligosacárido. En el complejo de Golgi se produce una profunda reordenación y recorte de los azúcares y en muchas glucoproteínas únicamente sobreviven a este proceso estos cinco residuos. Sólo se glucosilan las asparaginas que se hallan en la secuencia Asn-X-Ser o Asn-X-Thr (siendo X cualquier aminoácido que no sea la prolina). Estas dos secuencias se presentan en frecuencias mucho menores en glucoproteínas que en proteínas citosólicas no glucosiladas; sin lugar a dudas, durante la evolución de las proteínas ha habido una presión selectiva en contra de estas secuencias, probablemente porque la glucosilación en demasiados residuos podría interferir con el plegamiento de la proteína.

Un avance importante en la comprensión del proceso de **glucosilación proteica** fue el descubrimiento de que en el ER se transfiere *en bloque* a las proteínas un *oligosacárido preformado* (compuesto de *N*-acetilglucosamina, manosa y glucosa, con un total de 14 residuos de azúcar). Dado que este oligosacárido siempre es transferido al grupo NH_2 de la cadena lateral de un residuo de asparagina, se le denomina *N-oligosacárido* o *unido a asparagina* (**Figura 12–50**). La transferencia está catalizada por un complejo enzimático, una *oligosacárido transferasa*, que se halla unida a la membrana, y cuyo sitio activo está expuesto a la superficie luminal de la membrana del ER, lo cual explica por qué las proteínas citosólicas no son glucosiladas de esta manera. Una molécula lipídica especial, denominada **dolicol**, mantiene el oligosacárido precursor en la membrana del ER. Transfiere esta cadena de oligosacárido a la asparagina diana a través de una sola etapa enzimática inmediatamente después de que este aminoácido aparezca en el lumen del ER durante la translocación de la proteína (**Figura 12–51**). Una copia de la oligosacárido transferasa está asociada a cada translocador de proteína, permitiéndole escanear y glucosilar de forma eficiente la cadena polipeptídica entrante.

El oligosacárido precursor está unido al lípido dolicol mediante un enlace fosfato de alta energía, el cual proporciona la energía de activación necesaria para la reacción de glucosilación ilustrada en la Figura 12–51. El oligosacárido completo se construye azúcar a azúcar sobre esta molécula de lípido unido a la membrana y después es transferido a una proteína. Los azúcares son activados primero en el citosol mediante la formación de *intermediarios azúcar-nucleótido*, que ceden su azúcar (directa o indirectamente) al lípido, siguiendo una secuencia ordenada. En parte a través de este proceso, el oligosacárido unido al lípido es translocado con la ayuda de un transportador, desde la cara citosólica a la luminal de la membrana del ER (**Figura 12–52**).

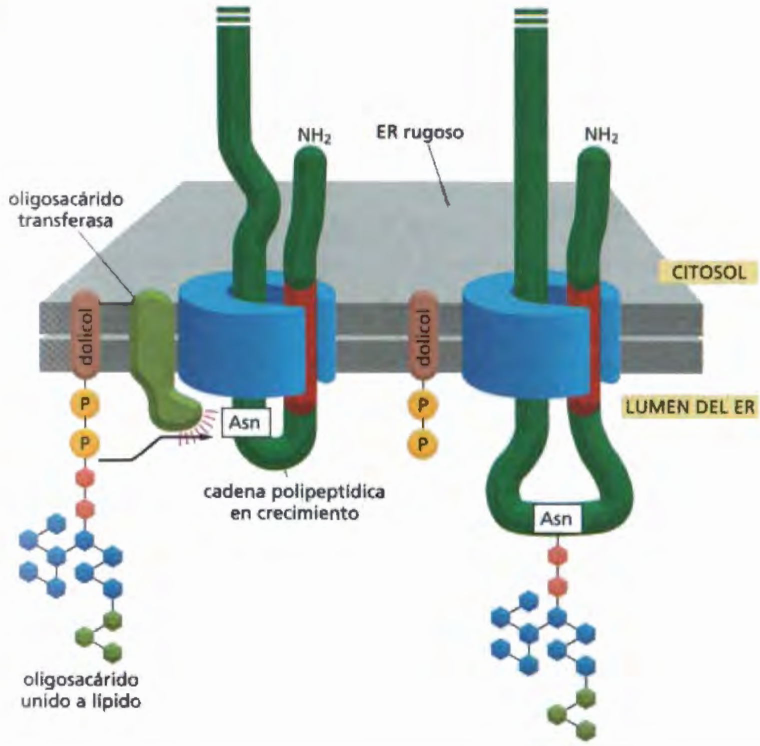


Figura 12–51 Glucosilación de una proteína en el ER rugoso. Casi inmediatamente después de que la cadena polipeptídica entre en el lumen, se glucosila sobre los residuos de asparagina diana. El oligosacárido que se muestra en la Figura 12–50, se transfiere a la asparagina en bloque, en una reacción que cataliza la enzima *oligosacárido transferasa*. Como en el caso de la peptidasa señal, una copia de esta enzima está asociada con cada uno de los translocadores de proteínas en la membrana del ER. (El ribosoma no se muestra.)

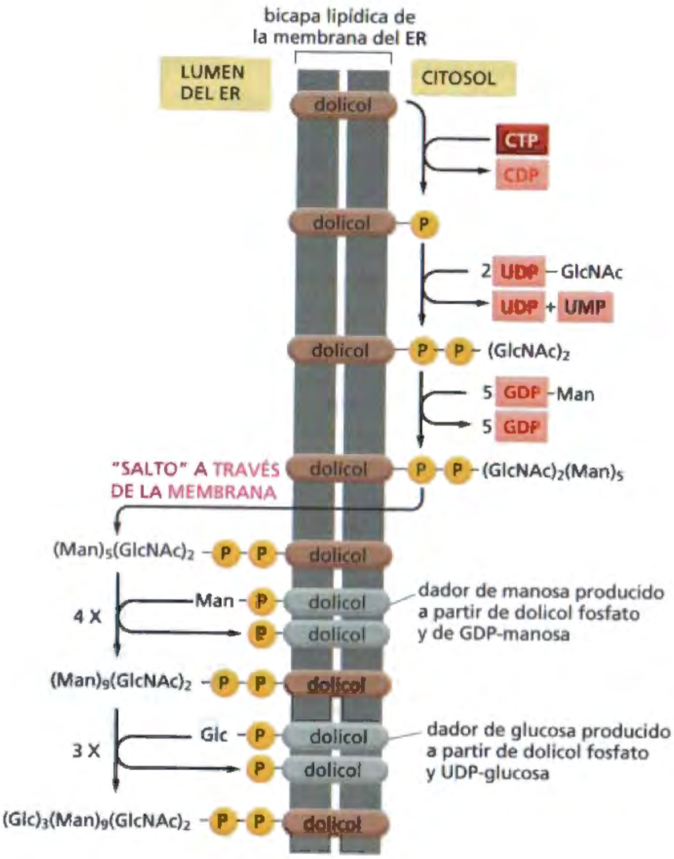


Figura 12–52 Síntesis del precursor del oligosacárido unido a lípido en la membrana del ER rugoso. El oligosacárido se va construyendo azúcar a azúcar, sobre el lípido portador dolicol (un poliisoprenoide, véase Panel 2–5, pp. 114–115). El dolicol es largo y muy hidrofóbico: sus 22 unidades de cinco carbonos pueden atravesar el grosor de la bicapa lipídica más de tres veces, de forma que el oligosacárido que se une a él queda firmemente anclado a la membrana. El primer grupo de azúcar se une al dolicol a través de un enlace pirofosfato. Este enlace de alta energía activa el oligosacárido para su transferencia desde el lípido hasta una cadena lateral de la asparagina de un polipéptido naciente sobre la cara luminal del ER rugoso. Como se ha indicado, la síntesis del oligonucleótido comienza en la cara citosólica de la membrana del ER y continúa sobre la cara luminal, después de que el lípido intermediario (Man)$_5$(GlcNAc)$_2$ haya sido transferido a través de la membrana. Todas las reacciones siguientes de transferencia de grupos glucosilo, que se producen en la cara luminal del ER, implican el transporte de dolicol-P-glucosa y de dolicol-P-manosa; estos monosacáridos activados unidos a lípidos, se sintetizan a partir de dolicol fosfato y de UDP-glucosa o de GDP-manosa (lo más apropiado) sobre la cara citosólica del ER y parece que posteriormente son transportados (*flip-flop*) a través de la membrana del ER. GlcNAc = *N*-acetilglucosamina; Man = manosa; Glc = glucosa.

Toda la diversidad de estructuras de *N*-oligosacáridos que se presentan en las glucoproteínas maduras se produce por modificación posterior de la estructura del oligosacárido precursor. Todavía en el ER, se eliminan rápidamente de los oligosacáridos de la mayoría de las glucoproteínas tres residuos de glucosa (véase Figura 12–50) y uno de manosa. Más adelante se analizará la importancia de la eliminación de las glucosas terminales. Estos "recortes" o "procesamiento" del oligosacárido continúan en el complejo de Golgi, como se describe en el Capítulo 13.

Los *N*-oligosacáridos son, con gran diferencia, los oligosacáridos más comunes de los que se encuentran en el 90% de todas las glucoproteínas. Con menos frecuencia, los oligosacáridos están unidos al grupo hidroxilo de la cadena lateral de un residuo de serina, treonina o hidroxilisina. Estos *O-oligosacáridos* se forman en el complejo de Golgi.

Los oligosacáridos actúan como etiquetas que marcan el estado del plegamiento de las proteínas

Existen varias hipótesis para explicar por qué la glucosilación es una modificación tan común en las proteínas que entran en el ER. Una observación especialmente clarificadora es que algunas proteínas requieren ser *N*-glucosiladas para poderse plegar de forma correcta en el ER, aunque parece que la posición de los oligosacáridos unidos a la superficie de la proteína no es importante. Una clave para entender el papel de la glucosilación en el plegamiento de las proteínas procede del estudio de dos proteínas chaperonas del ER denominadas **calnexina** y **calreticulina** porque ambas requieren Ca^{2+} para su actividad. Estas chaperonas son proteínas de unión a carbohidratos, o *lectinas*, que se unen a los oligosacáridos de proteínas plegadas de forma incompleta y las retienen en el ER. Como otras chaperonas, evitan que proteínas plegadas de forma incompleta se agreguen irreversiblemente. Tanto la calnexina como la calreticulina también facilitan la asociación de proteínas plegadas de forma incompleta con otras chaperonas del ER que se unen a cisteínas que aún no participan en enlaces disulfuro.

Tanto la calnexina como la calreticulina reconocen *N*-oligosacáridos que contienen una sola glucosa en posición terminal, por lo que sólo se unen a proteínas después de que las ER

glucosidasas hayan eliminado dos de las tres glucosas del oligosacárido precursor. Cuando se ha eliminado la tercera glucosa, la proteína se separa de su chaperona y puede por lo tanto abandonar el ER.

¿Cómo es posible, entonces, que calnexina y calreticulina diferencien de forma adecuada entre proteínas plegadas de forma completa o de forma incompleta? La respuesta radica en otra enzima del ER, una glucosil transferasa que añade una glucosa a aquellos oligosacáridos que han perdido su última glucosa. Sin embargo, sólo añade la glucosa a los oligosacáridos que se encuentran unidos a proteínas desplegadas. Así pues, una proteína desplegada sigue ciclos continuos de eliminación de glucosas (por glucosidasas) y de adición de glucosa (por glucosil transferasas), manteniendo su afinidad por la calnexina y por la calreticulina hasta que se pliega por completo (**Figura 12-53**).

Las proteínas mal plegadas son exportadas desde el ER y degradadas en el citosol

A pesar de la acción de las chaperonas, muchas moléculas proteicas (más del 80% en algunos casos) translocadas al ER no llegan nunca a plegarse correctamente o a oligomerizar. Estas proteínas son exportadas desde el ER de nuevo al citosol y degradadas. El mecanismo de retrotranslocación, también denominado *dislocación*, todavía es desconocido, pero es probable que sea similar a otros sistemas de translocación postraduccionales. Por ejemplo, como en el caso de la translocación a las mitocondrias o a los cloroplastos es probable que sean necesarias las chaperonas para mantener la cadena polipeptídica en un estado desplegado antes y durante el transporte. De forma similar, se necesita una fuente de energía para proporcionar la direccionalidad del transporte y para atraer la proteína hacia el citosol. Por último probablemente es necesario un translocador compuesto por algunos de los mismos componentes que se utilizan para el transporte hacia el ER (como Sec61).

Comprender el proceso de selección de proteínas del ER para su degradación constituye todavía un reto. Las proteínas mal plegadas o las subunidades proteicas no ensambladas deben ser degradadas, pero no las proteínas acabadas de sintetizar, todavía a medio plegar. Los oligosacáridos unidos a *N* colaboran en este proceso de diferenciación entre ambos tipos de proteínas, ya que actúan como temporizadores que miden cuánto tiempo ha pasado una proteína en el ER. Parece que la lenta hidrólisis de una manosa particular del corazón del árbol de oligosacárido por una enzima (una manosidasa) del ER genera una nueva estructura de oligosacárido que reconoce el aparato de retrotranslocación. Por tanto, las proteínas que se pliegan y salen del ER más rápidamente que la acción de la manosidasa, escaparán de la degradación.

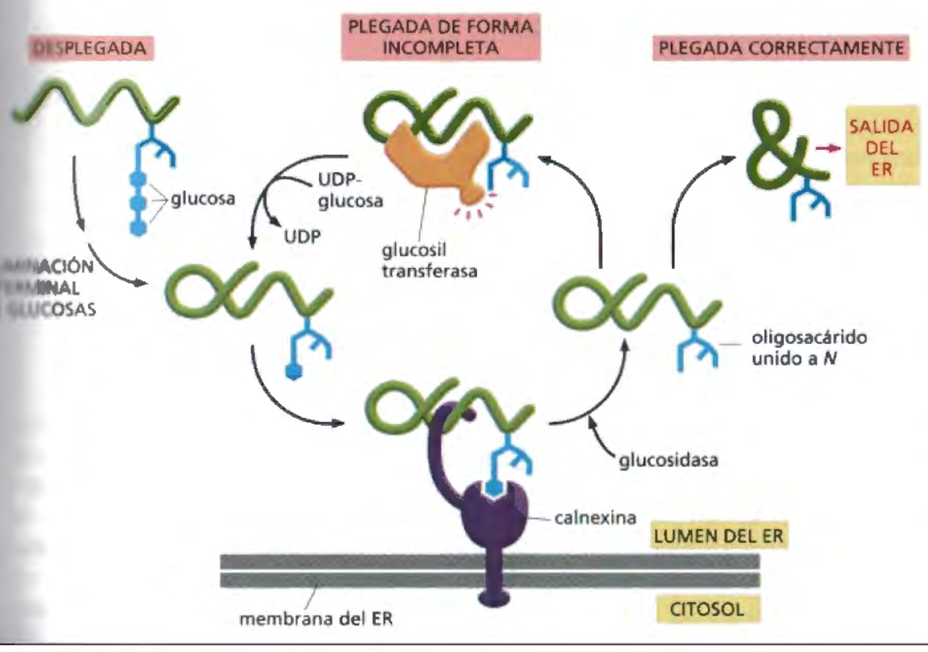


Figura 12-53 Papel de la glucosilación en *N* en el plegamiento de las proteínas en el ER. La calnexina, proteína chaperona unida a la membrana del ER, se une a las proteínas plegadas de forma incompleta que sólo contienen una glucosa en sus oligosacáridos unidos a *N*, reteniéndolas en el ER. La eliminación de la glucosa terminal por una glucosidasa separa la proteína de la calnexina. Una glucosil transferasa es la enzima crítica que determina si la proteína está bien plegada o no: si la proteína aún está incorrectamente plegada, la enzima añade una nueva glucosa al oligosacárido unido a *N* a partir de UDP-glucosa, renovándose su afinidad por calnexina que la retiene en el ER. El ciclo se repite hasta que la proteína se ha plegado por completo. La calreticulina funciona de una manera similar, con la diferencia de que se trata de una proteína soluble residente en el ER. Otra chaperona del ER, ERp57 (no mostrada), colabora con la calnexina y la calreticulina en la retención en el ER de las proteínas mal plegadas.

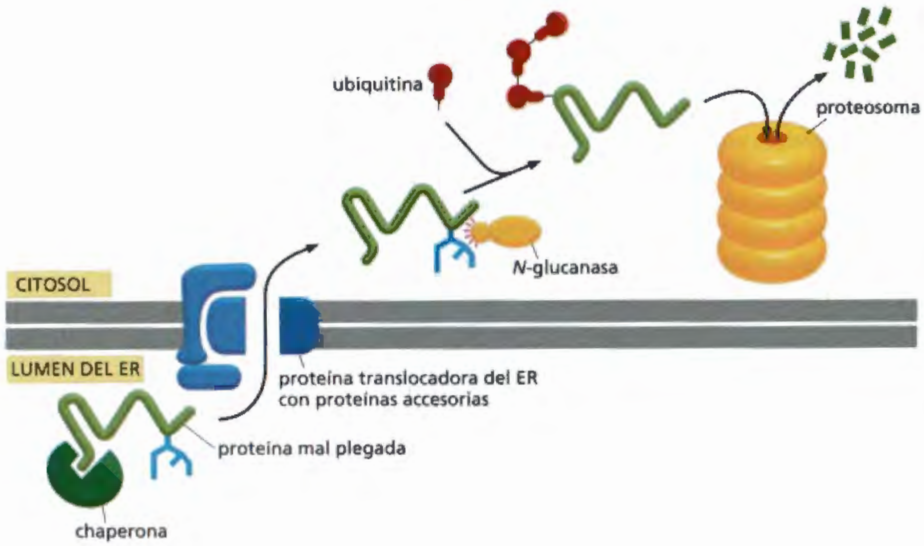


Figura 12-54 Exportación y degradación de proteínas mal plegadas del ER. Las proteínas solubles mal plegadas del lumen del ER, son devueltas al citosol; en esta zona son desglucosiladas, ubiquitinizadas y degradadas en proteosomas. Las proteínas de membrana mal plegadas siguen una ruta similar.

Cuando una proteína mal plegada ha sido retrotranslocada al citosol, una *N*-glicanasa elimina sus cadenas de oligosacáridos *en bloque*. El polipéptido desglucosilado es ubiquitinizado con rapidez por enzimas conjugadoras de ubiquitina unidas al ER y es introducido en los proteosomas (descrito en el Capítulo 6), donde será degradado (**Figura 12–54**).

Las proteínas mal plegadas en el ER activan una respuesta a proteínas desplegadas

Las células controlan cuidadosamente la cantidad de proteínas mal plegadas que hay en varios compartimientos. Por ejemplo, una acumulación de proteínas mal plegadas en el citosol desencadena una *respuesta a choque térmico* (descrita en el Capítulo 6), que estimula la transcripción de los genes que codifican las chaperonas citosólicas, las cuales ayudarán a volver a plegar las proteínas. De una manera similar, una acumulación de proteínas mal plegadas en el ER desencadena una **respuesta a proteínas desplegadas**, que incluye un aumento de la transcripción de genes que codifican las chaperonas del ER, proteínas que participan en la retrotranslocación y degradación de proteínas en el citosol, y muchas otras proteínas que colaboran a incrementar la capacidad de plegamiento de proteínas del ER.

¿Cómo pueden las proteínas mal plegadas en el ER enviar una señal al núcleo? Existen tres vías paralelas que ejecuta la respuesta a proteínas desplegadas (**Figura 12–55**A). La primera vía, que se descubrió en células de levadura, es en especial destacable. Las proteínas desplegadas en el ER activan una proteína quinasa transmembrana del ER que hace que la quinasa oligomerice y se autofosforile. (Algunos receptores de superficie de la membrana plasmática se activan de forma similar, como se explica en el Capítulo 15.) La oligomerización y autofosforilación activa un dominio endorribonucleasa en la porción citosólica de esta molécula, que rompe en dos posiciones una molécula de RNA citosólica determinada y elimina un intrón. Los exones separados se unen por una RNA ligasa, generando un mRNA maduro que es traducido y produce una proteína reguladora de genes activa. Esta proteína activa la transcripción de genes que participan en la respuesta a proteínas desplegadas (Figura 12–55B).

Las proteínas mal plegadas también activan otra quinasa transmembrana del ER, que fosforila e inhibe un factor de iniciación de traducción, reduciendo así la producción de más proteínas en toda la célula. Una consecuencia de la reducción de la traducción proteica consiste en reducir el flujo de proteínas al ER, limitando la carga de proteínas que necesitan ser plegadas. Sin embargo, algunas proteínas son traducidas sobre todo cuando los factores de transcripción son escasos (véase p. 490); una de ellas es una proteína reguladora de genes que ayuda a activar la transcripción de genes que codifican proteínas activas en la respuesta a proteínas desplegadas.

Por último, una tercera proteína reguladora de genes es inicialmente sintetizada como una proteína integral de membrana del ER. Dado que está unida de forma covalente a la membrana, no puede activar la transcripción de genes en el núcleo. Cuando se acumulan

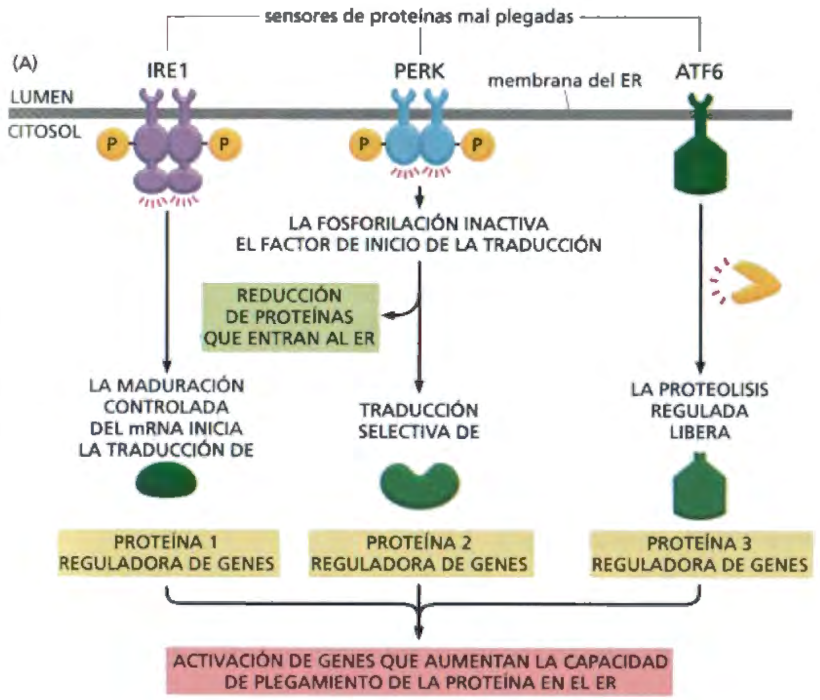
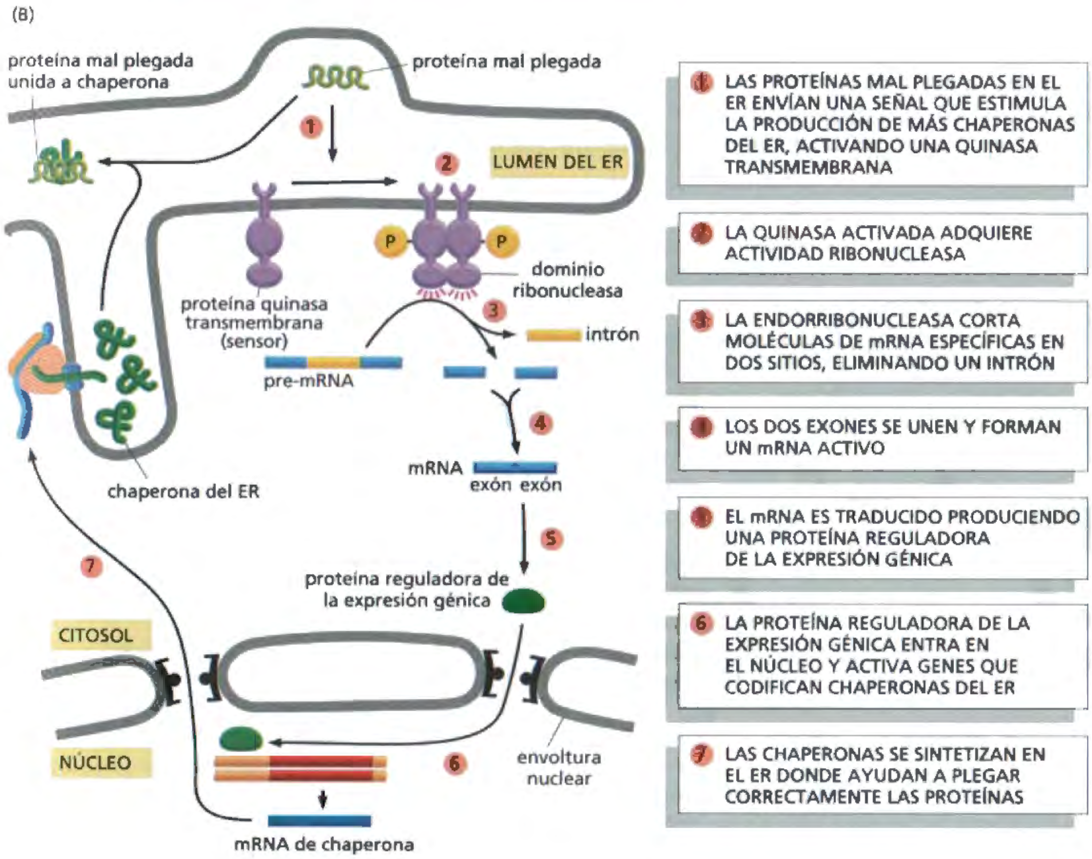


Figura 12-55 La respuesta a las proteínas desplegadas. (A) Mediante tres vías paralelas de señalización intracelular, la acumulación de proteínas mal plegadas en el ER envía una señal al núcleo, induciendo la activación de la transcripción de genes que codifican proteínas que ayudan a la célula a gestionar esta gran cantidad de proteínas mal plegadas del ER. (B) La maduración controlada del mRNA es una pieza clave en la vía 1 de respuesta a proteínas desplegadas.



proteínas mal plegadas en el ER, la proteína transmembrana es transportada al complejo de Golgi, donde encuentra proteasas que separan su dominio citosólico, el cual ahora puede migrar al núcleo y colaborar en la activación de la transcripción de genes que codifican proteínas que participan en la respuesta a proteínas desplegadas. La importancia relativa de cada una de estas tres vías es distinta en tipos celulares diferentes, permitiendo que cada tipo celular diseñe una respuesta específica a proteínas desplegadas de acuerdo con sus necesidades particulares.

Algunas proteínas de membrana adquieren un anclaje covalentemente a glucosilfosfatidilinositol (GPI)

Como se ha explicado en el Capítulo 10, algunas enzimas citosólicas catalizan la adición covalente de una cadena de ácido graso o de grupo prenilo a determinadas proteínas. Los lípidos unidos contribuyen a dirigir estas proteínas hacia las membranas celulares. Determinadas enzimas del ER catalizan un proceso relacionado con éste, que consiste en unir covalentemente un **anclaje glucosilfosfatidilinositol** (**GPI:** ***g****lycosyl****p****hosphatidyl****i****nositol*) al extremo C de algunas proteínas de membrana destinadas a la membrana plasmática. Esta unión se forma en el lumen del ER donde, al mismo tiempo, se elimina el segmento transmembrana de la proteína (**Figura 12–56**). De esta manera son modificadas un gran número de proteínas de la membrana plasmática. Dado que estas proteínas están unidas al exterior de la membrana plasmática exclusivamente a través de su anclaje GPI, en principio pueden ser liberadas de las células en forma soluble en respuesta a señales que activen una fosfolipasa de la membrana plasmática. Por ejemplo, la especie parásita tripanosoma utiliza este mecanismo para liberar su cubierta de proteínas unidas a GPI cuando sufre el ataque del sistema inmunitario. Los anclajes GPI también se utilizan para dirigir a las proteínas hacia las *balsas lipídicas* y así separarse de otras proteínas, como se describe en el Capítulo 13.

La mayoría de las bicapas lipídicas de membrana son ensambladas en el ER

La membrana del ER sintetiza casi todas las clases importantes de lípidos incluyendo los fosfolípidos y el colesterol necesarios para la elaboración de nuevas membranas celulares. El principal fosfolípido fabricado es la *fosfatidilcolina* (también llamado *lecitina*), que puede formarse en tres etapas a partir de colina, dos ácidos grasos y glicerol fosfato (**Figura 12–57**). Cada etapa está catalizada por enzimas de la membrana del ER que tienen sus lugares activos dispuestos hacia el citosol, donde se encuentran los metabolitos necesarios. Por lo tan-

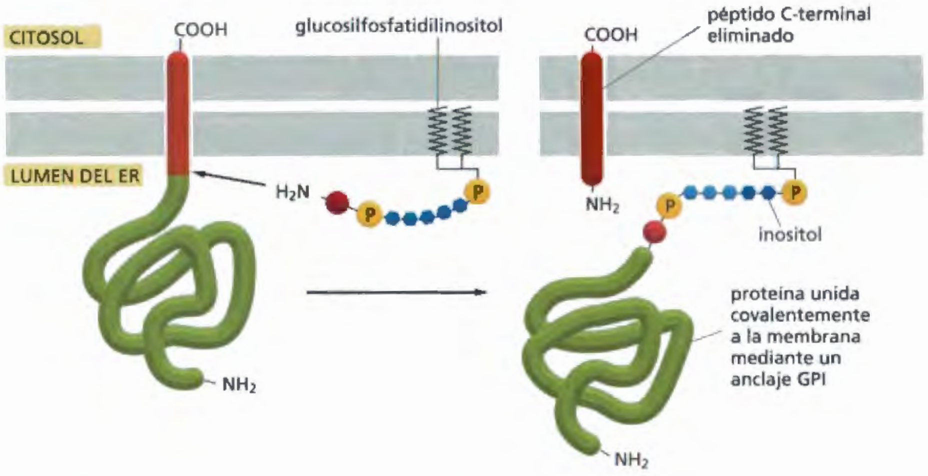


Figura 12–56 Unión de un anclaje GPI a una proteína en el ER. Inmediatamente después de que la proteína sea sintetizada, el precursor permanece anclado a la membrana del ER mediante una secuencia señal C-terminal hidrofóbica de 15 a 20 aminoácidos; el resto de la proteína se encuentra en el lumen del ER. En menos de un minuto, una enzima del ER corta la proteína, liberándola de su extremo C-terminal unido a la membrana y, de forma simultánea, une el nuevo extremo C-terminal a un grupo amino de un intermediario GPI preformado. La cadena del azúcar contiene un inositol unido a los lípidos, de lo que proviene el nombre de GPI (***g****lycosyl****p****hosphatidyl****i****nositol*). El resultado es una glucosamina y tres manosas. La manosa terminal se une a una fosfoetanolamina que proporciona el grupo de aminoácidos necesario para unir la proteína. La señal que especifica esta modificación se encuentra en la secuencia hidrofóbica C-terminal y en algunos aminoácidos adyacentes a ella sobre la cara luminal de la membrana del ER; si esta señal es añadida a otras proteínas, éstas también son modificadas de esta forma. Debido a este anclaje lipídico covalente, la proteína permanece unida a la membrana: al principio, con todos sus aminoácidos expuestos en la cara luminal del ER y, finalmente, en el exterior celular.

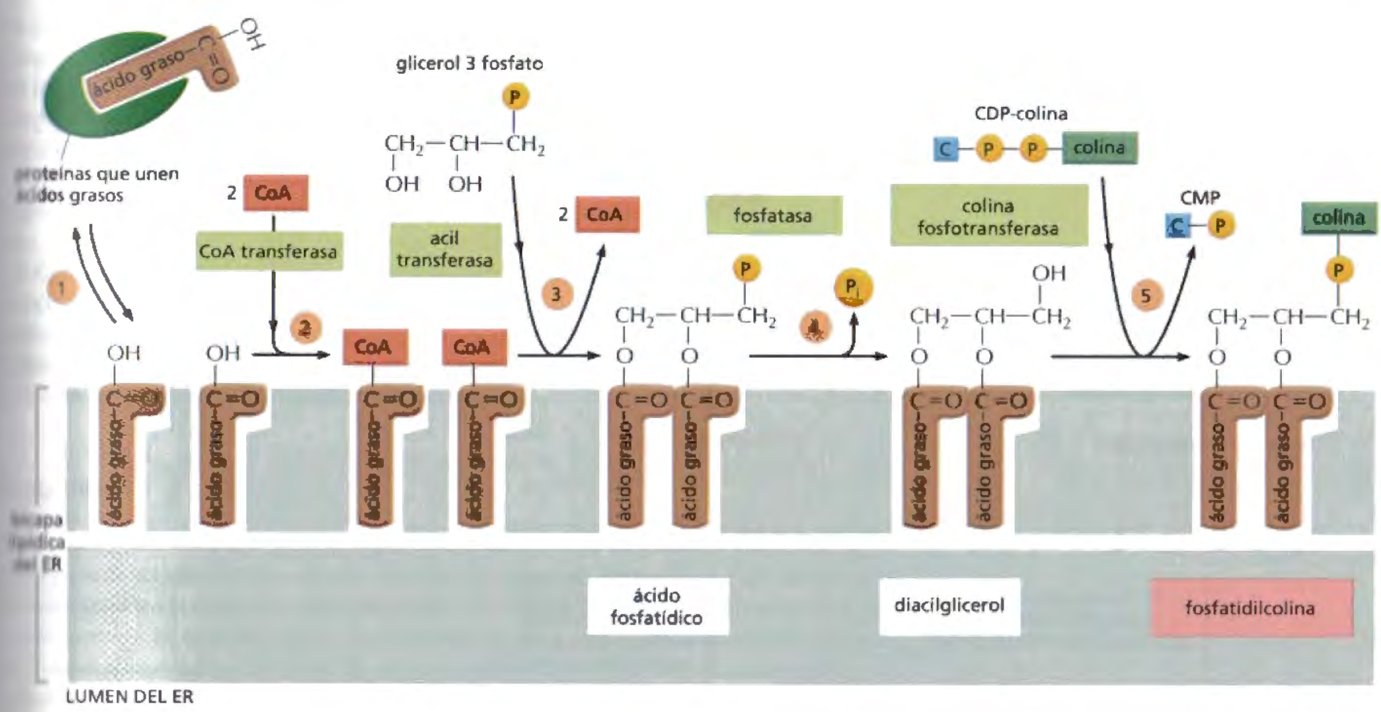


Figura 12–57 Síntesis de fosfatidilcolina. Como se ilustra, este fosfolípido es sintetizado a partir de glicerol 3-fosfato, citidina-difosfocolina (CDP-colina) y ácidos grasos liberados en el ER por proteínas que unen ácidos grasos.

...la síntesis de fosfolípidos sólo tiene lugar en la cara citosólica de la membrana del ER. Dado que los ácidos grasos no son solubles en agua, son transportados desde su lugar de síntesis en el ER por unas proteínas de unión a ácidos grasos del citosol. Tras llegar a la membrana del ER y ser activados por CoA, las acil-transferasas añaden consecutivamente dos ácidos grasos al glicerol fosfato produciendo ácido fosfatídico. El ácido fosfatídico es lo bastante insoluble en agua como para permanecer en la bicapa lipídica después y no ser extraído de la bicapa por las proteínas de unión a ácidos grasos. Por lo tanto, esta etapa es la que hace crecer la bicapa lipídica del ER. Las últimas etapas determinan el grupo de cabeza de la molécula lipídica recién sintetizada y, por tanto, la naturaleza química de la bicapa, pero no suponen un crecimiento neto de la membrana. Los otros dos fosfolípidos mayoritarios de membrana –la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina– al igual que el fosfolípido minoritario fosfatidilinositol (PI: *phosphatidylinositol*) son sintetizados de esta manera.

La síntesis de fosfolípidos tiene lugar en la mitad citosólica de la bicapa lipídica del ER, por lo que debe existir algún mecanismo que transfiera alguna de las moléculas de fosfolípidos recién sintetizadas hacia la mitad luminal de la bicapa. En bicapas lipídicas sintéticas, los lípidos no son capaces de "saltar" ("flip-flop") de esta manera. En el ER, sin embargo, los fosfolípidos se equilibran a través de la membrana en cuestión de minutos, lo cual es al menos unas 100.000 veces más rápido de lo que puede representar el flip-flop espontáneo. Este desplazamiento rápido transbicapa está mediado por un translocador de fosfolípidos mal caracterizado, denominado *escramblasa* (del inglés *scramble*, "barajar" o "mezclar"), que posibilita el equilibrio de la concentración de fosfolípidos entre las dos hojas de la bicapa lipídica (**Figura 12–58**). Así pues, parece ser que los diferentes tipos de fosfolípidos son distribuidos por igual entre las dos hojas de la membrana del ER.

La membrana plasmática contiene otro tipo de translocador de fosfolípidos que pertenece a la familia de las bombas de tipo P (descritos en el Capítulo 11). Estas *flipasas* eliminan específicamente los fosfolípidos que contienen en su grupo cabeza grupos amino libres (fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, véase Figura 10–3) de la capa extracelular y utilizan la energía de hidrólisis del ATP para transferirlos direccionalmente a la cara citosólica de la membrana. Como consecuencia de ello, la membrana plasmática tiene una composición de fosfolípidos muy asimétrica, mantenida activa por acción de las flipasas (Figura 10–16). La membrana plasmática también contiene una escramblasa pero, a diferencia de la del ER que está siempre activa, la de la membrana plasmática está regulada y sólo se activa en algunas

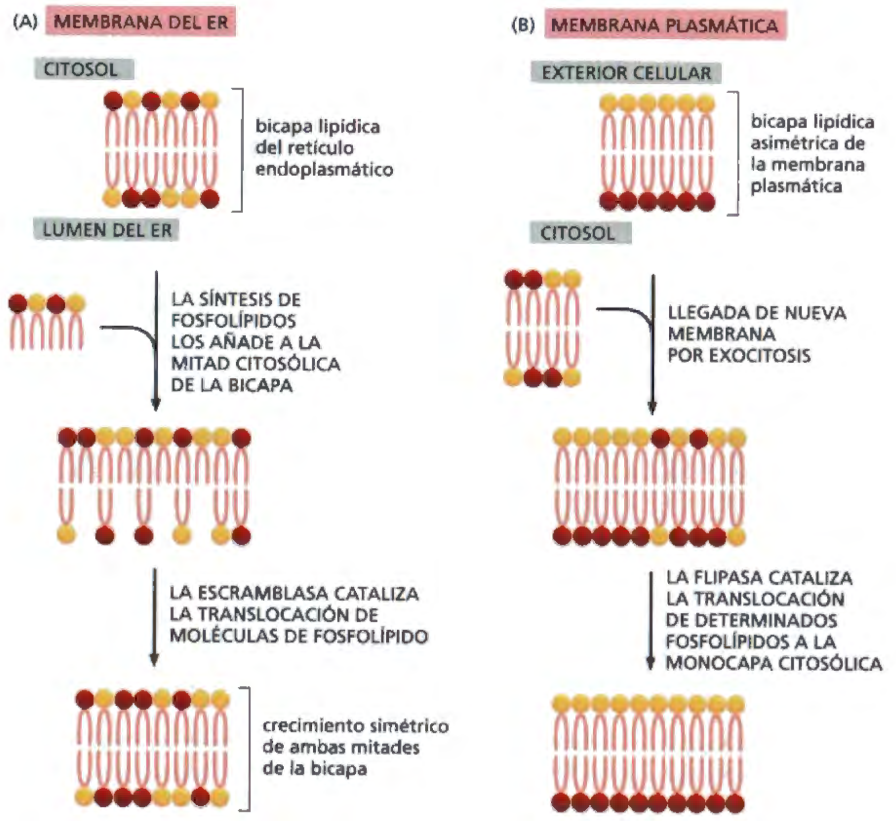


Figura 12–58 El papel de los translocadores lipídicos en la biosíntesis de la bicapa lipídica. (A) Debido a que las nuevas moléculas lipídicas se van añadiendo exclusivamente a la mitad citosólica de la bicapa y no pueden "saltar" de forma espontánea de una monocapa lipídica a la otra, para que la membrana crezca como una bicapa es necesaria la actividad de un translocador de fosfolípidos de membrana (denominada escramblasa, del inglés *scramble*, "mezclar" o "barajar") que transporta moléculas lipídicas de la mitad citosólica a la mitad luminal de la membrana. La escramblasa no es específica de fosfolípidos con un grupo polar de cabeza determinado, por lo que equilibra la distribución de todos los fosfolípidos entre ambas monocapas. (B) Impulsada por la hidrólisis de ATP, una flipasa específica de fosfolípidos, con un determinado grupo polar de cabeza situada en la membrana, transloca de forma específica fosfatidil serina y fosfatidil etanolamina direccionalmente desde la monocapa extracelular hacia la citosólica, generando una asimetría en la composición de lípidos que es característica de la bicapa lipídica de la membrana de las células animales (véase la Figura 10–16).

situaciones, como en la apoptosis y en la activación de las plaquetas, donde elimina la asimetría lipídica; la exposición resultante de fosfatidil serina sobre la superficie de las células apoptóticas actúa como señal para las células fagocíticas para ingerir y degradar la célula muerta.

El ER también produce colesterol y ceramida (**Figura 12–59**). La *ceramida* es fabricada por condensación del aminoácido serina con un ácido graso y forma el amino alcohol *esfingosina* (véase la Figura 10–3); luego se añade un segundo ácido graso, creándose la ceramida. La ceramida es exportada al complejo de Golgi, donde actúa como precursor de la síntesis de dos tipos de lípidos: se añaden cadenas de oligosacáridos formando los *glucoesfingolípidos* (glucolípidos; véase la Figura 10–18), y se transfieren los grupos de cabeza de la fosfocolina de la fosfatidilcolina a otras moléculas de ceramida, formando *esfingomielina* (se describe en el Capítulo 10). Así, ambos glucolípidos y la esfingomielina son producidos relativamente tarde en el proceso de síntesis de membrana. Dado que son producidos por enzimas expuestas al lumen del complejo de Golgi, sólo se encuentran en la mitad no-citosólica de las bicapas lipídicas que los presentan.

Como se describe en el Capítulo 13, la membrana plasmática y las membranas del complejo de Golgi, de los lisosomas y de los endosomas forman parte de un sistema de membranas que se comunica con el ER por medio de vesículas de transporte que transfieren tanto proteínas como lípidos. Sin embargo, las mitocondrias y los plastidios no forman parte de este sistema, por lo que requieren mecanismos diferentes para importar proteínas y lípi-

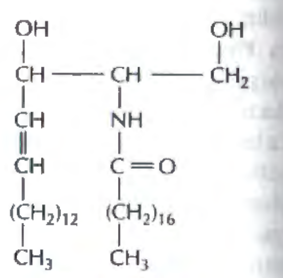


Figura 12–59 Estructura de una ceramida.

sas para su crecimiento. Ya hemos visto que importan la mayoría de sus proteínas desde el citosol. Aunque las mitocondrias modifican algunos de los lípidos que importan, no sintetizan lípidos *de novo* sino que deben obtener estos lípidos por transferencia desde el ER directamente o indirectamente a través de otras membranas celulares. En cualquier caso, se precisan mecanismos especiales para esta transferencia.

No conocemos los detalles sobre cómo está catalizada y regulada la distribución de los lípidos entre diferentes membranas. Parece que unas proteínas de transporte solubles en agua, denominadas *proteínas de intercambio de fosfolípidos* (o *proteínas de transferencia de fosfolípidos*) transfieren moléculas de fosfolípidos entre membranas, actuando como las proteínas de unión a ácidos grasos, que conducen los ácidos grasos a través del citosol. Además, en electromicrografías a menudo se pueden ver mitocondrias en yuxtaposición estrecha con membranas del ER, de forma que pueden existir mecanismos de transferencia de lípidos que actúen entre membranas adyacentes.

Resumen

La extensa red del ER actúa de factoría de producción de casi todos los lípidos celulares. Además, la mayor parte de la síntesis proteica celular tiene lugar en la superficie citosólica del ER: todas las proteínas destinadas a la secreción y todas las proteínas destinadas al propio ER, al complejo de Golgi, a los lisosomas, a los endosomas y a la membrana plasmática, primero son importadas al interior del ER desde el citosol. En el lumen del ER, las proteínas se pliegan y oligomerizan, se forman los enlaces disulfuro y se añaden los oligosacáridos unidos a N. *El patrón de la* N*-glucosilación se utiliza para indicar el grado de plegamiento de las proteínas, de forma que las proteínas abandonen el ER sólo cuando están plegadas de forma correcta. Las proteínas que no se pliegan o no oligomerizan correctamente son translocadas de nuevo al citosol, donde son desglucosiladas, ubiquitinizadas y degradadas en proteosomas. Si se acumulan excesivas proteínas mal plegadas en el ER, desencadenan una respuesta a proteínas desplegadas, que activa los genes apropiados en el núcleo necesarios para que el ER las pueda arreglar.*

Sólo son importadas al interior del ER las proteínas que presentan una secuencia señal hidrofóbica. La secuencia señal es reconocida por una partícula de reconocimiento de señal (SRP) que se une a la cadena polipeptídica naciente y al ribosoma y dirige todo el conjunto a una proteína receptora de la superficie de la membrana del ER. Esta unión a la membrana inicia un proceso de translocación que arrastra un asa de la cadena polipeptídica a través de la membrana del ER por un poro hidrofílico de una proteína translocadora.

Las proteínas solubles –destinadas al lumen del ER, a ser secretadas o a ser transferidas al lumen de otros orgánulos– primero pasan por completo al interior del lumen del ER. Las proteínas transmembrana destinadas al ER o a otras membranas de la célula son translocadas a través de la membrana del ER, pero no son liberadas al interior del lumen sino que permanecen ancladas a la bicapa a través de una o más regiones de hélice α de su cadena polipeptídica, que atraviesan la membrana. Estas porciones hidrofóbicas de la proteína pueden actuar durante el proceso de translocación como secuencia de inicio de translocación o como señal de paro de translocación. Cuando un polipéptido contiene varias secuencias alternadas de inicio y de paro de translocación, atravesará hacia un lado y otro la bicapa muchas veces, constituyendo una proteína transmembrana de paso múltiple.

La asimetría de la inserción y de la glucosilación de las proteínas en el ER establece la polaridad de las membranas de todos los orgánulos que son abastecidos con proteínas de membrana por el ER.

PROBLEMAS

¿Qué afirmaciones son ciertas? Explicar por qué sí o por qué no

12-1 Como el lumen del ER, el interior del núcleo es topológicamente equivalente al exterior de la célula.

12-2 Los ribosomas unidos a membrana y los ribosomas libres, que son idénticos desde un punto de vista estructural y funcional, sólo se diferencian en las proteínas que sintetizan en un momento dado.

12-3 Para obviar la inevitable congestión que ocurriría si se permitiera el tráfico de doble sentido a través de un mismo poro, los complejos de poro están especializados de forma que unos de ellos median la importación y otros media la exportación al núcleo.

12-4 Sólo se encuentran peroxisomas en algunos tipos de células eucariota especializadas.

12-5 En las proteínas transmembrana de multipaso, los segmentos transmembrana de número impar (contados a partir del N-terminal) actúan como señales de inicio de transferencia mientras que los de número par actúan como señales de paro de transferencia.

Resolver los siguientes problemas

12–6 ¿Cuál es el destino de una proteína que no tenga señal de clasificación?

12–7 Se ha modificado una serie de genes cada uno de los cuales codifica una proteína con un par de secuencias señal conflictivas que especifican diferentes compartimientos. Si los genes se expresan en una célula, predice qué señal ganará en cada una de las siguientes combinaciones. Explicar el razonamiento.

A. Señales para importación al núcleo y para importación al ER.

B. Señales para importación a los peroxisomas y para importación al ER.

C. Señales para importación a la mitocondria y de retención en el ER.

D. Señales para importación al núcleo y para exportación desde el núcleo.

12–8 El RE rugoso es el lugar donde se sintetizan muchas clases diferentes de proteínas de membrana. Algunas de estas proteínas permanecen en el ER mientras que otras son clasificadas y enviadas a compartimientos como el complejo de Golgi, los lisosomas y la membrana plasmática. Una medida de la dificultad del problema de la clasificación es el grado de "purificación" que se tiene que conseguir durante el transporte desde el ER. Las proteínas que van a quedar unidas a la membrana plasmática ¿son comunes o son raras entre todas las del ER?

Una consideración sencilla permite contestar esta pregunta. En una célula típica en crecimiento que se divide una vez cada 24 horas, cada día debe pasar por el ER el equivalente a una nueva membrana plasmática. Si la membrana del ER es 20 veces mayor que el área de la membrana plasmática, ¿cuál es la relación entre las proteínas de membrana plasmática y las proteínas de las otras membranas en el ER? (Asumir que en su camino hacia la membrana plasmática, todas las proteínas permanecen en el ER durante 30 minutos de promedio antes de salir, y que la relación entre proteínas y lípidos en el ER y en la membrana plasmática es aproximadamente la misma.)

12–9 Antes de que los complejos de poro nuclear fuesen bien conocidos, no se sabía si las proteínas nucleares difundían de forma pasiva al interior del núcleo y se acumulaban allí uniéndose a proteínas residentes del núcleo como los cromosomas, o si eran transportadas activamente y acumuladas con independencia de su afinidad por componentes nucleares.

Un experimento clásico dirigido a solucionar este problema utilizó diferentes formas de nucleoplasmina radiactiva, una gran proteína pentamérica que participa en el ensamblaje de la cromatina. En este experimento, tanto la proteína intacta como las cabezas de nucleoplasmina, las colas o las cabezas con una sola cola, se inyectaron en el citoplasma o en el núcleo de un oocito de rana (**Figura P12–1**). Todas las formas de nucleoplasmina, excepto las cabezas, se acumularon en el núcleo tras ser inyectadas en el citoplasma, y todas las formas quedaron retenidas en el núcleo cuando se inyectaron en el núcleo.

A. ¿Qué parte de la molécula de nucleoplasmina es responsable de la localización en el núcleo?

B. ¿De qué forma estos experimentos distinguían entre transporte activo, en el que una señal de localización nuclear induce el transporte por un complejo de poro nuclear, y la difusión pasiva, en la que un lugar de unión para un componente nuclear permite la acumulación en el núcleo?

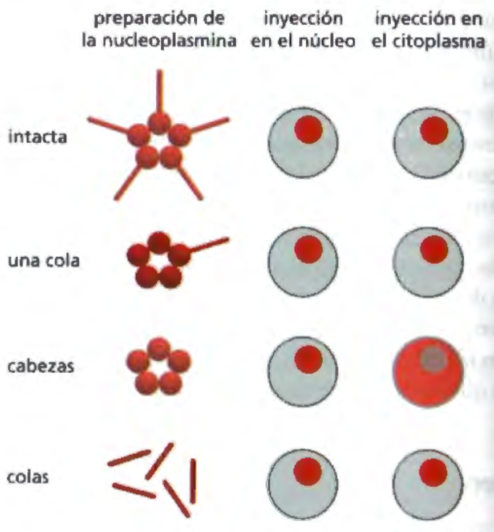


Figura P12–1 Localización celular de nucleoplasmina y de componentes de la nucleoplasmina tras su inyección en una célula (Problema 12–9). El esquema de autorradiografías muestra el citoplasma y el núcleo con la localización de la nucleoplasmina indicada en áreas de color *rojo*.

12–10 Asumiendo que son necesarios 32 millones de octámeros de histona para empaquetar el genoma humano, ¿cuántas moléculas se deben transportar por segundo y por complejo de poro en las células en la que el núcleo contiene 3000 poros nucleares y la célula se divide una vez cada día?

12–11 Las estructuras de Ran-GDP y Ran-GTP (de hecho, de Ran-GppNp, un análogo estable del GTP) son muy diferentes, como muestra la **Figura P12–2**. No es sorprendente que Ran-GDP se una a un juego diferente de proteínas que Ran-GTP.

Para observar la captación de Ran por el núcleo de células permeabilizadas, se une una marca fluorescente a una cadena lateral de una cisteína de Ran, para hacerla visible. Esta Ran modificada es importada al núcleo normalmente. La Ran-GDP fluorescente sólo es captada por el núcleo si se añade citoplasma, mientras que una forma mutante, RanQ69L-GTP, que es incapaz de hidrolizar GTP, no es captada ni en presencia ni en ausencia de citoplasma. Para identificar la proteína citoplasmática que es crucial para la captación de Ran-GDP, se construyen unas columnas de afinidad, en las que se ha unido Ran-GDP o RanQ69L-GTP, y se hace pasar plasma a su través. El citoplasma que ha pasado a través de la columna de Ran-GDP ya no activa el transporte de

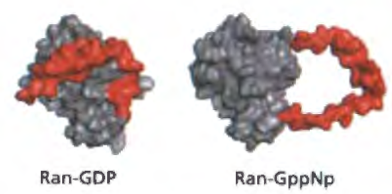


Figura P12–2 Estructuras de Ran-GDP y de Ran-GppNp (Problema 12–11). Las *zonas rojas* de las estructuras muestran el segmento de Ran que es más claramente diferente cuando se une GDP o el análogo de GTP.

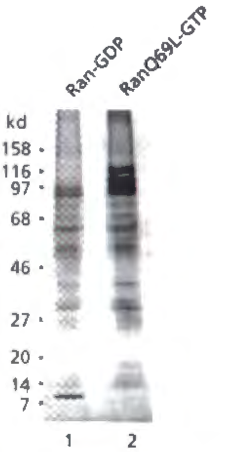


Figura P12–3 Proteínas eluidas de columnas de afinidad de Ran-GDP (carril 1) y de RanQ69L-GTP (carril 2) (Problema 12–11). A la *derecha* se muestran los pesos moleculares de proteínas estándar (De K. Ribbeck et al., EMBO J. 17:6587-6598, 1988. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

Ran-GDP al núcleo mientras que el citoplasma que ha pasado a través de la columna de RanQ69L-GTP mantiene esta actividad. Después de eluir las proteínas que se han unido en cada columna y analizar en una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS, se buscan diferencias que permitan identificar el factor necesario para la captación nuclear de Ran (**Figura P12–3**).

A. ¿Por qué se ha utilizado RanQ69L-GTP en lugar de Ran-GTP en estos experimentos? ¿Ran-GppNp habría podido servir en lugar de RanQ69L-GTP?

B. ¿Cuál de entre las muchas proteínas eluidas a partir de las dos columnas diferentes de afinidad es una buena candidata a ser el factor que activa el transporte de Ran-GDP al núcleo?

C. ¿Qué otra proteína o proteínas sería lógico que Ran-GDP necesitara para realizar su función?

D. ¿Cómo podría confirmarse que el factor identificado es necesario para estimular la captación nuclear de Ran?

12–12 Los componentes del complejo TIM, el transportador nuclear formado por muchas subunidades de la membrana nuclear interna, son mucho menos abundantes que los del complejo TOM. Inicialmente fueron identificados utilizando una estrategia genética. El gen de levadura *Ura3*, cuyo producto está localizado por lo general en el citosol, donde es esencial para la síntesis de uracilo, fue modificado para transportar una señal de importación a la matriz de la mitocondria. Una población de células que transportaban el gen *Ura3* modificado se hizo crecer en ausencia de uracilo. La mayoría de las células murieron; las escasas células que crecieron eran deficientes en el sistema de importación mitocondrial. Explicar de qué forma esta selección identifica células con defectos en los componentes necesarios para la importación mitocondrial ¿Por qué las células normales pero con el gen *Ura3* modificado no crecen en ausencia de uracilo? ¿Por qué las células que tienen un defecto en el sistema de importación mitocondrial crecen en ausencia de uracilo?

12–13 Si la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), que normalmente está localizada en el citosol, se modifica de forma artificial para transformar una secuencia de identificación mitocondrial en su extremo N-terminal, es importada de forma eficiente a la mitocondria. Si la DHFR modificada es incubada con metotrexato, que se une con fuerza a su lugar activo, la enzima permanece en el citosol. ¿De qué forma la unión del metotrexato interfiere con la importación a la mitocondria?

12–14 ¿Por qué una mitocondria necesita un imaginario transportador para importar proteínas a través de la membrana externa? Sus membranas externas tienen grandes poros formados por porinas.

12–15 La catalasa, una enzima que se encuentra en los peroxisomas, está presente en cantidades normales en las células que no tienen peroxisomas visibles. Resulta posible determinar la localización de la catalasa en estas células utilizando microscopía de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos contra la catalasa. En la **Figura P12–4** se presentan micrografías de fluorescencia de células normales y de células deficientes en peroxisomas ¿Dónde está localizada la catalasa en las células sin peroxisomas (Figura P12–4B)? ¿Por qué la catalasa se presenta como pequeños puntos de fluorescencia en las células normales (Figura P12–4A)?

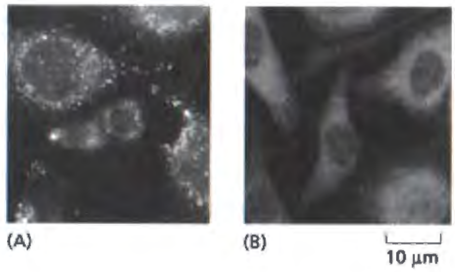


Figura P12–4 Localización de la catalasa en células, determinada por microscopía de fluorescencia (Problema 12–15)). (A) Células normales. (B) Células deficientes en peroxisomas. Las células se hicieron reaccionar con anticuerpos específicos contra la catalasa, se lavaron y se tiñeron con un segundo anticuerpo marcado con fluoresceína, específico contra la catalasa. Los dos paneles tienen los mismos aumentos. (De N. Kinoshita et al., *J. Biol. Chem.* 273:24112-24130, 1998. Con la autorización de American Society for Biochemistry and Molecular Biology.)

12–16 Examinar la proteína transmembrana de multipaso que mostramos en la **Figura P12–5**. ¿Cuál será el efecto de transformar el primer segmento hidrofóbico transmembrana en un segmento hidrofílico? Esbozar la distribución en la membrana del ER de la proteína modificada.

12–17 Todos los nuevos fosfolípidos se añaden a la hoja citoplasmática de la membrana del ER, pero la membrana del ER tiene una distribución simétrica de diferentes fosfolípidos en sus dos caras. Por el contrario, la membrana plasmática, que recibe todos sus componentes de membrana en último término del ER, tiene una distribución muy asimétrica de fosfolípidos en las dos hojas de su bicapa lipídica. ¿Cómo se genera la simetría en la membrana del ER y como se genera la asimetría en la membrana plasmática?

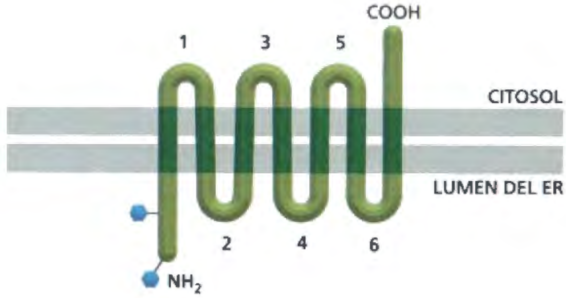


Figura P12–5 Distribución de una proteína transmembrana multipaso en la membrana del ER (Problema 12–16). Los *hexágonos* representan oligosacáridos unidos de forma covalente.

BIBLIOGRAFÍA

General

Palade G (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189:347–358.

La compartimentación de las células

Blobel G (1980) Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:1496–1500.

De Duve C (2007) The origin of eukaryotes: a reappraisal. *Nature Rev Genet* 8:395–403.

Schatz G & Dobberstein B (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271:1519–1526.

Warren G & Wickner W (1996) Organelle inheritance. *Cell* 84:395–400.

Transporte de moléculas entre el núcleo y el citosol

Adam SA & Gerace L (1991) Cytosolic proteins that specifically bind nuclear location signals are receptors for nuclear import. *Cell* 66:837–847.

Bednenko J, Cingolani G & Gerace L (2003) Nucleocytoplasmic transport: navigating the channel. *Traffic* 4:127–135.

Chook YM & Blobel G (2001) Karyopherins and nuclear import. *Curr Opin Struct Biol* 11:703–715.

Cole CN & Scarcelli JJ (2006) Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* 18:299–306.

Fahrenkrog B, Koser J & Aebi U (2004) The nuclear pore complex: a jack of all trades? *Trends Biochem Sci* 29:175–182.

Görlich D & Kutay U (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:607–660.

Hetzer MW, Walther TC & Mattaj IW (2005) Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:347–380.

Komeili A & O'Shea EK (2000) Nuclear transport and transcription. *Curr Opin Cell Biol* 12:355–360.

Kuersten S, Ohno M & Mattaj IW (2001) Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *Trends Cell Biol* 11:497–503.

Tran EJ & Wente SR (2006) Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell* 125:1041–1053.

Weis K (2002) Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. *Curr Opin Cell Biol* 14:328–335.

Transporte de proteínas al interior de mitocondrias y cloroplastos

Jarvis P & Robinson C (2004) Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Curr Biol* 14:R1064–R1077.

Kessler F & Schnell DJ (2004) Chloroplast protein import: solve the GTPase riddle for entry. *Trends Cell Biol* 14:334–338.

Koehler CM, Merchant S & Schatz G (1999) How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. *Trends Biochem Sci* 24:428–432.

Mokranjac D & Neupert W (2005) Protein import into mitochondria. *Biochem Soc Trans* 33:1019–1023.

Prakash S & Matouschek A (2004) Protein unfolding in the cell. *Trends Biochem Sci* 29:593–600.

Soll J & Schleiff E (2004) Protein import into chloroplasts. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5:198–208.

Truscott KN, Brandner K & Pfanner N (2003) Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr Biol* 13:R326–R337.

Peroxisomas

Fujiki Y (2000) Peroxisome biogenesis and peroxisome biogenesis disorders. *FEBS Lett* 476:42–46.

Lazarow PB (2003) Peroxisome biogenesis: advances and conundrums. *Curr Opin Cell Biol* 15:489–497.

van der Zand A, Braakman I & Tabak HF (2006) The return of the peroxisome. *J Cell Sci* 119:989–994.

Retículo endoplasmático

Adelman MR, Sabatini DD et al (1973) Ribosome-membrane interaction. Nondestructive disassembly of rat liver rough microsomes into ribosomal and membranous components. *J Cell Biol* 56:206–229.

Bernales S, Papa FR & Walter P (2006) Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:487–508.

Bishop WR & Bell RM (1988) Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation. *Annu Rev Cell Biol* 4:579–610.

Blobel G & Dobberstein B (1975) Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* 67:835–851.

Borgese N, Mok W & Sabatini DD (1974) Ribosomal-membrane interaction: in vitro binding of ribosomes to microsomal membranes. *J Mol Biol* 88:559–580.

Daleke DL (2003) Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res* 44:233–242.

Deshaies RJ, Sanders SL & Schekman R (1991) Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* 349:806–808.

Ellgaard L & Helenius A (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4:181–191.

Ferguson MA (1999) The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci* 112:2799–2809.

Gething MJ (1999) Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* 10:465–472.

Görlich D, Prehn S et al (1992) A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* 71:489–503.

Helenius J & Aebi M (2002) Transmembrane movement of dolichol linked carbohydrates during N-glycoprotein biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol* 13:171–178.

Johnson AE & van Waes MA (1999) The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:799–842.

Keenan RJ, Freymann DM & Walter P (2001) The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem* 70:755–775.

Kostova Z & Wolf DH (2003) For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *EMBO J* 22:2309–2317.

Levine T & Loewen C (2006) Inter-organelle membrane contact sites: through a glass, darkly. *Curr Opin Cell Biol* 18:371–378.

Marciniak SJ & Ron D (2006) Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev* 86:1133–1149.

Milstein C, Brownlee GG et al (1972) A possible precursor of immunoglobulin light chains. *Nature New Biol* 239:117–120.

Römisch K (2005) Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:435–456.

Simon SM & Blobel G (1991) A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* 65:371–380.

Staehelin LA (1997) The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J* 11:1151–1165.

Trombetta ES & Parodi AJ (2003) Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:649–676.

Tsai B, Ye Y & Rapoport TA (2002) Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3:246–255.

Shibata Y, Voeltz GK & Rapoport TA (2006) Rough sheets and smooth tubules. *Cell* 126:435–439

White SH & von Heijne G (2004) The machinery of membrane protein assembly. *Curr Opin Struct Biol* 14:397–404.

Yan A & Lennarz WJ (2005) Unraveling the mechanism of protein N-glycosylation. *J Biol Chem* 280:3121–3124.

Tráfico vesicular intracelular

13

En este capítulo

MECANISMOS MOLECULARES DE TRANSPORTE DE MEMBRANA Y DE MANTENIMIENTO DE LA DIVERSIDAD DE LOS COMPARTIMIENTOS 750

TRANSPORTE DESDE EL ER A TRAVÉS DEL COMPLEJO DE GOLGI 766

TRANSPORTE DESDE LA RED DEL *TRANS* GOLGI A LOS LISOSOMAS 779

TRANSPORTE HACIA EL INTERIOR DE LA CÉLULA DESDE LA MEMBRANA PLASMÁTICA: ENDOCITOSIS 787

TRANSPORTE DESDE LA RED DEL *TRANS* GOLGI HACIA EL EXTERIOR CELULAR: EXOCITOSIS 800

Todas las células deben alimentarse, comunicarse con el exterior y responder con rapidez a los cambios del entorno. Para poder realizar sus funciones, las células ajustan continuamente la composición de su membrana plasmática en respuesta a sus necesidades. Utilizan un complejo sistema de membranas internas para añadir y eliminar proteínas de superficie celular incluidas en la membrana tales como receptores, canales iónicos y transportadores. Mediante el proceso denominado *exocitosis*, la *ruta de secreción biosintética-secretora* suministra proteínas de nueva síntesis, carbohidratos y lípidos tanto a la membrana plasmática como al exterior celular. El proceso complementario, la *endocitosis* (**Figura 13–1**), permite a las células eliminar componentes de la membrana plasmática transportándolos a compartimientos intracelulares denominados *endosomas*, desde los que pueden ser reciclados hacia la misma o diferente área de la membrana plasmática o pueden ser dirigidos a los lisosomas para su degradación. Las células también emplean la endocitosis para captar nutrientes importantes como vitaminas, lípidos, colesterol y hierro; éstos son ingeridos junto con las macromoléculas a las que se unen y son liberados en los endosomas o lisosomas y transportados al citosol donde son utilizados en diferentes procesos biosintéticos.

El espacio interior, o *lumen*, de cada uno de los compartimientos delimitados por membrana de las rutas biosintética-secretora y endocítica es topológicamente equivalente al lumen de la mayoría de los otros compartimientos membranosos y al exterior celular. Las proteínas pueden desplazarse en ese espacio sin tener que atravesar membranas y pasan de uno a otro compartimiento mediante numerosos contenedores de transporte membranosos. Algunos de estos contenedores son pequeñas *vesículas* esféricas, mientras otros son grandes vesículas irregulares o túbulos formados a partir del compartimiento dador. Utilizaremos el término **vesículas de transporte** para referirnos a todas estas formas de contenedores.

Dentro de una célula eucariota se forman constantemente las vesículas de transporte en una membrana y se fusionan con otra, transportando componentes de membrana y moléculas solubles que se denominan **carga** (**Figura 13–2**). Este tráfico de membrana fluye a lo largo de rutas direccionales muy organizadas, que permiten a la célula secretar, alimentarse y remodelar su membrana plasmática. La vía biosintética-secretora se dirige al exterior, desde el retículo endoplasmático (ER) hacia el complejo de Golgi y la superficie celular, con una desviación hacia los lisosomas, mientras que la ruta endocítica se dirige hacia el interior desde la membrana plasmática. En cada caso, el flujo de membrana entre los compartimientos está equilibrado con mecanismos de recuperación que, transportando membranas y proteínas seleccionadas hacia el compartimiento de origen, equilibran el flujo en ambos sentidos (**Figura 13–3**).

Para poder realizar su función, cada vesícula de transporte que emerge de un compartimiento debe ser selectiva. Tiene que tomar las moléculas adecuadas y sólo debe fusionarse con la membrana diana apropiada. Así, por ejemplo, una vesícula que va del complejo de Golgi a la membrana plasmática, no puede llevarse proteínas que deben residir en el complejo de Golgi y sólo debe fusionarse con la membrana plasmática y no con otros orgánulos.

Empezaremos este capítulo considerando los mecanismos moleculares de la vesiculación y de la fusión en los que se basa todo el transporte vesicular. Posteriormente se expondrán los problemas fundamentales de cómo, a pesar del transporte, las células mantienen las diferencias entre compartimientos. Finalmente, se considerarán las funciones del complejo de Golgi, lisosomas, vesículas de secreción y endosomas, a medida que se describan las rutas que conectan estos orgánulos.

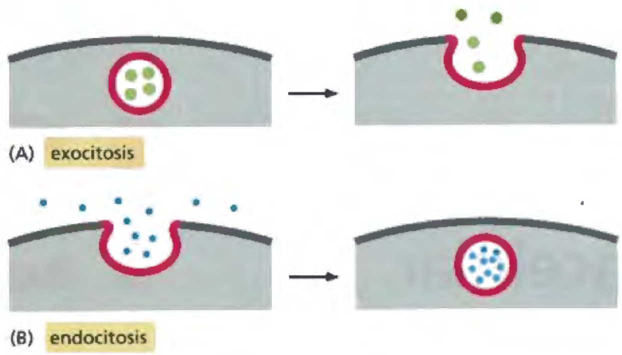


Figura 13–1 Exocitosis y endocitosis. (A) En la exocitosis, una vesícula de transporte se fusiona con la membrana plasmática. Su contenido es liberado en el espacio extracelular mientras que la membrana de la vesícula (*rojo*) queda incorporada en la membrana plasmática. (B) En la endocitosis, una región de la membrana (*rojo*) es internalizada formando una vesícula de transporte. Su contenido procede del espacio extracelular.

MECANISMOS MOLECULARES DE TRANSPORTE DE MEMBRANA Y DE MANTENIMIENTO DE LA DIVERSIDAD DE LOS COMPARTIMIENTOS

El transporte vesicular provoca un intercambio constante de componentes entre los más de diez compartimientos membranosos que, colectivamente, forman las vías biosintética-secretora y endocítica y que son químicamente diferentes. Con este intercambio masivo, ¿cómo puede cada uno de los compartimientos mantener su identidad? Para poder contestar a esta pregunta hay que considerar en primer lugar qué es lo que define un compartimiento. Por encima de todo, parece que es la naturaleza de la membrana que los delimita: marcadores moleculares expuestos en la superficie citosólica de la membrana actúan de guía para el tráfico de entrada, asegurando que las vesículas de transporte sólo se fusionen con el compartimiento adecuado. Sin embargo, muchos de estos marcadores de membrana se encuentran en más de un compartimiento y la combinación específica de marcadores determina la dirección molecular única de cada compartimiento.

¿Cómo se mantienen los marcadores de membrana en una concentración elevada en un compartimiento y baja en otro? Para responder a esta pregunta, es necesario comprender cómo las áreas de membrana, enriquecidas o empobrecidas en determinados componentes de membrana específicos, generan vesículas en un compartimiento y son transportadas a otro. El **Panel 13–1** plantea algunas de las estrategias genéticas y bioquímicas básicas que se han utilizado para estudiar la maquinaria molecular implicada en el transporte vesicular.

En primer lugar, se explicará cómo las células segregan proteínas en diferentes dominios de membrana mediante el ensamblaje de una cubierta proteica específica en la cara citosólica de la membrana. Después expondremos cómo se forman las cubiertas, cuáles son sus componentes y cómo son utilizados para seleccionar determinados componentes de

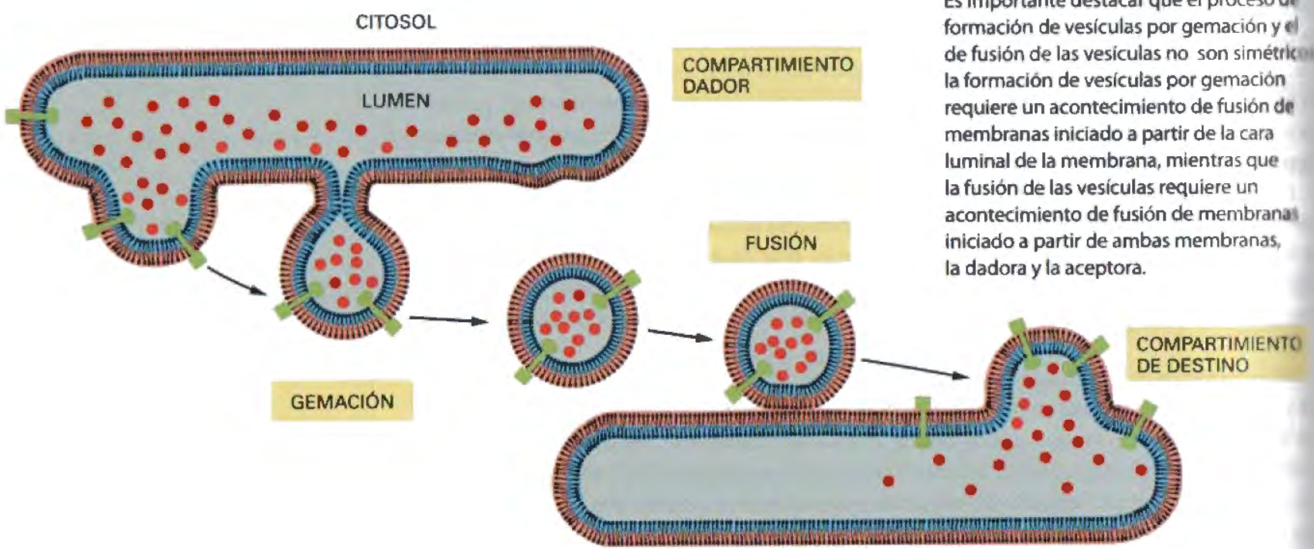


Figura 13–2 Transporte vesicular. Las vesículas de transporte emergen por gemación de un compartimiento y se fusionan con otro. Como se muestra, al hacerlo transportan material del *lumen* (el espacio interior de un compartimiento delimitado por membrana) y de la membrana del compartimiento dador, al lumen y a la membrana del compartimiento de destino. Es importante destacar que el proceso de formación de vesículas por gemación y el de fusión de las vesículas no son simétricos: la formación de vesículas por gemación requiere un acontecimiento de fusión de membranas iniciado a partir de la cara luminal de la membrana, mientras que la fusión de las vesículas requiere un acontecimiento de fusión de membranas iniciado a partir de ambas membranas, la dadora y la aceptora.

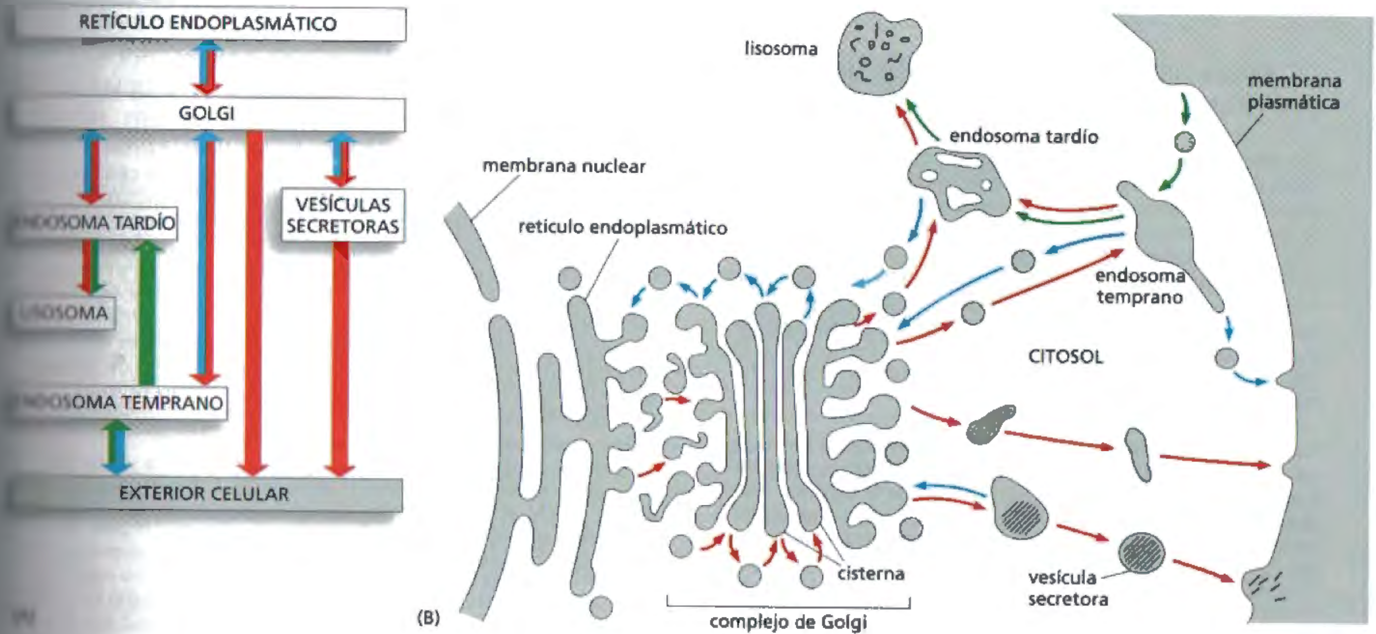


Figura 13–3 **"Mapa de carreteras" de las vías biosintética-secretora y endocítica.** (A) En este "mapa de carreteras" sobre el tráfico de las proteínas biosintetizadas, que fue presentado en el Capítulo 12, aparecen destacadas con flechas *verdes* y *rojas* las rutas endocítica y biosintética-secretora, respectivamente. Además, las flechas *azules* señalan las vías de recuperación mediante las cuales se asegura el flujo retrógrado de los componentes. (B) Los compartimientos de una célula eucariota que están implicados en el transporte vesicular. El lumen de cada compartimiento delimitado por membrana es topológicamente equivalente al exterior celular. Todos los compartimientos que se muestran, se comunican entre sí y con el exterior celular mediante las vesículas. En la ruta biosintética-secretora (*flechas rojas*), las moléculas de proteínas son transportadas desde el ER a la membrana plasmática o (vía endosomas tardíos) a los lisosomas. En la ruta endocítica (*flechas verdes*), las moléculas son ingeridas mediante vesículas que se forman a partir de la membrana plasmática, conducidas a los endosomas tempranos y (vía endosomas tardíos) a los lisosomas. Muchas moléculas endocitadas se recuperan de los endosomas tempranos y vuelven a la superficie celular, donde son reutilizadas; de forma similar, algunas moléculas son recuperadas de los endosomas tardíos y vuelven al complejo de Golgi, y algunas son recuperadas del Golgi y devueltas al ER. Todas estas rutas de recuperación se indican con *flechas azules*, como en el apartado (A).

de membrana que serán transportados a otro compartimiento. Por último, se describirá cómo las vesículas de transporte se anclan en la membrana aceptora apropiada, fusionándose con ella y liberando su carga.

Hay varios tipos de vesículas recubiertas

La mayoría de las vesículas de transporte se forman a partir de regiones recubiertas especializadas de las membranas. Geman como **vesículas recubiertas** que presentan una malla característica de proteínas que recubre su cara citosólica. Antes de que las vesículas se fusionen con la membrana aceptora pierden su cubierta y permiten que las dos caras citosólicas de las membranas entren en contacto y se fusionen.

La cubierta tiene dos funciones principales. La primera, concentrar determinadas proteínas de la membrana en una región especializada de la misma a partir de la cual se formará la membrana de la vesícula. De esta manera selecciona las moléculas adecuadas para el transporte. La segunda, moldear la vesícula en formación. Las proteínas de cubierta se ensamblan en forma de mallas curvadas en forma de cesta que deforman el área de la membrana dando forma a la vesícula. Este hecho podría explicar la observación de que vesículas con el mismo tipo de cubierta tienen un tamaño y forma relativamente similares.

Hay tres tipos de vesículas recubiertas bien caracterizados, que se diferencian por sus proteínas de cubierta: las *recubiertas de clatrina*, las *recubiertas de COPI* y las *recubiertas de COPII* (**Figura 13–4**). Cada tipo participa en diferentes etapas de transporte. Por ejemplo, las vesículas recubiertas de clatrina están implicadas en el transporte desde el complejo de Golgi y desde la membrana plasmática, mientras que las vesículas recubiertas de COPI y de COPII están fundamentalmente implicadas en el transporte desde el ER y desde las cisternas del Golgi (**Figura 13–5**). Sin embargo hay mucha más variedad de vesículas recubiertas y de sus funciones de lo que sugiere la corta lista anterior. Como se describirá más adelante, hay varios tipos de vesículas recubiertas de clatrina, cada una de las cuales está especializada en una etapa de transporte diferente, y las vesículas recubiertas de COPI y de COPII también pueden ser diversas.

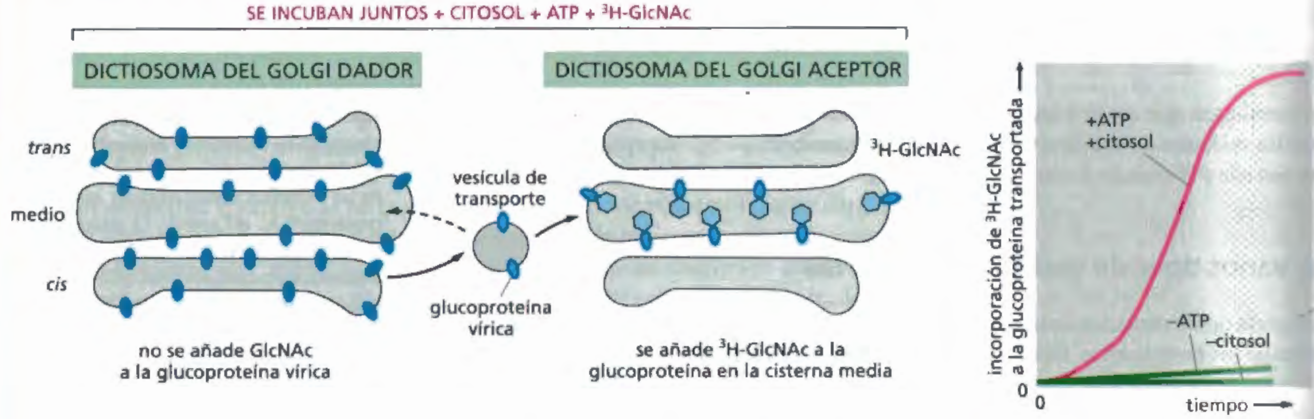
El ensamblaje de la cubierta de clatrina controla la formación de vesículas

Las **vesículas recubiertas de clatrina**, las primeras vesículas recubiertas que fueron descritas, transportan materiales desde la membrana plasmática y entre los endosomas y los compartimientos del Golgi. Las **vesículas recubiertas de COPI** y las **vesículas recubiertas de**

SISTEMAS LIBRES DE CÉLULAS PARA EL ESTUDIO DE LOS COMPONENTES Y DEL MECANISMO DEL TRANSPORTE VESICULAR

El transporte vesicular puede ser reconstituido en sistemas libres de células. La primera vez que se consiguió fue para el caso de los dictiosomas del complejo de Golgi. Cuando se aíslan dictiosomas y se incuban en presencia de citosol y de ATP como fuente de energía, las vesículas emergen por gemación desde los bordes de los dictiosomas y parece que transporten proteínas entre las cisternas. Siguiendo el procesamiento progresivo de los oligosacáridos de una glucoproteína y su desplazamiento entre un compartimiento del Golgi y el siguiente, es posible seguir el proceso de transporte vesicular.

Para seguir el transporte, se incuban juntas dos poblaciones de dictiosomas de Golgi. La población "dadora" se aísla a partir de células mutantes que carecen de la enzima *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) transferasa I y que han sido infectadas con un virus; debido a la mutación, la principal glucoproteína vírica no puede ser modificada con GlcNAc en el complejo de Golgi que tienen las células mutantes. Los dictiosomas "aceptores" son aislados a partir de células salvajes no infectadas y que, por lo tanto, contienen una copia correcta de GlcNAc transferasa I, pero carecen de la glucoproteína vírica. En la mezcla de dictiosomas del Golgi, la proteína vírica adquiere GlcNAc, lo cual indica que el Golgi dador debe haber sido transportado entre los dictiosomas del Golgi –presumiblemente por vesículas que se forman en el compartimento *cis* del complejo de Golgi dador y se fusionan con el compartimiento medio del complejo de Golgi aceptor o bien mediante fusión homotípica entre cisternas de dos dictiosomas. Este transporte dependiente de glucosilación puede seguirse midiendo la transferencia de ^{3}H-GlcNAc desde UDP-^{3}H-GlcNAc a la glucoproteína vírica. El transporte sólo se produce en presencia de ATP y de citosol. Fraccionando el citosol, se han identificado proteínas específicas citosólicas necesarias para la formación y la fusión de las vesículas de transporte.



Sistemas libres de células similares a éste se han utilizado para estudiar el transporte desde la red media hasta la red del *trans* Golgi, desde la red del *trans* Golgi hasta la membrana plasmática, desde los endosomas hasta los lisosomas y desde la red del *trans* Golgi hasta los endosomas tardíos, así como para el estudio de la fusión homotípica entre compartimientos similares, como los endosomas y las vesículas de secreción inmaduras.

APROXIMACIONES GENÉTICAS AL ESTUDIO DEL TRANSPORTE VESICULAR

Los estudios genéticos de células de levadura mutantes deficientes en la secreción a temperaturas elevadas han permitido identificar más de 25 genes que participan en la vía de secreción. Muchos de estos genes mutantes codifican proteínas *sensibles a temperatura*, las cuales a 25 °C actúan normalmente, pero cuando las células mutantes (A-I) se exponen a una temperatura superior, de 35 °C, algunas no pueden llevar a cabo el transporte de proteínas desde el ER hasta el complejo de Golgi, desde una cisterna a otra del Golgi, y desde el complejo de Golgi hasta la vacuola (el lisosoma de las levaduras) o hasta la membrana plasmática.

Cuando, por este sistema, se identifican algunas proteínas necesarias para que se produzca la secreción, se pueden identificar genes que codifican proteínas que interaccionan con ellas mediante un fenómeno llamado *supresión multicopia*. A temperaturas elevadas, a menudo una proteína mutante sensible a la temperatura elevada tiene una afinidad demasiado baja por las proteínas con las que habitualmente interacciona. Sin embargo, si las proteínas de interacción se producen a una concentración muy superior a la normal, se produce una unión suficiente para paliar este defecto. Para construir una situación experimental en que se produzcan esas elevadas concentraciones de ligando, se procede a transfectar células mutantes de levadura (con una mutación sensible a la temperatura en un gen implicado en el transporte vesicular) con un vector plasmídico de levadura en el cual se han clonado fragmentos al azar de DNA genómico de levadura. El plásmido se mantiene en las células en un número de copias elevado, por lo que los que porten genes intactos sobreproducirán el producto normal del gen y permitirán, en consecuencia, que un reducido número de células puedan sobrevivir a temperaturas elevadas. Los fragmentos de DNA relevantes, que probablemente codifican proteínas que interaccionan con la proteína mutada original, pueden ser aislados de las células supervivientes.

Las aproximaciones genéticas y bioquímicas se complementan, y muchas de las proteínas involucradas en el transporte vesicular han sido identificadas de forma independiente a través de estudios bioquímicos de sistemas libres de células de mamíferos y a través de estudios genéticos en levaduras.

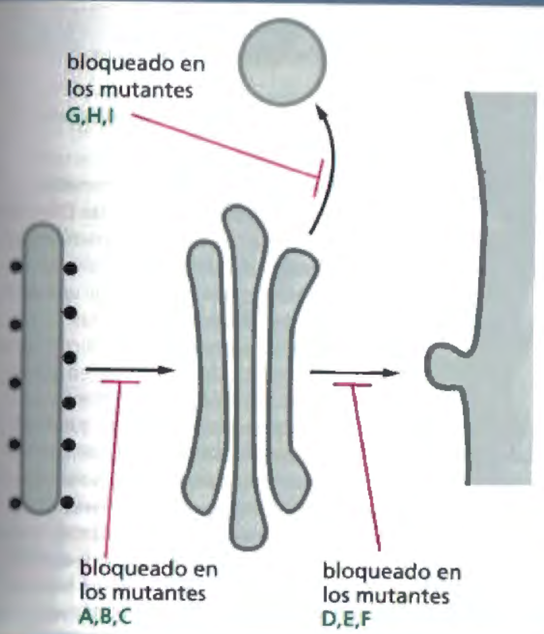
LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN CON GFP HAN REVOLUCIONADO EL ESTUDIO DEL TRANSPORTE INTRACELULAR

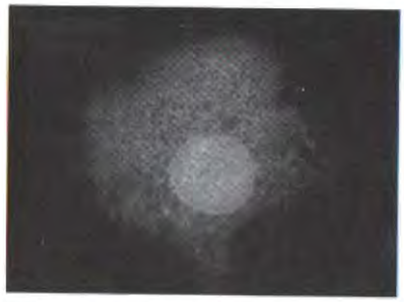
Una manera de seguir el rastro de una proteína en las células vivas es construir proteínas de fusión, en las que la proteína fluorescente verde (GFP) se une mediante técnicas de ingeniería genética a la proteína de interés. Cuando un cDNA que codifica una de estas proteínas de fusión se expresa en una célula, la proteína es visible inmediatamente en un microscopio de fluorescencia, permitiendo su seguimiento en las células vivas a tiempo real. Afortunadamente, para muchas de las proteínas estudiadas, la unión de GFP a la proteína no altera la función de la proteína.

Las proteínas de fusión con GFP se utilizan con frecuencia para estudiar tanto la localización como el desplazamiento de las proteínas en las células. Por ejemplo, el uso de GFP unida a proteínas que entran y salen del núcleo facilita el estudio del transporte nuclear y su regulación. GFP unido a proteínas mitocondriales o del Golgi se utiliza para estudiar el comportamiento de estos orgánulos. GFP unido a proteínas plasmáticas se usa para medir la cinética de su movimiento desde el ER a través de la vía de secreción. Se pueden ver ejemplos de estos experimentos en forma de vídeo en el DVD que acompaña este libro.

El estudio de las proteínas de fusión con GFP se combina con frecuencia con técnicas de FRAP y de FLIP (técnicas descritas en el Capítulo 10), en las que la proteína GFP de regiones seleccionadas es blanqueada mediante una intensa luz láser. Es posible medir la velocidad de difusión o de transporte de la proteína GFP no blanqueda en esa área para obtener estimaciones del transporte o difusión de la proteína en la célula. Por ejemplo, de este modo se ha determinado que muchas enzimas del Golgi se reciclan entre el complejo de Golgi y el ER. <GCTG>

(A-D, por cortesía de Jennifer Lippincott-Schwartz Lab.)





(A) En este experimento, se ha expresado GFP unida a una proteína de cubierta del virus de la estomatitis vesicular –denominada proteína de la cubierta del virus de la estomatitis vesicular– en células en cultivo. La proteína vírica es una proteína integral de membrana que normalmente se desplaza a lo largo de la vía de secreción desde el ER a la superficie celular, donde el virus se ensambla en aquellas células que expresan los demás componentes víricos. La proteína vírica contiene una mutación que permite su exportación desde el ER sólo a baja temperatura. Así pues, en las condiciones de alta temperatura que se muestran, la proteína tiñe el ER.



(B) A medida que la temperatura se reduce, la proteína de fusión GFP se acumula con rapidez en los sitios de salida del ER.



(C) La proteína de fusión se desplaza al complejo de Golgi.



(D) Por último, la proteína de fusión es liberada en la membrana plasmática donde la proteína libre difunde en la membrana plasmática (las flechas señalan un proceso de fusión). A partir de estos estudios se puede determinar la cinética de cada una de las etapas en la vía.

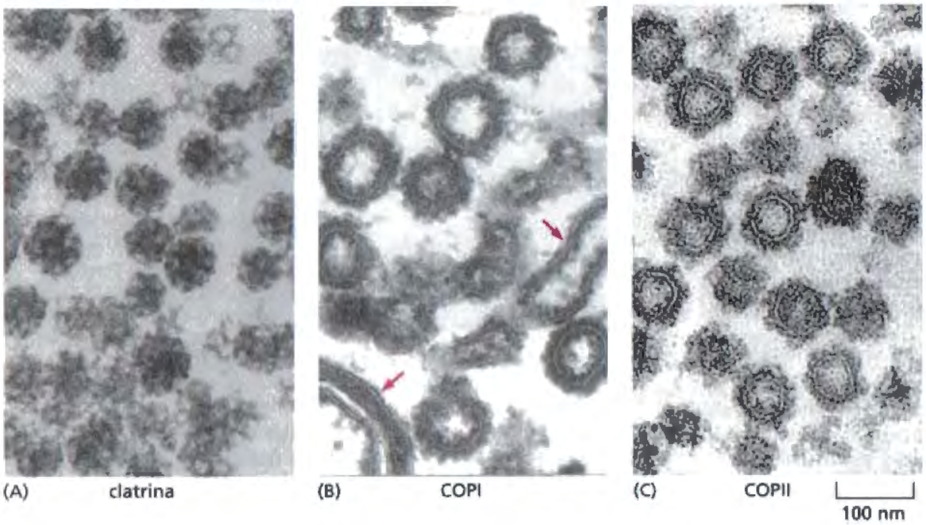


Figura 13–4 Electromicrografías de varias vesículas recubiertas de clatrina, COPI y COPII. Todas las electromicrografías están a la misma escala. (A) Vesículas recubiertas de clatrina. (B) Cisternas del Golgi (*flechas*) en un sistema libre de células en el que se forman vesículas recubiertas de COPI. (C) Vesículas recubiertas de COPII. Obsérvese que las vesículas de clatrina tienen una estructura más regular. (A y B, de L. Orci, B. Glick y J. Rothman, *Cell* 46: 171-184, 1986. Con permiso de Elsevier; C, cortesía de Charles Barlowe y Lelio Orci.)

COPII transportan materiales en las etapas iniciales de la ruta de secreción: las vesículas recubiertas de COPII geman en el ER y las vesículas recubiertas de COPI lo hacen en los compartimientos del Golgi (véase Figura 13–5). Describiremos en primer lugar las vesículas recubiertas de clatrina pues son un buen ejemplo de cómo se forman las vesículas.

La proteína mayoritaria de las vesículas recubiertas de clatrina es la propia **clatrina**. Cada subunidad de clatrina está formada por tres cadenas polipeptídicas grandes y tres pequeñas que, juntas, forman una estructura de tres brazos denominada *trisquelion*. Los trisqueliones de clatrina se ensamblan en estructuras convexas formadas por una red de hexágonos y pentágonos similares a cestos o canastos que forman las depresiones recubiertas en la cara citosólica de las membranas (**Figura 13–6**). En el tubo de ensayo, bajo condiciones apropiadas, los trisqueliones aislados se ensamblan de forma espontánea y forma jaulas poliédricas típicas, incluso en ausencia de las vesículas de membrana que habitualmente rodean estos polímeros (**Figura 13–7**). Así pues, los trisqueliones de clatrina determinan la geometría de la red de clatrina.

Las **proteínas adaptadoras**, otro componente mayoritario de las cubiertas de las vesículas recubiertas de clatrina, forman una segunda capa discreta de la cubierta que se encuentra situada entre la red de clatrina y la membrana. Unen la cubierta de clatrina a la membrana y atrapan varias proteínas transmembrana, incluyendo a los receptores transmembrana –los denominados *receptores de transporte*– que se unen en el interior de la vesícula a las moléculas solubles a transportar. De esta forma, una serie de proteínas transmembrana seleccionadas, junto con proteínas solubles que interaccionan con ellas, son empaquetadas en cada nueva vesícula recubierta de clatrina (**Figura 13–8**).

Se conocen algunos tipos de proteínas adaptadoras. Las mejor caracterizadas están formadas por cuatro subunidades proteicas; otras son proteínas con una sola subunidad. Cada

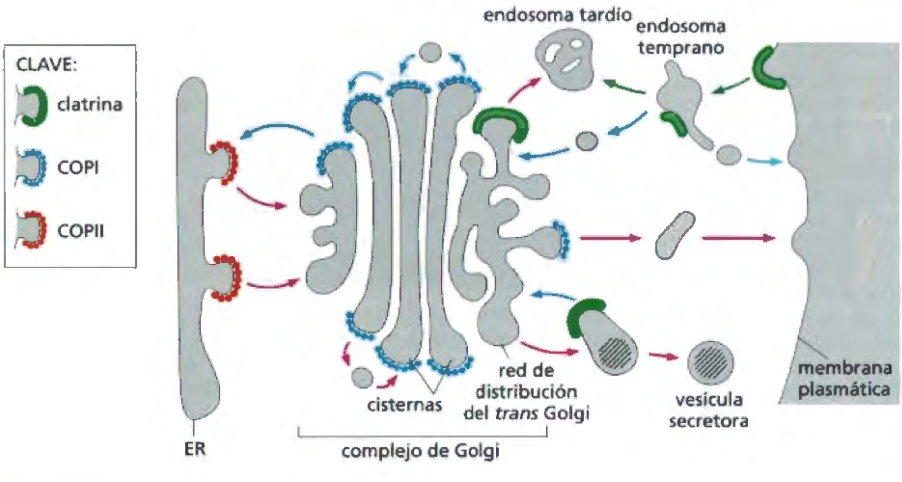


Figura 13–5 Utilización de diferentes cubiertas en el tráfico vesicular. Diferentes proteínas de cubierta seleccionan cargas diferentes y dan forma a las vesículas de transporte que realizan cada una de las etapas del transporte en las rutas biosintética-secretora y endocítica. Cuando las diferentes cubiertas actúan en lugares diferentes de la célula, pueden incorporar diversas proteínas de cubierta que modifican sus propiedades (no se muestra). Muchas células diferenciadas tienen vías adicionales además de las que se muestran en la figura, incluyendo una ruta de clasificación desde la red del *trans* Golgi a la superficie apical en una célula polarizada y una ruta especial de reciclaje para proteínas de las vesículas sinápticas en las sinapsis de las neuronas.

tipo de proteína adaptadora es específica de una serie de receptores de transporte y su utilización permite formar diferentes vesículas recubiertas de clatrina. Las vesículas recubiertas de clatrina que se forman a partir de diferentes membranas utilizan diferentes proteínas adaptadoras y como consecuencia de ello contienen diferentes receptores de transporte y de moléculas transportadas.

El ensamblaje sucesivo de complejos de adaptadores y de moléculas de clatrina en la cara citosólica de la membrana genera fuerzas que permiten la formación de las vesículas recubiertas de clatrina. Las interacciones laterales entre los complejos de adaptadores y entre las moléculas de clatrina contribuyen a la formación de la vesícula.

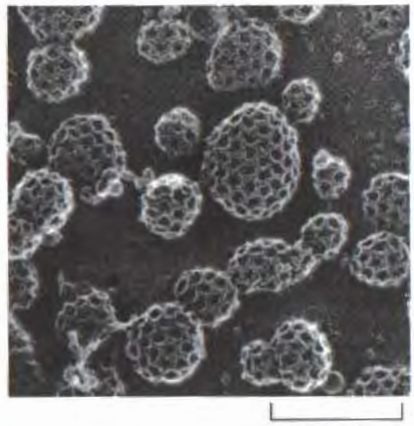


Figura 13–6 Depresiones recubiertas de clatrina y vesículas. Esta electromicrografía de grabado por congelación muestra numerosas depresiones recubiertas de clatrina y vesículas en la superficie interior de la membrana plasmática de fibroblastos en cultivo. Las células se congelan rápidamente en helio líquido, se fracturan y se graban por congelación para exponer la superficie de la membrana plasmática. (De J. Heuser, *J. Cell Biol.* 84:560-683, 1980. Con permiso de The Rockefeller University Press.)

No todas las cubiertas forman estructuras de tipo cesta

No todas las cubiertas forman estructuras tan regulares y universales como sugieren los ejemplos de las cubiertas de clatrina y COP. Algunas cubiertas se podrían describir mejor como complejos proteicos especializados que forman agregados dedicados a proteínas específicas de carga. Un ejemplo es la cubierta denominada **retrómero**, que se ensambla en los endosomas y forma vesículas que devuelven *receptores de hidrolasas ácidas*, como el *receptor de manosa-6-fosfato*, al complejo de Golgi (**Figura 13–9**). Describiremos más adelante la importancia de estos receptores en el transporte de enzimas a los nuevos lisosomas.

El retrómero es un complejo multiproteico que sólo se ensambla en una cubierta en los endosomas cuando:

1. Puede unirse a la cola citosólica de los receptores de carga.
2. Puede interaccionar directamente con una bicapa lipídica curva.
3. Puede unirse a un lípido fosfatidilinositol fosforilado específico (un *fosfoinositol*), que actúa como marcador endosómico, como se describirá más adelante.

Dado que estos tres requerimientos se han de cumplir simultáneamente, parece que el retrómero es un *detector de coincidencia* que sólo se ensambla en el lugar y momento adecuado. Después de su unión como dímero estabiliza la curvatura de la membrana lo que incrementa la facilidad de unión de nuevas subunidades en las proximidades. Así pues, el ensamblaje cooperativo del retrómero permite la formación y gemación de una vesícula de transporte que lleva su carga al complejo de Golgi.

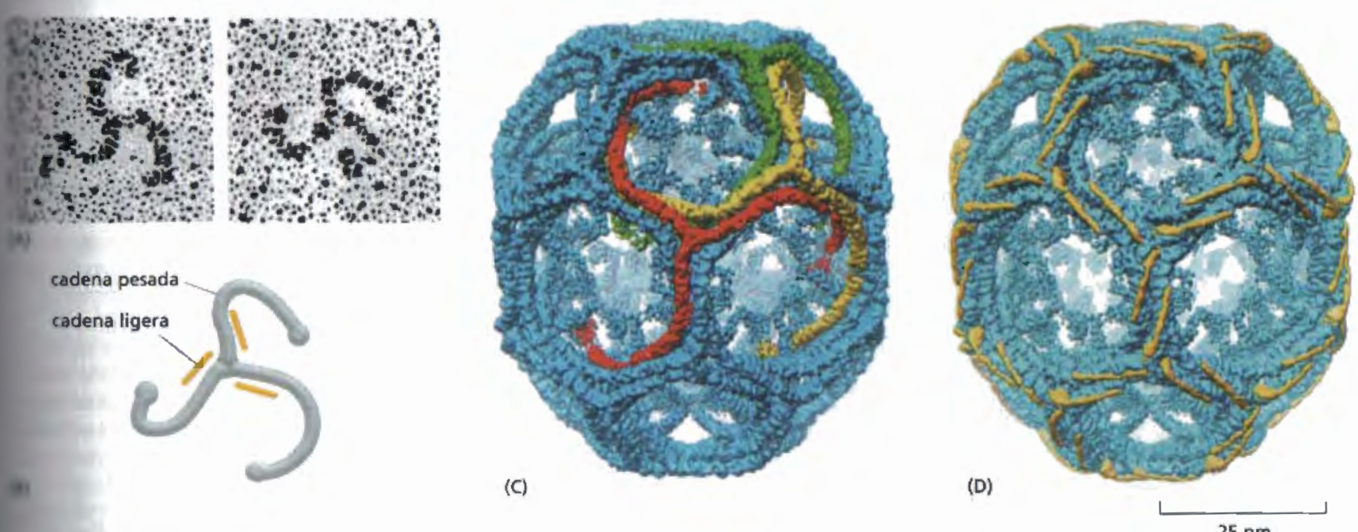


Figura 13–7 Estructura de la cubierta de clatrina. <TATT> (A) Electromicrografía de trisqueliones de clatrina sombreados con platino. Tal como se muestra en (B) cada trisquelion está formado por tres cadenas pesadas y tres cadenas ligeras de clatrina. (C y D) Crioelectromicrografía tomada de una cubierta de clatrina formada por 36 trisqueliones en una malla de 23 pentágonos y 6 hexágonos, en la que se han coloreado las cadenas pesadas (C) y las ligeras (D). Los brazos entrecruzados de los trisqueliones de clatrina forman una cubierta exterior desde la que se proyectan los dominios N-terminales de los trisqueliones hacia el interior formando una capa interna que es posible ver por los orificios de la estructura. Esta capa interna es la que establece contactos con las proteínas adaptadoras que se muestran en la Figura 13–8. Aunque la cubierta mostrada es demasiado pequeña para envolver una vesícula membranosa, está organizada de la misma forma que las cubiertas de clatrina que recubren las vesículas, presentando 12 pentágonos y un gran número de hexágonos, en una estructura que recuerda a la cubierta de un balón de fútbol. (A, de E. Ungewickell y D. Branton, *Nature* 289:420-422, 1981; C y D, de A. Fotin et al., *Nature* 432: 573-579, 2004. Todo con permiso de Macmillan Publishers Ltd.)

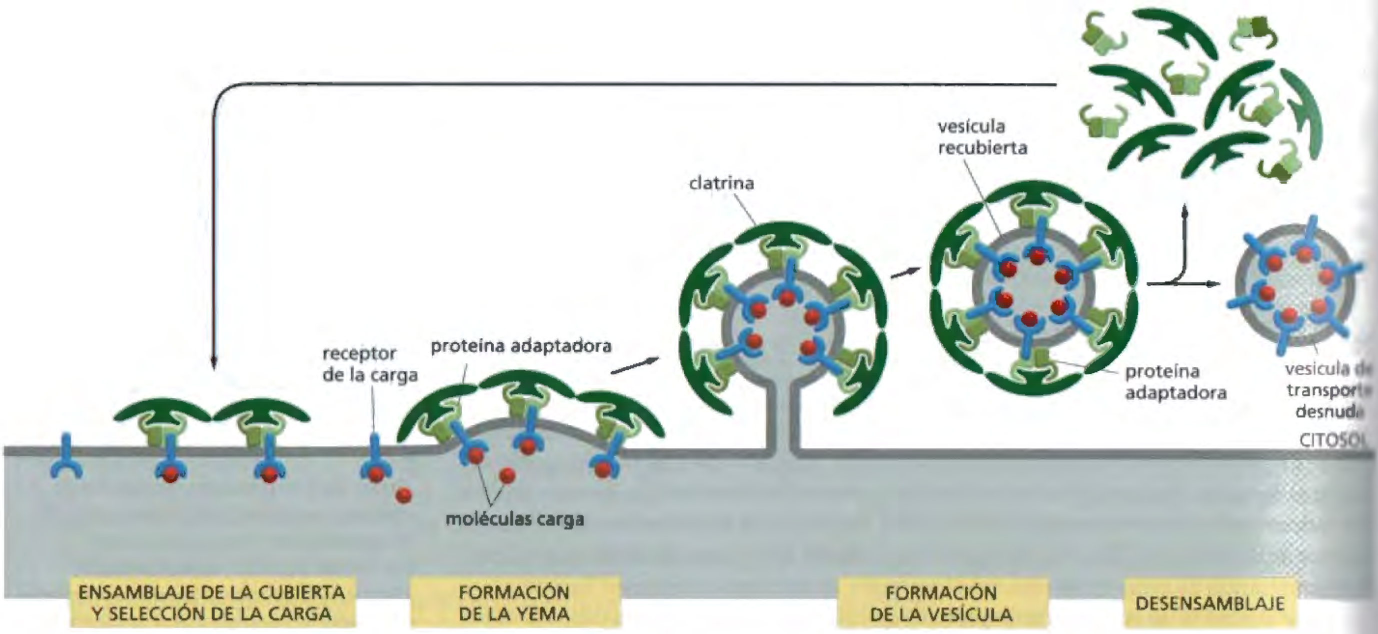


Figura 13–8 Ensamblaje y desensamblaje de una cubierta de clatrina. El ensamblaje de la cubierta de clatrina induce una curvatura en la membrana que conduce a la formación de yemas revestidas de tamaño uniforme. Las proteínas adaptadoras se unen tanto a los trisqueliones de clatrina como a los receptores de carga unidos a membrana, mediando así el reclutamiento selectivo tanto de la membrana como de las moléculas de carga al interior de la vesícula. El revestimiento de clatrina se elimina inmediatamente después de la formación de la vesícula.

Las proteínas adaptadoras que se encuentran en las vesículas recubiertas de clatrina también se unen a fosfoinositoles, que no sólo tienen una importante función en la determinación de dónde y cómo se ensamblan las cubiertas en la célula, sino que son ampliamente utilizados como determinantes moleculares de la identidad de los compartimientos. Esto facilitará, como veremos más adelante, el control de los procesos de tráfico de membrana.

Los fosfoinositoles como marcadores de orgánulos y de dominios de membrana

Los fosfolípidos de inositol son por regla general menos del 10% del total de fosfolípidos de una membrana, pero tienen importantes funciones reguladoras. Pueden seguir ciclos rápidos de fosforilación y desfosforilación en las posiciones 3´, 4´ y 5´ del grupo inositol que producen varios tipos de **fosfoinositoles (PIP)**. La interconversión de fosfatidilinositol (PI) y PIP está muy compartimentada: en los diferentes orgánulos de la ruta endocítica y biosintética-

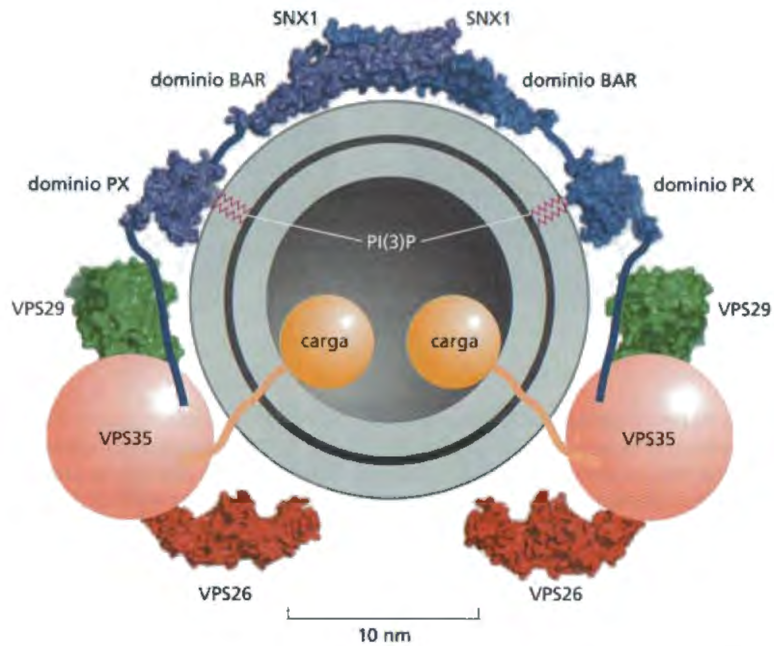


Figura 13–9 Modelo de ensamblaje del retrómero en las membranas endosómicas. Las cuatro subunidades del retrómero, SNX1, VPS29, VPS35 y VPS26 forman dominios recubiertos en la membrana endosómica que capturan y clasifican en vesículas moléculas carga, entre las que se incluyen proteínas transmembrana como los receptores de hidrolasas ácidas, que vuelven a la red de distribución del *trans* Golgi. VPS35 se une a la cola citosólica de las proteínas de carga transmembrana. La proteína SNX1 contiene diferentes dominios proteicos: un *dominio PX* que se une a fosfatidilinositol fosforilado PI(3)P, y un *dominio BAR* que está implicado en la dimerización y unión a membranas muy curvadas. Tanto los dominios PX como los BAR son módulos proteicos que se encuentran en muchas proteínas en las que tienen funciones similares. Todos los componentes se han representado a una escala comparable con la excepción de PI(3)P que se ha aumentado para aumentar su visibilidad. (Adaptado de J.S. Bonifacino y R. Rojas, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:568-579, 2006. Con permiso de Macmillan Publishers Ltd.)

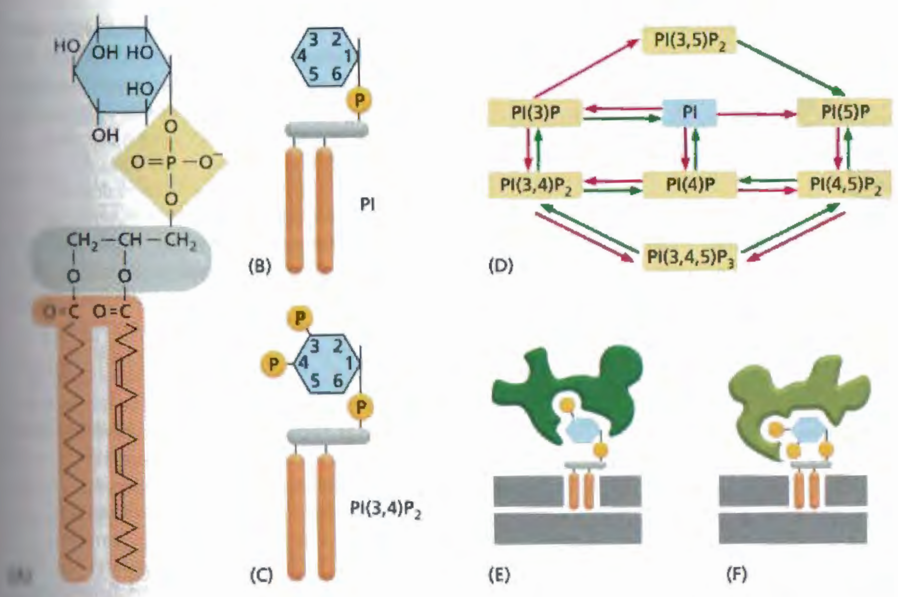


Figura 13–10 Fosfatidilinositol (PI) y fosfoinositoles (PIP). (A, B) La estructura de PI muestra los grupos hidroxilo libres del azúcar inositol que, en principio, pueden ser modificados. (C) La fosforilación de uno, dos o tres de los grupos hidroxilo en PI por PI quinasa y PIP quinasa produce una gran variedad de especies PIP. Se denominan de acuerdo con el número de grupos fosfato (en subíndice) y su posición en el anillo (en paréntesis) añadido a PI. Se muestra la estructura de $PI(3,4)P_2$. (D) Las células animales tienen algunas PI quinasa y PIP quinasa y un número similar de PIP fosfatasa, que se localizan en los diferentes orgánulos donde catalizan, de manera regulada, la producción de determinados PIP. Las fechas *rojas* y *verdes* destacan las reacciones quinasa y fosfatasa, respectivamente. (E, F) Los grupos de cabeza de los fosfoinositoles son reconocidos por dominios proteicos que discriminan entre las diferentes formas. De esta manera, ciertos grupos de proteínas que contienen esos dominios pueden ser reclutadas en regiones de membrana donde se encuentran presentes estos fosfoinositoles. En la figura se muestran PI(3)P y $PI(4,5)\ P_2$. (D, modificado de M.A. de Matteis y A. Godi, *Nat. Cell Biol* 6:487-492, 2004. Con permiso de Macmillan Publishers Ltd.)

secretora se encuentran diferentes tipos de PI y PIP quinasa y PIP fosfatasa (**Figura 13–10**). La distribución, regulación y equilibrios locales de estas enzimas determinan la concentración estacionaria de cada una de las especies de PIP. Así pues, la distribución de PIP varía entre orgánulos y, frecuentemente dentro de una misma membrana, entre diferentes regiones, definiendo dominios o regiones específicas de membrana.

Muchas proteínas implicadas en las diferentes etapas del transporte vesicular presentan dominios que se unen con elevada especificidad a las cabezas polares de ciertos PIP, distinguiendo entre diferentes formas fosforiladas. El control local de las PI y PIP quinasa y de las PIP fosfatasa puede ser usado como un mecanismo de control rápido de unión de proteínas a una membrana o región de membrana. La producción de un tipo particular de PIP permite reclutar proteínas que contengan regiones de unión específicas a ese PIP. Así, estas proteínas de unión a PIP contribuyen a regular tanto la formación de vesículas como otras etapas del transporte de membrana (**Figura 13–11**). Esta misma estrategia es muy utilizada para reclutar proteínas de señalización intracelular en la membrana plasmática como respuesta a señales extracelulares (descrito en el Capítulo 15).

La separación de la vesícula y el desprendimiento de la cubierta son regulados por proteínas citosólicas

Cuando se está formando una vesícula recubierta de clatrina, unas proteínas citosólicas solubles, entre las que se incluye la **dinamina**, se ensamblan formando un anillo alrededor del cuello de cada una de las vesículas (**Figura 13–12**). La dinamina contiene un dominio de unión a $PI(4,5)P_2$, que ancla la proteína a la membrana, y un dominio GTPasa que regula la frecuencia a la que las vesículas se separan de la membrana. En el proceso de separación se aproximan mucho las dos capas no citosólicas de la membrana y se fusionan, sellando la vesícula. Para poder realizar esta función, la dinamina recluta otras proteínas del cuello de la vesícula en formación que, junto con la dinamina, contribuyen a deformar la zona de membrana y distorsionan directamente la estructura de la bicapa lipídica, cambiando su composición por la acción de enzimas modificadoras de lípidos, o mediante ambos mecanismos.

Cuando se ha separado de la membrana, la vesícula rápidamente pierde su cubierta de clatrina. Una PIP fosfatasa que se encuentra formando parte de la cubierta de la vesícula recubierta de clatrina destruye el $PI(4,5)P_2$ de la membrana, debilitando la unión de las proteínas adaptadoras. Además una proteína chaperona Hsp70 actúa como ATPasa de eliminación de la cubierta y utiliza la hidrólisis del ATP para separar las proteínas de la cubierta de clatrina. Parece que otra proteína de la cubierta denominada *auxilina* activa la ATPasa. La depresión recubierta dura más tiempo que la cubierta proteica sobre la vesícula, por lo que han de existir mecanismos de control que eviten que la clatrina sea eliminada antes de que la vesícula se forme por completo (se trata más adelante).

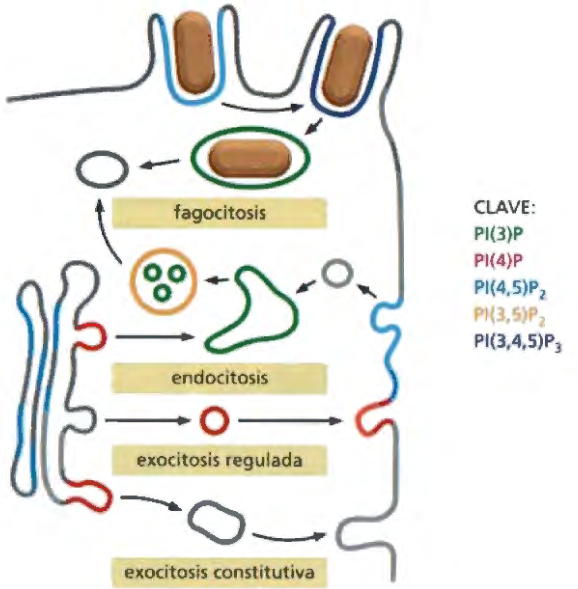


Figura 13–11 Localización intracelular de los fosfoinositoles. Los diferentes tipos de PIP se encuentran situados en diferentes regiones de membrana, donde es frecuente que se encuentren asociados a procesos concretos de transporte vesicular. Por ejemplo, la membrana de las vesículas de secreción contiene PI(4)P. Cuando las vesículas se fusionan con la membrana plasmática, una PI 5-quinasa que se encuentra allí transforma el PI(4)P en $PI(4,5)P_2$, que a su vez ayuda a reclutar proteínas adaptadoras, iniciándose la formación de una depresión recubierta de clatrina como primera etapa de la endocitosis mediada por clatrina. Una vez que la vesícula recubierta de clatrina se separa de la membrana plasmática, la acción de una PI(5)P fosfatasa hidroliza el $PI(4,5)P_2$, inestabilizando la unión de las proteínas adaptadoras y facilita el desensamblaje de la cubierta de la vesícula. Más adelante en este mismo capítulo se describe la diferencia entre la exocitosis regulada y la constitutiva. (Modificado de M.A. de Matteis y A. Godi *Nat. Cell Biol.* 6: 487-492, 2004. Con permiso de Macmillan Publishers Ltd.)

Unas GTPasas monoméricas controlan el ensamblaje de la cubierta

Para equilibrar el tráfico vesicular desde y hacia un compartimiento es necesario que las proteínas de cubierta se ensamblen solamente cuando sea necesario. Aunque la producción local de PIP parece tener un papel crucial en la regulación del ensamblaje de las cubiertas de clatrina en la membrana plasmática y el complejo de Golgi, las células tienen mecanismos adicionales para regular la formación de las cubiertas. Por ejemplo, las *GTPasas de control de reclutamiento* de la cubierta controlan el ensamblaje de cubiertas de clatrina en los endosomas y de cubiertas de COPI y COPII en el Golgi y en las membranas del ER.

Muchas de las etapas del transporte vesicular dependen de una serie de proteínas de unión a GTP que controlan tanto los aspectos espaciales como temporales del intercambio de membranas. Como se describe en el Capítulo 3, algunas proteínas de unión a GTP regulan la mayoría de los procesos en las células eucariotas. Actúan como interruptores moleculares que oscilan entre un estado activo unido a GTP y un estado inactivo unido a GDP. Dos clases de proteínas regulan el paso de uno a otro estado: los *factores intercambiadores de nucleótidos de guanina* (*GEF: guanine-nucleotide-exchange factors*), que activan a las

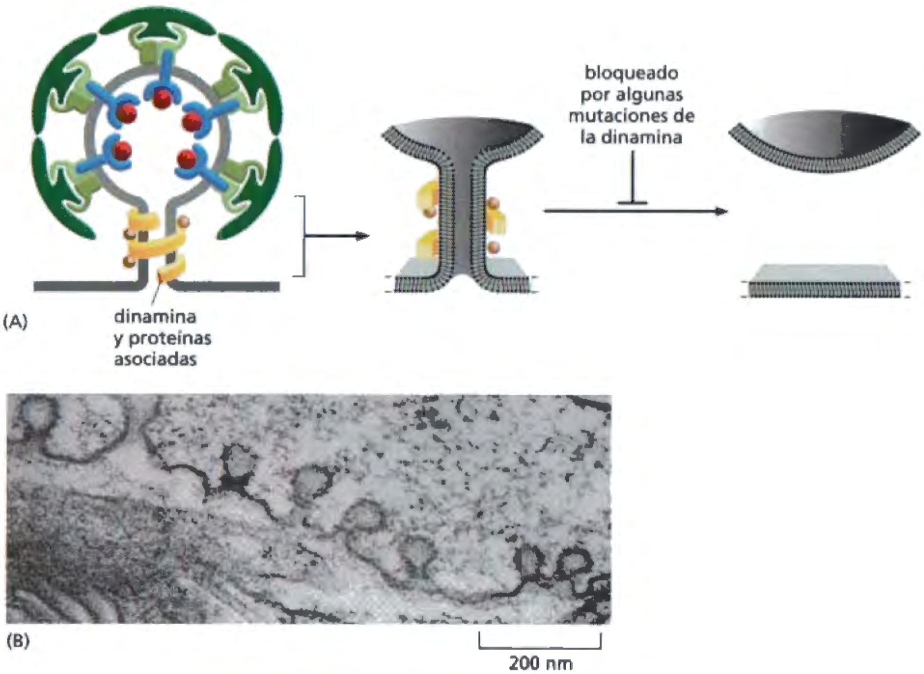


Figura 13–12 Papel de la dinamina en la separación de las vesículas recubiertas de clatrina de la membrana. (A) La dinamina se ensambla en forma de anillo alrededor del cuello de la depresión. Se cree que el anillo de dinamina recluta otras proteínas al cuello de la vesícula que, junto a la dinamina, desestabilizan las bicapas lipídicas de forma que las capas no citosólicas de las bicapas lipídicas fluyen una en la otra. La vesícula recién formada se separa de la membrana. Determinadas mutaciones de la dinamina pueden tanto activar como bloquear el proceso de separación. (B) La dinamina fue descubierta como la proteína que era defectuosa en el mutante *shibire* de *Drosophila*. Estas moscas mutantes quedan paralizadas porque la endocitosis que está mediada por clatrina se detiene; las sinapsis nerviosas son incapaces de reciclar y se bloquea la señalización sináptica. En esta electromicrografía se muestran profundas depresiones recubiertas de clatrina formadas en las células nerviosas de la mosca, con un anillo ensamblado alrededor del cuello, que se asume que es la dinamina mutada. El proceso se detiene porque no se produce la fusión de la membrana. (B, de J.H. Koenig y K. Ikeda, *J. Neurosci.* 9:3844-3860, 1989. Con permiso de la Society of Neuroscience.)

proteínas al catalizar el intercambio de GDP por GTP, y las *proteínas activadoras de la actividad GTPasa* (*GAP: **GTPase-activating proteins***) que inactivan las proteínas activando la hidrólisis del GTP unido a GDP (véase Figura 3–71). Aunque tanto las proteínas de unión a GTP monoméricas (GTPasas monoméricas) como las heterotriméricas de unión a GTP (proteínas G) tienen papeles importantes en el tráfico vesicular, se conoce mejor el que desempeñan las GTPasas monoméricas y, por ello, la exposición se centrará en ellas.

Las **GTPasas de reclutamiento** de la cubierta son miembros de la familia de las GTPasas monoméricas. Incluyen a las **proteínas Arf**, responsables tanto del ensamblaje de las cubiertas COPI como de clatrina en las membranas del Golgi, y a la **proteína Sar1**, responsable del ensamblaje de las cubiertas COPII en la membrana del ER.

Las GTPasas de reclutamiento de cubierta se encuentran habitualmente a concentración elevada en el citosol, en un estado inactivo, unidas a GDP. Cuando se tiene que formar una vesícula recubierta de COPII a partir de la membrana del ER, una proteína Sar1-GEF específica unida a la membrana del ER se une a Sar1 citosólico, haciendo que Sar1 libere GDP y una GTP en su lugar. (Hay que tener presente que los niveles de GTP en el citosol son muy superiores a los de GDP y que, por tanto, tenderá a unirse espontáneamente a GTP una vez libere GDP.) En este estado unido a GTP, la proteína Sar1 expone una hélice anfipática que se inserta en la cara citosólica de la bicapa lipídica de la membrana del ER e inicia la vesiculación (**Figura 13–13**). Las otras proteínas GEF y GTPasas de reclutamiento actúan de forma similar en otras membranas.

Algunas subunidades de proteínas de cubierta también actúan, aunque más débilmente, con los grupos de cabeza polar de ciertas moléculas lipídicas, sobre todo ácido fosfatídico y fosfoinositoles, así como con las colas citoplasmáticas de algunas de las proteínas de membrana que son reclutadas en la depresión. Todas estas interacciones proteína-lípido y proteína-proteína unen con fuerza la cubierta a la membrana, lo que provoca la deformación de la membrana y la aparición de una depresión, que se separará como una vesícula recubierta.

El reclutamiento de las GTPasas de cubierta también tiene un papel en el desensamblaje de la cubierta. La hidrólisis de GTP unido a GDP causa un cambio conformacional de la

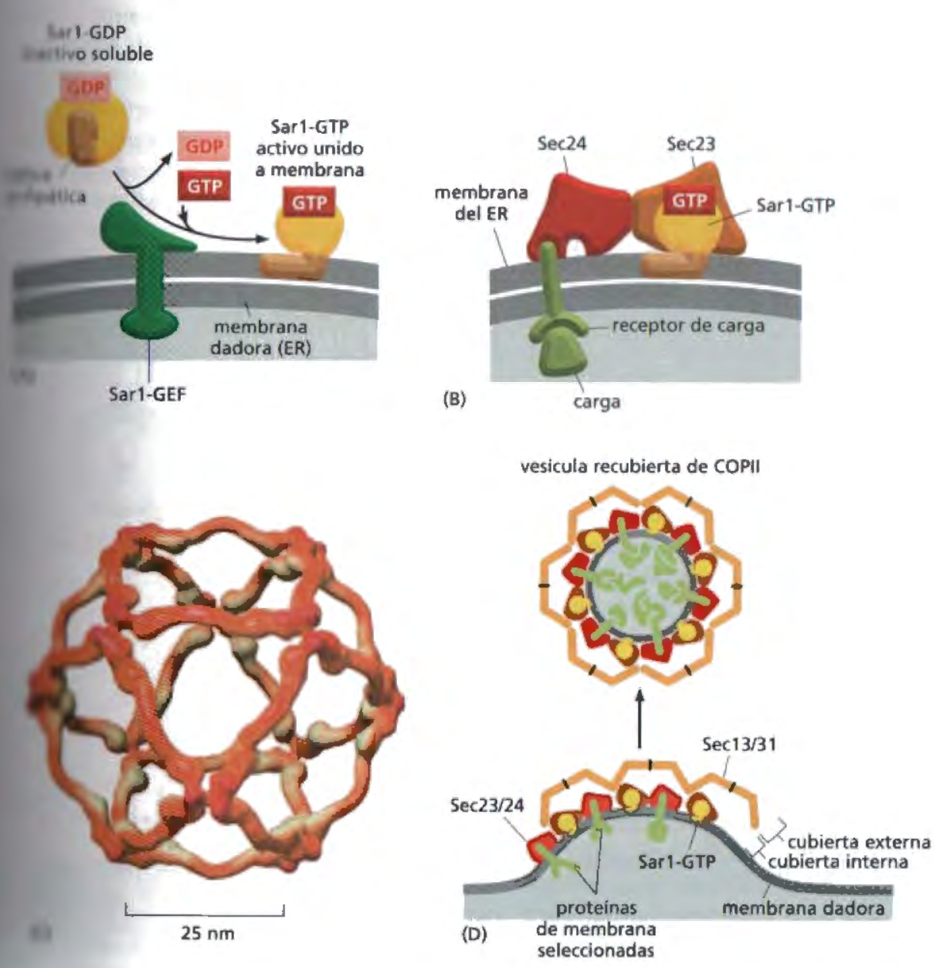


Figura 13–13 Formación de una vesícula recubierta de COPII. (A) La proteína Sar1 es una GTPasa de reclutamiento de cubierta. Cuando está inactiva, Sar1-GDP se une a un Sar1-GEF en la membrana del ER; este hecho provoca la liberación del GDP de Sar1 y su unión a GTP. La proteína Sar1-GEF (también denominada Sec12) fue descubierta como uno de los mutantes sensibles a los cambios de temperatura que bloquean el transporte desde el ER al complejo de Golgi (véase Panel 3–1). Un cambio conformacional regulado en Sar1 expone una hélice anfipática que se inserta en la capa citosólica de la membrana del ER, iniciando la curvatura de la membrana. (B) Sar1 unido a GTP se une a un complejo de dos proteínas de cubierta COPII, denominadas Sec23/24. La estructura de un cristal de las proteínas Sec23/24 junto con Sar1 permite predecir el modo en que la hélice anfipática de Sar1 ancla el complejo en la membrana. Sec24 tiene sitios diferentes de unión para colas citoplasmáticas de los receptores de carga. Toda la superficie del complejo que se une a la membrana está ligeramente curvada y se adapta al diámetro de las vesículas recubiertas de COPII. (C) Un complejo de dos proteínas COPII adicionales, denominadas Sec13/31, forma la capa exterior de la cubierta. De manera similar a la clatrina, Sec13/31 solas pueden polimerizar formando mallas regulares con las dimensiones adecuadas para rodear una vesícula recubierta de COPII. (D) Sar1-GTP activo y unido a la membrana recluta subunidades COPII a la membrana. Esto provoca la formación de una depresión en la membrana que incluye determinadas proteínas transmembrana. Un proceso de fusión posterior separa la vesícula de la membrana.

Se cree que otras vesículas recubiertas se forman de una manera similar. La GTPasa de reclutamiento de cubierta Arf también presenta una hélice anfipática pero, a diferencia de Sar1, la hélice tiene unido covalentemente un ácido graso que contribuye a su hidrofobicidad. Como en Sar1, la hélice anfipática regulada está oculta en el estado unido a GDP y expuesta en el estado unido a GTP. Como se describirá más adelante, las proteínas *GTPasa Rab* regulan su unión a las membranas de un modo similar a éste (véase Figura 13–14).
(C, modificada de S.M. Stagg et al., *Nature* 439:234-238, 2006. Con permiso de Macmillan Publishers Ltd.)

GTPasa que extrae su cadena hidrofóbica de la membrana, provocando el desensamblaje de la cubierta de la vesícula. Aunque no se conoce qué es lo que desencadena la hidrólisis del GTP, se ha propuesto que el funcionamiento de las GTPasas es similar al de un temporizador, hidrolizando GTP con una frecuencia baja pero predecible. Por ejemplo, las cubiertas COPII aceleran la hidrólisis de GTP mediante Sar1 y provocan el desensamblaje de la cubierta un cierto tiempo después de que se iniciara el ensamblaje. Así pues, una vesícula sólo se formará por completo cuando el proceso de vesiculación sea más rápido que el de desprendimiento de la cubierta; de no ser así, el desensamblaje se produciría antes de que la vesícula se separase de la membrana y el proceso tendría que empezar de nuevo en un lugar y momento más apropiado.

No todas las vesículas de transporte son esféricas

Aunque la formación de vesículas que se produce en diferentes regiones de la célula tiene muchos elementos en común, en cada una de las membranas celulares presenta ciertas particularidades. Por ejemplo, la membrana plasmática es relativamente plana y rígida, debido a su riqueza en colesterol y a la presencia de un citoesqueleto cortical. En ese caso, las cubiertas de clatrina tienen que producir fuerzas considerables para introducir curvatura; sobre todo en el cuello de las vesículas en formación, la dinamina y sus proteínas asociadas deben facilitar la curvatura necesaria para el proceso de separación. Por el contrario, en muchas membranas intracelulares la formación de vesículas se produce en regiones que ya están curvadas, como el borde de las cisternas del Golgi o el final de los túbulos de membrana. En estos lugares, la principal función de las cubiertas es capturar la carga adecuada más que deformar la membrana.

Las vesículas de transporte pueden tener diferentes formas y tamaños. Cuando se observan al microscopio células vivas, modificadas genéticamente para que expresen componentes fluorescentes de membrana, se puede ver cómo, tanto desde los endosomas como desde la red del *trans* Golgi, se emiten de forma continua largos túbulos. Las proteínas de cubierta se ensamblan sobre los túbulos y ayudan a reclutar las moléculas a transportar. Los túbulos pueden o bien separarse o bien formar vesículas con la ayuda de proteínas similares a la dinamina, actuando como vesículas de transporte. Dependiendo de las eficiencias relativas de tubulación y fragmentación de las membranas, se pueden formar vesículas de diferentes formas y tamaños. Así pues, el transporte vesicular no siempre tiene lugar a través de vesículas esféricas de un tamaño uniforme, sino que puede suponer la participación de grandes fragmentos del orgánulo dador.

Los túbulos tienen una relación de superficie a volumen muy superior a la de los orgánulos desde los que se forman. Están por tanto relativamente enriquecidos en proteínas de membrana respecto a proteínas solubles. Tal como se indicará esta propiedad es útil en la clasificación de proteínas en los endosomas.

Las proteínas Rab guían el direccionamiento de las vesículas

Para asegurar un flujo ordenado del tráfico vesicular, las vesículas de transporte han de ser muy selectivas en el reconocimiento de la membrana diana con la que se fusionarán. Debido a la existencia de una gran diversidad de sistemas de membrana y a lo atestado que está el interior celular, es probable que una vesícula se encuentre con muchas membranas diana antes de encontrar la correcta. La especificidad en el direccionamiento está asegurada porque todas las vesículas presentan marcadores de superficie que las identifican con su origen y con su tipo de carga y porque las membranas diana presentan receptores complementarios que reconocen a los marcadores apropiados. Este crucial proceso de reconocimiento está controlado por dos tipos de proteínas: las *proteínas Rab* que dirigen la vesícula a puntos específicos sobre la membrana diana adecuada, y las proteínas *SNARE* que participan en la fusión de las bicapas lipídicas.

Las **proteínas Rab** desempeñan un papel esencial en el transporte vesicular. De manera similar a las GTPasas de reclutamiento de las cubiertas, que hemos descrito anteriormente (véase Figura 13–13), también son GTPasas monoméricas. Con alrededor de 60 miembros, forman la familia más numerosa de GTPAsas monoméricas. Cada una de las proteínas Rab se asocia con uno o más orgánulos membranosos de la vía biosintética-secretora o endocítica; cada uno de estos orgánulos tiene al menos una proteína Rab en su superficie citosólica

Tabla 13–1 Localización subcelular de algunas proteínas Rab

PROTEÍNA	ORGÁNULO
Rab1	ER y complejo de Golgi
Rab2	red del *cis* Golgi
Rab3A	vesículas sinápticas, gránulos de secreción
Rab4/Rab11	endosomas tempranos
Rab5A	membrana plasmática, vesículas revestidas de clatrina, endosomas tempranos
Rab5C	endosomas tempranos
Rab6	cisternas del medio y *trans* Golgi
Rab7	endosomas tardíos
Rab8	vesículas de secreción (basolaterales)
Rab9	endosomas tardíos, red del *trans* Golgi

(**Tabla 13–1**). Su distribución altamente específica sobre los diferentes sistemas de membranas hacen de las proteínas Rab marcadores moleculares ideales para identificar cada uno de los tipos de membrana y para dirigir el tráfico vesicular entre ellos. Las proteínas Rab pueden funcionar sobre las vesículas de transporte, las membranas diana o sobre ambas.

De la misma forma que para las GTPasas de reclutamiento de las cubiertas, las proteínas Rab oscilan entre la membrana y el citosol y regulan la unión reversible de complejos proteicos sobre la membrana. En su estado unido a GDP son inactivas y se encuentran unidas a otra proteína (*GDI*: *Rab-GDP dissociation inhibitor*) que las mantiene solubles en el citosol, mientras que en su estado unido a GTP son activas y se encuentran estrechamente unidas a la membrana de un orgánulo o de una vesícula de transporte. Las proteínas Rab-GEF unidas a la membrana activan a las proteínas Rab tanto en las vesículas de transporte como en la membrana diana pues la activación de Rab parece ser necesaria en ambos casos. Una vez unida a GTP y anclada en la membrana a través de un lípido hidrofóbico, se une a otras proteínas, las denominadas **efectores Rab**, que facilitan el transporte vesicular, el reconocimiento de membrana y la fusión (**Figura 13–14**). La hidrólisis de GTP ajusta la concentración de Rab activo en la membrana y, como consecuencia, la concentración de su efector sobre dicha membrana.

A diferencia de la estructura, muy conservada, de las proteínas Rab, la estructura de los efectores de Rab varía mucho de una proteína Rab a otra. Algunos efectores Rab son *proteínas motoras* que propulsan vesículas a lo largo de los filamentos de actina o de microtúbulos hacia su diana apropiada. Otras son *proteínas de unión*, algunas de las cuales tienen largas estructuras filamentosas que actúan como "hilos de pescar" que se extienden uniendo dos membranas separadas más de 200 nm; otras proteínas de unión son grandes complejos proteicos que enlazan dos membranas cuando se encuentran bastante próxi-

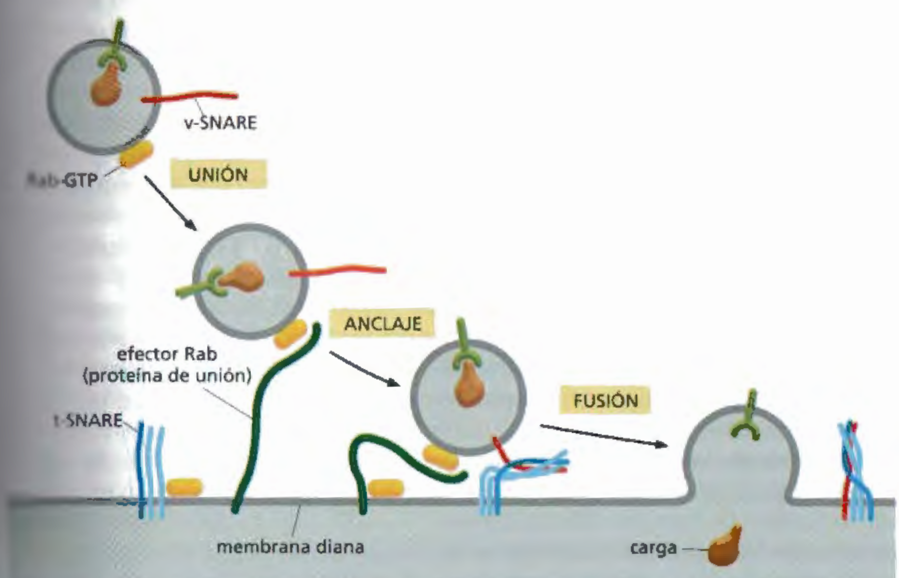


Figura 13–14 Anclaje de una vesícula a la membrana diana. Las proteínas efectoras de Rab interaccionan a través de las proteínas Rab activas (Rab-GTP, *amarillo*) localizadas en la membrana diana, de la vesícula o en ambas, estableciendo el primer contacto entre las dos membranas que se fusionarán. En el ejemplo que se muestra, el efector Rab es una proteína de unión filamentosa (*verde*). A continuación, las proteínas SNARE de las dos membranas (*roja* y *azul*) se aparean anclando la vesícula a la membrana y catalizando la fusión entre las dos bicapas lipídicas próximas.

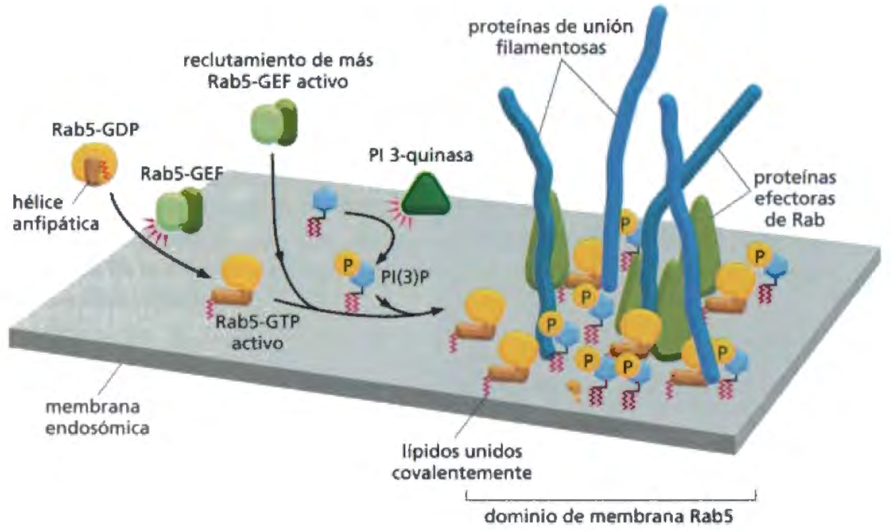


Figura 13–15 Formación de un dominio Rab 5 en la membrana endosómica Una GEF específica de Rab5 de la membrana del endosoma se une a la proteína Rab5 e induce el intercambio de su GDP por GTP. La unión a GTP modifica la conformación de la proteína Rab que expone una hélice anfipática y un grupo lipídico unido covalentemente, a través de los cuales Rab5-GTP se ancla a la membrana. Rab5 activa la PI 3-quinasa, la cual transforma PI en PI(3)P. Ambos compuestos, PI(3)P y Rab5, unen una amplia variedad de proteínas efectoras de Rab que contienen lugares de unión a PI(3)P, como proteínas de unión filamentosas que se unen a vesículas recubiertas de clatrina en formación a partir de la membrana plasmática. Rab5 activo también recluta más Rab5-GEF activando aún más el ensamblaje de Rab5 en la membrana.

Parece que los ciclos regulados de hidrólisis e intercambio GDP-GTP regulan el tamaño y las actividades de los dominios Rab de una manera dinámica. A diferencia de las proteínas SNARE, que son proteínas transmembrana, el ciclo GDP/GTP, ya sea acoplado a su posicionamiento en la membrana o soluble en el citosol, dota a las proteínas Rab de un mecanismo de control rápido de su ensamblaje o desensamblaje sobre la membrana. Por ejemplo, durante el transporte entre los endosomas tempranos y tardíos, Rab5 puede ser desplazado y sustituido por Rab7, lo que determina que la carga sea destinada a degradación. (Adaptado de M. Zerial y H. McBride, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:107-117, 2001. Con permiso de Macmillan Publishers Ltd.)

mas. Los efectores Rab también pueden interactuar con las proteínas SNARE y acoplar el anclaje a la fusión.

La misma proteína Rab puede unirse a muchos efectores. El ensamblaje de las proteínas Rab y de sus efectores sobre una membrana es un proceso cooperativo que conduce a la delimitación de áreas grandes y especializadas en la membrana. Por ejemplo, Rab5 se ensambla sobre las membranas endosómicas y participa en la captura de vesículas recubiertas de clatrina que llegan desde la membrana plasmática. Recluta proteínas de unión para cazar las vesículas que entran. Inicialmente Rab5-GEF recluta Rab5 al endosoma que pasa a su forma activa, unida a GTP, y queda anclado en la membrana (**Figura 13–15**). La proteína Rab5 activa recluta más Rab5-GEF al endosoma, estimulando de ese modo el reclutamiento de más Rab5 en la misma área. Además, Rab5 activo activa una PI 3-quinasa que convierte localmente PI a PI(3)P que, a su vez, une a algunos efectores de Rab5. Este tipo de retroalimentación positiva incrementa en gran medida el proceso de ensamblaje y ayuda a establecer diferentes regiones de membrana funcionalmente diferentes en una membrana continua.

La membrana endosómica es un buen ejemplo de cómo las diferentes proteínas Rab y sus efectores contribuyen a generar muchos dominios especializados, cada uno de ellos con su propia serie de funciones específicas. Así pues, mientras que los dominios Rab5 actúan como receptores de vesículas de entrada procedentes de la membrana plasmática, se cree que unos dominios diferentes de Rab11 y Rab4 organizan en la misma membrana la formación de vesículas de reciclaje que devuelven las proteínas desde el endosoma a la membrana plasmática. Una vez ensamblados estos dominios coexisten en la misma membrana durante largos periodos.

Las proteínas SNARE participan en el proceso de fusión

Cuando la vesícula de transporte se ha unido a su membrana diana, libera su carga después de fusionar su membrana. Para que se puedan fusionar las membranas es necesario aproximar las bicapas lipídicas hasta una distancia de 1,5 nm una de otra de manera que puedan juntarse. Cuando las membranas se encuentran tan próximas, los lípidos pueden fluir de una a otra. Para que se produzca esta aproximación, el agua tiene que desplazarse de la superficie hidrofílica de la membrana y este proceso es muy desfavorable desde el punto de vista energético. Parece probable que la superación de esa barrera energética sea posible por la acción de *proteínas de fusión* especializadas que catalizan todas las fusiones de membrana en la célula. Ya se ha descrito el papel de la dinamina en una tarea similar durante la separación de las vesículas recubiertas de clatrina (véase Figura 13–12).

Las **proteínas SNARE** (o simplemente **SNARE**) catalizan las reacciones de fusión de membrana en el transporte vesicular. También aportan especificidad adicional en el proceso de transporte contribuyendo a asegurar que sólo se fusionen las vesículas dirigidas correctamente. Se conocen al menos 35 SNARE diferentes en las células animales cada una de las cuales está asociada a un orgánulo particular en la ruta biosintética-secretora o endocítica.

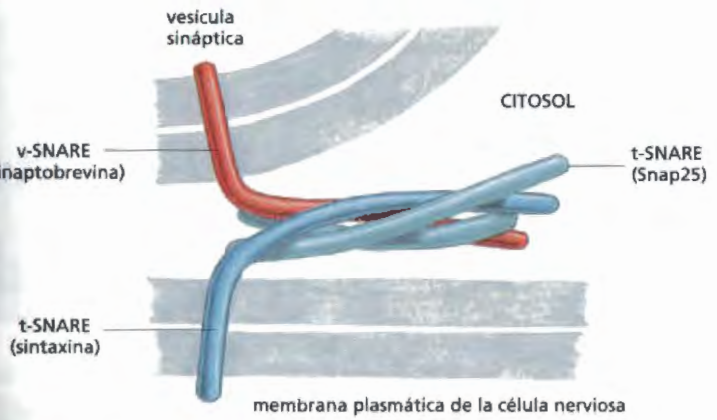


Figura 13–16 Estructura de un complejo trans-SNARE. Las SNARE responsables del anclaje de las vesículas sinápticas en la membrana plasmática de los terminales nerviosos son tres proteínas. La v-SNARE *sinaptobrevina* y la t-SNARE *sintaxina* son proteínas transmembrana y cada una de ellas contribuye con una hélice α al complejo. La t-SNARE *Snap25* es una proteína periférica de membrana que contribuye con dos hélices α al haz de cuatro hélices α. Están conectadas por un bucle (no representado en la figura) que se sitúa paralelo a la membrana y tiene cuatro cadenas de ácidos grasos unidas que la ancla a la membrana. En muchas otras t-SNARE, cada hélice α procede de una proteína diferente que está anclada a la membrana a través de su dominio transmembrana. Los complejos trans-SNARE siempre están formados por cuatro hélices α estrechamente enrolladas, tres aportadas por t-SNARE y una por v-SNARE. La t-SNARE está formada por varias cadenas, una de las cuales siempre es una proteína transmembrana y aporta una hélice α, y una o dos cadenas ligeras adicionales que pueden no ser transmembrana y que aportan las dos hélices α restantes al haz de cuatro hélices del complejo trans-SNARE. En la figura, se representa la estructura de un cristal de un complejo estable de las cuatro hélices α enrolladas de dichas proteínas en el contexto de la proteína completa. Las hélices α están representadas por cilindros para simplificar la figura. (Adaptado de R.B. Sutton et al., *Nature* 395:347-353, 1998. Con permiso de Macmillan Publishers Ltd.)

Estas proteínas transmembrana existen como parejas complementarias –con una **v-SNARE** habitualmente localizada en la membrana de las vesículas y una **t-SNARE** que se encuentra por lo general en las membranas diana (véase Figura 13–14). Una v-SNARE tiene una única cadena polipeptídica mientras que una t-SNARE está formada por dos o más proteínas (**Figura 13–16**). Las v-SNARE y t-SNARE tienen unos dominios helicoidales característicos; cuando una v-SNARE interacciona con una t-SNARE, los dominios helicoidales de ambas se enrollan uno sobre otro formando un haz estable de hélices. El *complejo trans-SNARE* resultante mantiene unidas las dos membranas en estrecha proximidad.

Donde han sido mejor caracterizadas las SNARE ha sido en las neuronas, donde, en el proceso de liberación de neurotransmisores, controlan el anclaje y la fusión de vesículas sinápticas en la membrana plasmática de las terminales nerviosas. La bacteria que produce el tétanos o el botulismo secreta potentes neurotoxinas que penetran en neuronas específicas y destruyen proteínas SNARE en las terminales nerviosas. De esta manera, las toxinas bloquean las transmisiones sinápticas provocando frecuentemente la muerte.

Se cree que los complejos *trans*-SNARE catalizan la fusión de las membranas utilizando la energía que se libera cuando las hélices que interaccionan se enrollan una sobre otra aproximando las dos membranas y expulsando de forma simultánea a las moléculas de agua de la interfase (**Figura 13–17**). Cuando se mezclan liposomas que contienen v-SNARE purificadas con liposomas que contienen t-SNARE complementarias, sus membranas se fusionan, aunque con lentitud. En la célula, otras proteínas reclutadas en el sitio de fusión, posiblemente efectores Rab, cooperan con las SNARE acelerando la fusión.

La fusión no siempre se produce justo después de que se apareen v-SNARE y t-SNARE. Como describiremos más adelante, en el proceso de exocitosis regulada la fusión se retrasa hasta que la secreción se activa mediante una señal extracelular específica. En este caso es una entrada de Ca^{2+} localizada la que desencadena la fusión, probablemente liberando proteínas inhibidoras que impiden que se lleve a cabo el enrollamiento completo de los complejos transSNARE.

Las proteínas Rab, que pueden regular la accesibilidad de proteínas SNARE, ejercen un nivel adicional de control. Las t-SNARE de las membranas diana se encuentran asociadas

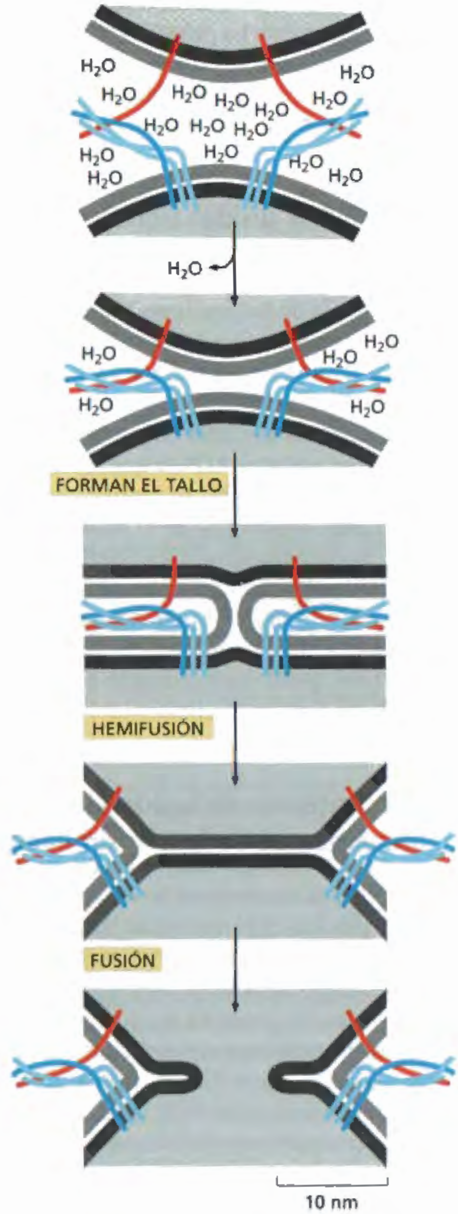


Figura 13–17 Modelo sobre cómo las proteínas SNARE pueden concentrarse en la fusión de membrana. La fusión de membranas tiene lugar en varias etapas. Un apareamiento íntimo entre proteínas v- y t-SNARE sitúa a las bicapas lipídicas en una gran proximidad y expulsa a las moléculas de agua de la interfase. Algunas moléculas lipídicas situadas en las dos monocapas fluyen entre las membranas formando un tallo de conexión. Los lípidos de las otras dos monocapas entran en contacto formando una nueva bicapa que amplía la zona de fusión (*hemifusión* o medio-fusión). La rotura de la nueva bicapa completa la reacción de fusión.

con proteínas inhibidoras que se han de liberar antes de que t-SNARE pueda actuar. Las proteínas Rab y sus efectores desencadenan la liberación de estas proteínas inhibidoras de t-SNARE. De esta manera, las proteínas t-SNARE se concentran y activan en las regiones adecuadas de la membrana, donde las proteínas de anclaje capturan a las vesículas entrantes. Las proteínas Rab aceleran el proceso por el cual se encuentran las proteínas SNARE apropiadas de dos membranas.

Para que el transporte vesicular se produzca con normalidad las vesículas de transporte deben incorporar las proteínas SNARE y Rab apropiadas. No es de sorprender, por tanto, que muchas vesículas de transporte sólo se formen si incorporan en su membrana los componentes necesarios SNARE y Rab. Cómo se produce este crucial proceso de control durante la formación de las vesículas continúa siendo un misterio.

Las SNARE unidas tienen que ser separadas antes de volver a ser usadas

La mayoría de las proteínas SNARE de las células han participado en muchas rondas de transporte vesicular y ocasionalmente se encuentran formando parte de complejos estables de membrana con SNARE complementarias. Los complejos se han de disociar antes de que las SNARE puedan participar en nuevas rondas de transporte. Una proteína esencial denominada **NSF** oscila entre las membranas y el citosol catalizando el proceso de desensamblaje. Se trata de una ATPasa que utiliza la energía de hidrólisis del ATP para deshacer las uniones estrechas que se forman entre los dominios helicoidales de las proteínas SNARE apareadas (**Figura 13–18**). El requisito de la reactivación de SNARE mediante NSF para la disociación de los complejos SNARE ayuda a evitar que las membranas se fusionen de forma indiscriminada: si la t-SNARE de una membrana diana permaneciera siempre activa, cualquier membrana que contuviera una v-SNARE complementaria podría fusionarse siempre que ambas membranas establecieran contacto. No se sabe cómo se controla la actividad de NSF para que la maquinaria SNARE se active en el lugar y momento apropiado, pero los efectores Rab son candidatos probables para desempeñar esa función.

Las proteínas de fusión virales y las SNARE pueden utilizar mecanismos de fusión similares

La fusión de membranas no sólo es importante en el transporte vesicular sino también en otros procesos. La membrana plasmática del espermatozoide y del oocito se fusionan durante la fecundación (descrito en el Capítulo 21) y los mioblastos se fusionan entre sí durante el desarrollo de la fibra muscular multinucleada (tratado en el Capítulo 22). De manera similar las mitocondrias se fusionan y se dividen (expuesto en el Capítulo 14). Todas las fusiones de membrana requieren proteínas especiales y están sujetas a controles estrictos asegurando que sólo se fusionan las membranas adecuadas. Los controles son cruciales para el mantenimiento tanto de la identidad de las células como de la individualidad de cada uno de los compartimientos intracelulares.

Las fusiones de membrana catalizadas por las proteínas de fusión virales son las mejor conocidas. Estas proteínas desempeñan un papel esencial al permitir la entrada del virus recubierto (que tiene una cubierta basada en una bicapa lipídica) al interior de las células que infectan (descrito en los Capítulos 5 y 24). Por ejemplo, los virus –tales como el virus de la inmunodeficiencia adquirida humana (HIV), que causa sida– se unen a receptores de la superficie celular y se fusionan con la membrana plasmática de la célula diana

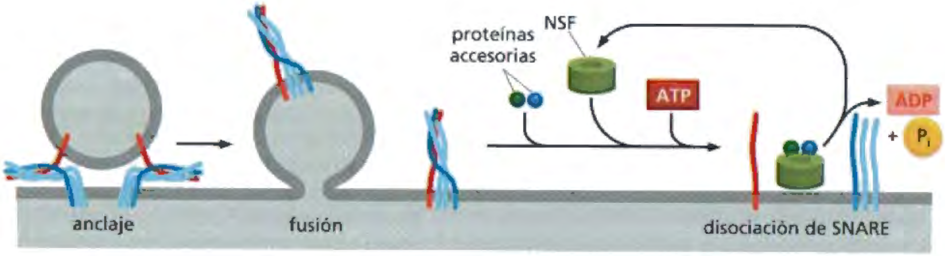


Figura 13–18 Disociación de parejas SNARE por la acción de NSF después de completar un ciclo de fusión de membrana. Después de que las v-SNARE y t-SNARE hayan participado en la fusión de una vesícula de transporte con la membrana diana, NSF se une al complejo SNARE, con la ayuda de dos proteínas accesorias, hidroliza ATP y separa las proteínas SNARE.

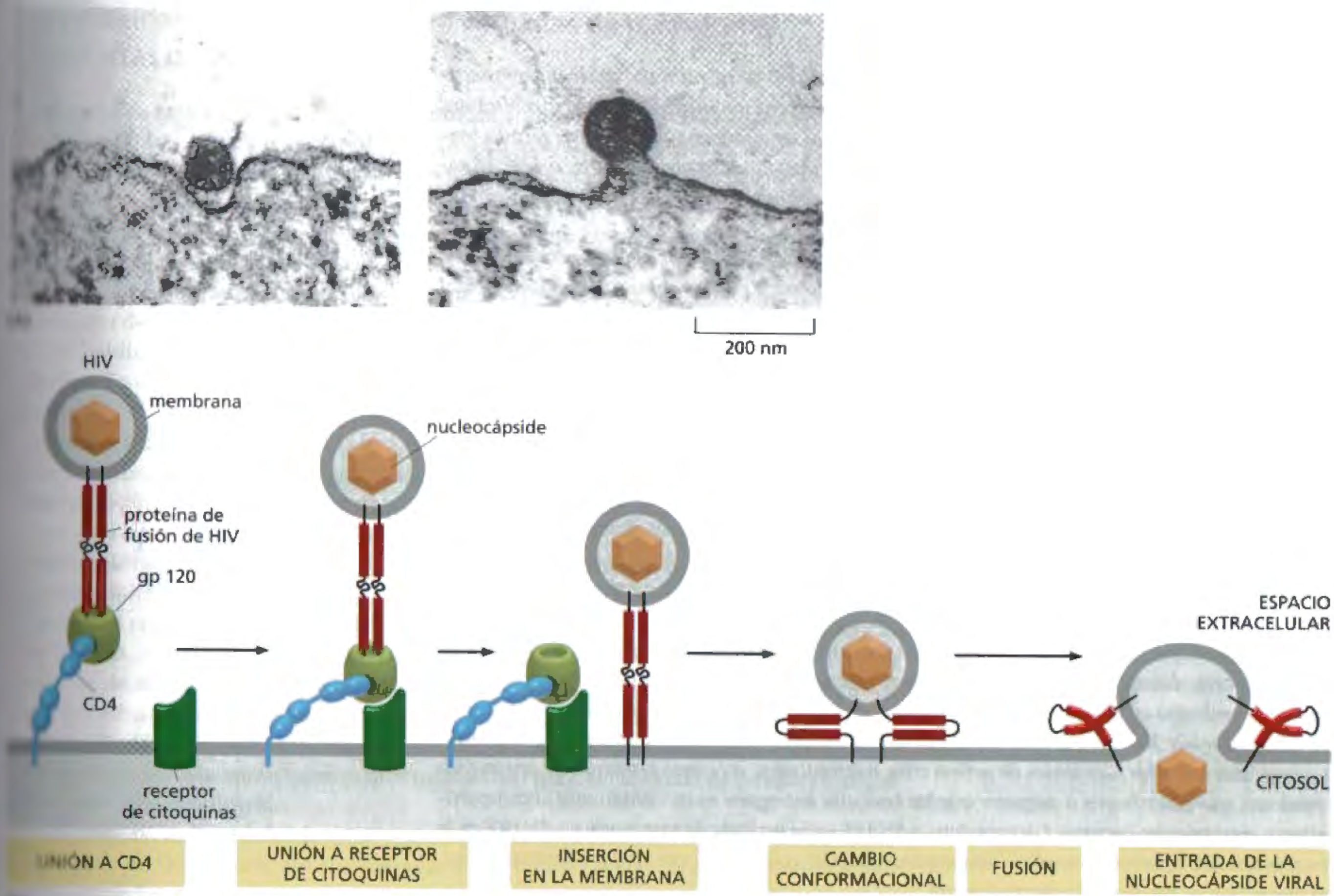


Figura 13–19 Entrada de virus recubiertos en las células. (A) Electromicrografías que muestran como HIV entra en la célula por fusión de su membrana con la membrana plasmática de la célula. (B) Modelo del proceso de fusión. En primer lugar HIV se une a la proteína CD4 en la superficie de la célula diana. Esta interacción está mediada por la proteína viral gp120 que está unida a la proteína de fusión de HIV. Una segunda proteína de la superficie celular, que normalmente actúa como receptor de quimioquinas (descrito en los Capítulos 24 y 25), interacciona con gp120. Esta interacción libera a la proteína de fusión de gp120 permitiendo que el antes oculto péptido de fusión hidrofóbico se inserte en la membrana plasmática de la célula diana. La proteína de fusión, que es un trímero (no mostrado), queda anclada, temporalmente, como proteína integral de dos membranas opuestas simultáneamente. La proteína de fusión se reorganiza de forma espontánea y se colapsa en un haz de seis hélices estrechamente empaquetadas. La energía liberada por esta reorganización en muchas copias de la proteína de fusión aproxima mucho las dos membranas y permite superar la elevada energía de activación que por lo general impide la fusión de membranas. Así, de una forma similar a la de una trampa para ratones, la proteína de fusión de HIV contiene una reserva de energía potencial que cuando se libera permite realizar un trabajo mecánico. (A, de B.S. Stein et al., *Cell* 49:659-668, 1987. Con permiso de Elsevier; B, adaptado de un dibujo de Wayne Hendrickson.)

Figura 13–19). Esta fusión permite al ácido nucleico viral del interior de la nucleocápside penetrar en el citosol, donde se replica. Otros virus, como el virus de la gripe, primero entran en la célula mediante endocitosis mediada por receptor (descrita más adelante) y acceden a los endosomas; el pH bajo de los endosomas activa una proteína de la envoltura viral que cataliza la fusión de las membranas virales y endosomales, liberando el ácido nucleico viral en el citosol.

La estructura tridimensional de las proteínas de fusión del virus de HIV y de la gripe aporta una valiosa información acerca del mecanismo molecular de fusión de membranas catalizado por estas proteínas. La exposición de la proteína de fusión de HIV a los receptores de la membrana de la célula diana, o la exposición de la proteína de fusión del virus de la gripe a un pH bajo, descubre regiones hidrofóbicas ocultas. Estas regiones, denominadas *péptidos de fusión*, se insertan de forma directa en la bicapa lipídica de la membrana de la célula diana. De esta manera, las proteínas de fusión virales son temporalmente proteínas transmembrana en dos bicapas lipídicas separadas. Reorganizaciones estructurales de las proteínas de fusión aproximan mucho las dos bicapas lipídicas, y las desestabilizan, de forma que las bicapas se fusionan (véase Figura 13–19). Así pues, las proteínas de fusión virales y las SNARE promueven la fusión de bicapas lipídicas de manera similar.

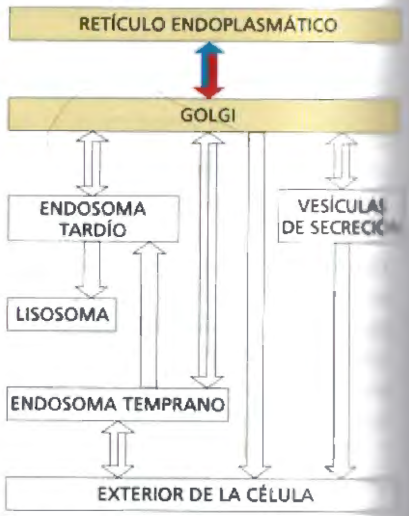
Resumen

El transporte dirigido y selectivo de componentes particulares de membrana, desde un compartimiento delimitado por membrana de una célula eucariota a otro, mantiene las diferencias entre estos compartimientos. Las vesículas de transporte, que pueden ser esféricas, tubulares o de formas irregulares se forman a partir de regiones recubiertas especializadas de la membrana de origen. El ensamblaje de la cubierta facilita el reclutamiento de la membrana y el transporte de solubles por las moléculas dirige la formación de la vesícula.

Hay diferentes tipos de vesículas recubiertas. Las mejor caracterizadas son las vesículas revestidas de clatrina, que median el transporte vesicular selectivo desde la membrana plasmática y la red del trans *Golgi, y las vesículas recubiertas de COPI y de COPII, que permiten el transporte entre las cisternas del Golgi y entre el ER y el complejo de Golgi, respectivamente. En las vesículas recubiertas de clatrina, las proteínas adaptadoras unen la clatrina a la membrana de la vesícula y también atrapan específicamente moléculas de carga, que serán empaquetadas en la vesícula. Después de la formación de la vesícula, la cubierta se desprende con rapidez y permite que la vesícula pueda fusionarse con la membrana diana apropiada.*

La síntesis local de fosfoinositoles genera lugares de unión que aceleran el ensamblaje de la cubierta y la formación de la vesícula. Además, las GTPasas monoméricas ayudan a regular algunas etapas en el transporte vesicular, incluyendo tanto la formación de la vesícula como su anclaje. Las GTPasas de reclutamiento de la cubierta, incluyenda a las proteínas Sar1 y Arf, regulan el ensamblaje de la cubierta y su desprendimiento. Una gran familia de proteínas Rab actúa como GTPasas de direccionamiento de vesículas. Las proteínas Rab son reclutadas en vesículas de transporte y en las membranas diana. El ensamblaje y desensamblaje de proteínas Rab y de sus efectores en dominios de membrana especializados está controlado de forma dinámica por la unión e hidrólisis de GTP. Las proteínas Rab activas reclutan efectores Rab, como las proteínas motoras, que transportan las vesículas sobre los filamentos de actina o los microtúbulos, así como proteínas de unión filamentosas, que contribuyen a asegurar que las vesículas entreguen su contenida sólo al compartimiento membranoso correcto. Las proteínas v-SNARE en la vesícula de transporte y t-SNARE en la membrana diana forman complejos estables trans*-SNARE, que aproximan las dos membranas hasta que sus capas lipídicas pueden fusionarse.*

TRANSPORTE DESDE EL ER A TRAVÉS DEL COMPLEJO DE GOLGI



Como se ha señalado en el Capítulo 12, las proteínas recién sintetizadas atraviesan la membrana del ER desde el citosol y entran en la ruta biosintética-secretora. Durante su transporte posterior, desde el ER al complejo de Golgi y desde éste a la superficie celular o a cualquier otro sitio, estas proteínas son sucesivamente modificadas mientras pasan a través de una serie de compartimientos. El transporte de un compartimiento al siguiente implica un equilibrio delicado entre las vías de transporte hacia delante y hacia atrás (recuperación). Algunas vesículas de transporte seleccionan las moléculas a transportar y las desplazan hacia el siguiente compartimiento de la vía, mientras que otras recuperan las moléculas escapadas y las devuelven al compartimiento donde actúan normalmente. Así pues, la vía desde el ER hasta la membrana celular incluye numerosas etapas de clasificación, que de manera continua seleccionan membrana y proteínas luminales solubles para su empaquetamiento y transporte en vesículas o fragmentos de orgánulos que emergen desde el ER y el complejo de Golgi.

En esta sección nos centraremos en el **complejo de Golgi** (también denominado **aparato de Golgi**). Es el lugar donde se realiza la mayoría de la síntesis de carbohidratos, así como el lugar de clasificación y envío de productos del ER. La célula produce muchos de sus polisacáridos en el complejo de Golgi, incluyendo la pectina y la hemicelulosa de las paredes celulares de las plantas, y la mayoría de los glucosaminoglucanos de la matriz extracelular animal (descrita en el Capítulo 19). El complejo de Golgi también constituye una zona de paso de los productos del ER, de manera que una gran parte de los glúcidos que fabrica el Golgi se unen como cadenas de oligosacáridos a las proteínas y lípidos que el ER le envía. Algunos de estos oligosacáridos actúan como señales que dirigen determinadas proteínas hacia vesículas que las enviarán a los lisosomas. Pero la mayoría de las proteínas y lípidos, una vez adquiridos los oligosacáridos apropiados en el complejo de Golgi, son reconocidos por otros mecanismos y dirigidos mediante vesículas de transporte a otros destinos.

Las proteínas abandonan el ER en vesículas de transporte recubiertas de COPII

Para iniciar su ruta a lo largo de la vía biosintética-secretora, las proteínas que han entrado en el ER y están destinadas al complejo de Golgi o más allá, son empaquetadas en primer lugar en pequeñas vesículas de transporte recubiertas de COPII. Estas vesículas se forman en regiones especializadas del ER denominadas *lugares de salida del ER*, cuya membrana carece de ribosomas unidos. La mayoría de las células animales tienen los lugares de salida del ER dispersos de forma aleatoria a través de la red del ER.

En un principio se pensó que todas las proteínas que no estaban retenidas en el ER entraban, por defecto, en las vesículas de transporte. Sin embargo, en la actualidad parece claro que habitualmente la entrada en las vesículas que abandonarán el ER es un proceso selectivo. En dichas vesículas se reclutan muchas proteínas de membrana, donde son concentradas.

Se cree que estas proteínas que serán cargadas presentan señales de salida (transporte) en su superficie citosólica, que son reconocidas por componentes de la cubierta de COPII (**Figura 13–20**); estos componentes de la cubierta actúan como receptores de carga y son reciclados de nuevo al ER después de liberar su carga en el complejo de Golgi. Las proteínas solubles que han de ser transportadas desde el lumen del ER tienen señales de salida que les permiten unirse a receptores de carga transmembrana que a su vez tienen señales de salida en sus colas citosólicas que les permiten unirse a la cubierta de COPII. Con una frecuencia muy inferior, incluso algunas proteínas que no tienen señales de salida pueden entrar en las vesículas, de manera que incluso las proteínas que por lo general tienen su función en el ER (las denominadas *proteínas residentes del ER*) pueden salir lentamente del ER y ser transportadas hasta el complejo de Golgi. De forma similar, las proteínas secretoras que se sintetizan en elevadas concentraciones pueden abandonar el ER sin la ayuda de señales de salida o receptores de clasificación.

La mayoría de las señales de salida que dirigen las proteínas solubles fuera del ER, hacia el complejo de Golgi y más allá son desconocidas. Algunas proteínas transmembrana que actúan como receptores de carga empaquetando algunas proteínas de secreción en las vesículas COPII son lectinas que se unen a oligosacáridos. Por ejemplo, la lectina ERGIC53 se une a manosa y se cree que reconoce la presencia de este azúcar en dos factores de coagulación sanguíneos secretados (factor V y factor VIII), contribuyendo a su empaquetamiento en vesículas de transporte en el ER.

Se consiguió descubrir el papel que desempeña ERGIC53 en el transporte de proteínas gracias a que algunas personas que carecen de ella, por presentar una mutación heredada, tenían niveles reducidos de los factores V y VIII y, como consecuencia, sufrían hemorragias frecuentes.

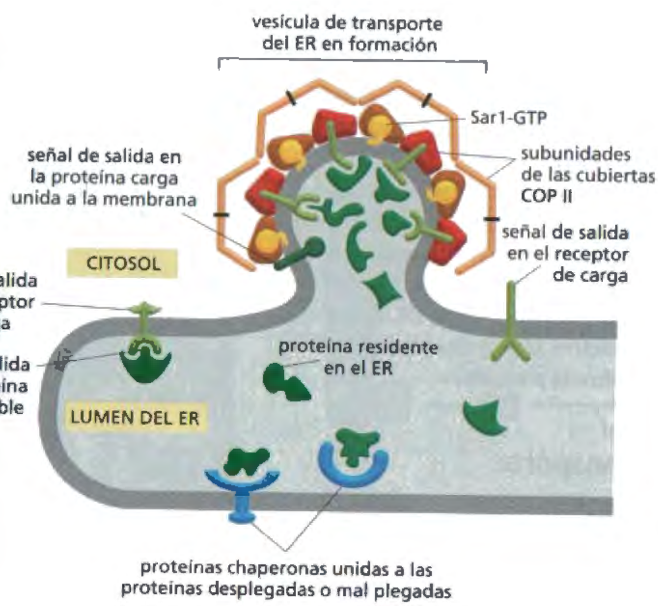


Figura 13–20 Reclutamiento de las moléculas de carga en las vesículas de transporte del ER. Mediante la unión directa o indirecta a la cubierta COPII, las proteínas de carga, tanto de membrana como solubles respectivamente, son concentradas en las vesículas de transporte a medida que abandonan el ER. Las proteínas de membrana son empaquetadas en vesículas de transporte en formación mediante interacciones de las señales de salida en sus regiones citosólicas con la cubierta COPII. Algunas de las proteínas de membrana atrapadas por la cubierta actúan como receptores de carga, uniendo a las proteínas solubles en el lumen y ayudando a empaquetarlas en vesículas. Una vesícula de transporte típica de 50 nm contiene alrededor de 200 proteínas de membrana que pueden ser de muchos tipos diferentes. Como se indica, las proteínas mal plegadas o mal ensambladas permanecen unidas a chaperonas que las retienen en el ER.

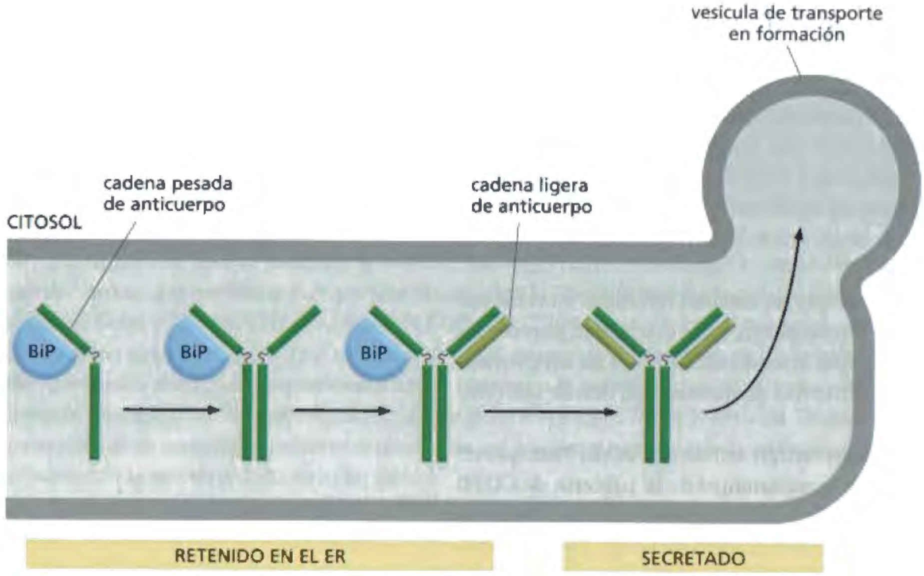


Figura 13–21 Retención en el ER de moléculas de anticuerpo ensambladas de forma incompleta. Los anticuerpos están compuestos por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras (descrito en el Capítulo 25), que se ensamblan en el ER. Se cree que la chaperona BiP se une a todas las moléculas de anticuerpo ensambladas de forma incompleta y bloquea su señal de salida. Así pues, sólo los anticuerpos que están perfectamente ensamblados salen del ER y son secretados.

Sólo pueden abandonar el ER las proteínas que están correctamente plegadas y ensambladas

Para salir del ER, las proteínas han de estar correctamente plegadas y, si son subunidades de complejos proteicos multiméricos, puede ser necesario que estén bien ensambladas. Aquellas que están mal plegadas o ensambladas se quedan en el ER, donde permanecen unidas a proteínas chaperonas (descrito en el Capítulo 6), tales como *BiP* o *calnexina*. Estas chaperonas bloquean las señales de salida o, de alguna manera, retienen las proteínas en el ER (**Figura 13–21**). Posteriormente, estas proteínas fallidas son transportadas de nuevo al citosol donde son degradadas por los proteosomas (descritos en los Capítulos 6 y 12). Esta etapa de control de calidad impide el transporte hacia adelante de proteínas mal plegadas o mal ensambladas que podrían llegar a interferir con el funcionamiento de las proteínas normales si fueran transportadas. Se producen una sorprendentemente gran cantidad de acciones correctivas. Por ejemplo, más del 90% de las subunidades de nueva síntesis del receptor de la célula T (tratado en el Capítulo 25) y del receptor de acetilcolina (descrito en el Capítulo 11) son degradados normalmente sin que nunca alcancen la superficie celular donde actúan. Así pues, las células han de sintetizar un gran exceso de muchas moléculas proteicas para producir unas cuantas seleccionadas que se pliegan, se ensamblan y funcionan de forma correcta.

El proceso de degradación continuo de una parte de las proteínas del ER también forma parte de un sistema de alerta del sistema inmune en respuesta a una infección viral. Mediante transportadores ABC especializados, el ER importa fragmentos peptídicos de proteínas virales producidos por la acción de las proteasas en el proteosoma. Los péptidos extraños son unidos a proteínas MHC de clase I en el lumen del ER y transportados a la superficie celular. Los linfocitos T reconocen los péptidos como antígenos no-propios y destruyen las células infectadas (descrito en el Capítulo 25).

Sin embargo, en algunas ocasiones, este selectivo mecanismo de control de calidad es pernicioso. Las mutaciones más frecuentes que causan la fibrosis quística, una enfermedad hereditaria común, producen una forma ligeramente mal plegada de una proteína de membrana que es importante para el transporte del Cl^-. Aunque la proteína mutante podría funcionar perfectamente, si alcanzara la membrana plasmática, permanece en el ER. Esta grave enfermedad es consecuencia no de una mutación que inactive la proteína sino de que la proteína activa es descartada antes de que alcance la membrana plasmática.

Agregados túbulo-vesiculares realizan el transporte desde el ER hasta el complejo de Golgi

Después de que las vesículas de transporte se hayan formado en los lugares de salida del ER, y se hayan desprendido de la cubierta, empiezan a fusionarse entre sí. Esta fusión de mem-

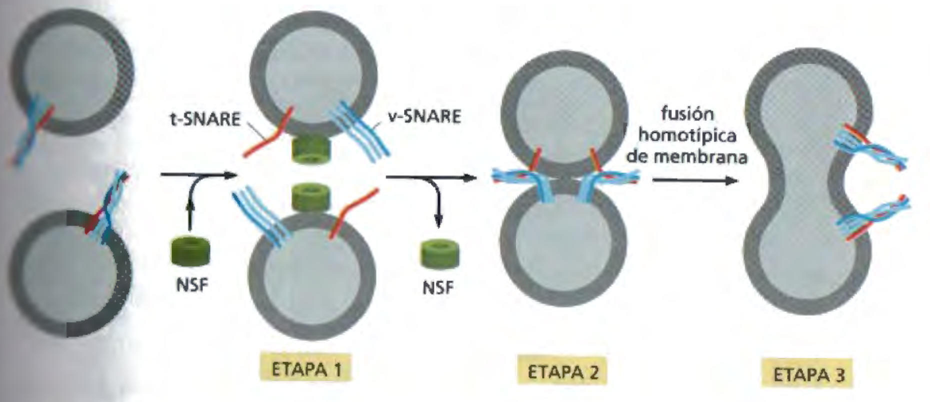


Figura 13–22 Fusión homotípica de membrana. <AAAA> En la etapa I, pares idénticos de proteínas v-SNARE y t-SNARE de ambas membranas se mantienen separados por NSF (véase Figura 13–18). En las etapas 2 y 3, interaccionan los SNARE complementarios separados, situados sobre membranas idénticas adyacentes, y provocan la fusión de las membranas y la formación de un compartimiento continuo, denominado agregado túbulo-vesicular. A continuación, el compartimiento crece por fusión homotípica con vesículas del mismo tipo de membrana que contienen proteínas SNARE complementarias. La fusión homotípica no está limitada a la formación de agrupaciones túbulo-vesiculares; un proceso similar de fusión de endosomas genera endosomas mayores. Las proteínas Rab ayudan a regular la extensión de la fusión homotípica y, por tanto, el tamaño de los compartimientos en una célula (no mostrado).

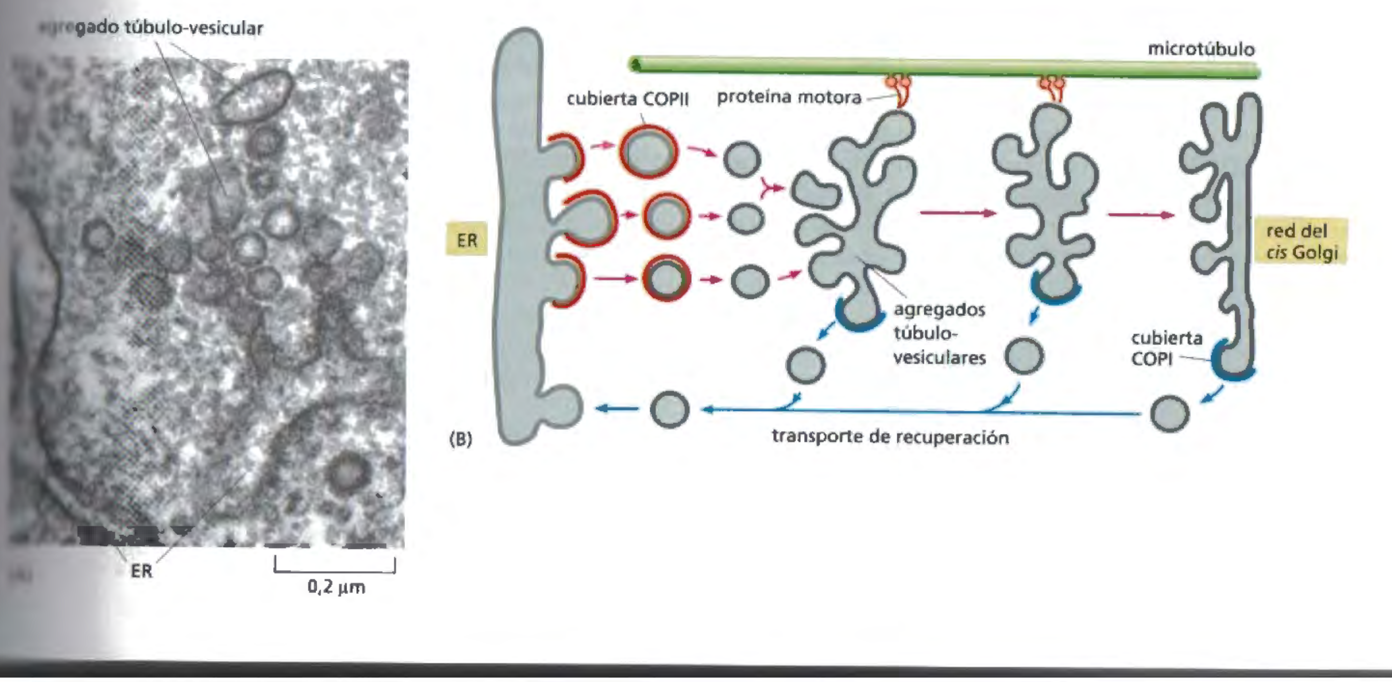
branas del mismo compartimiento se denomina *fusión homotípica*, para diferenciarla de la *fusión heterotípica*, en la que la membrana de un compartimiento se fusiona con la membrana de otro compartimiento distinto. Como en la fusión heterotípica, la fusión homotípica requiere un conjunto complementario de SNARE. Sin embargo, en este caso, la interacción es simétrica con ambas membranas aportando tanto proteínas t-SNARE como proteínas v-SNARE (**Figura 13–22**).

Las estructuras formadas cuando las vesículas derivadas del ER se fusionan unas con otras se denominan *agregados túbulo-vesiculares*, por su aspecto replegado al ser observado al microscopio electrónico (**Figura 13–23**A). Estas agrupaciones forman un nuevo compartimiento que está separado del ER y que carece de muchas de las proteínas que actúan en el ER. Este compartimiento se forma constantemente y actúa como un contenedor que lleva material desde el ER hasta el complejo de Golgi. Las agrupaciones tienen una vida media relativamente corta, ya que se desplazan con rapidez a lo largo de microtúbulos hacia el complejo de Golgi, con el que se fusionan liberando su contenido (Figura 13–23B).

En cuanto se forman las agrupaciones túbulo-vesiculares, de ellas empiezan a formarse pequeñas vesículas. A diferencia de las vesículas recubiertas de COPII que se forman en el ER, estas vesículas están recubiertas de COPI. Devuelven al ER tanto las proteínas residentes que han escapado como las proteínas que, como los receptores de carga, participan en las reacciones de vesiculación en el ER. Este proceso de recuperación es una muestra de los exquisitos mecanismos de control que regulan las reacciones de ensamblaje de las cubiertas. El ensamblaje de la cubierta de tipo COPI comienza sólo segundos después de que las cubiertas COPII se hayan desprendido. Todavía constituye un misterio cómo se controla este cambio de sentido del ensamblaje de las cubiertas.

El *transporte de recuperación* (o *retrógrado*) continúa mientras se desplazan las agrupaciones túbulo-vesiculares hacia el complejo de Golgi. Así pues, las agrupaciones maduran de

Figura 13–23 Agregados túbulo-vesiculares. (A) Electromicrografía de una sección de agregados túbulo-vesiculares formados a partir de la membrana del ER. Muchas de las estructuras similares a vesículas que se aprecian en las micrografías son secciones transversales de tubos que se extienden por encima y por debajo del plano de la sección y que están interconectados. (B) Los agregados túbulo-vesiculares se desplazan a lo largo de los microtúbulos transportando proteínas desde el ER al complejo de Golgi. Cubiertas COPI participan en la formación de vesículas que vuelven al ER desde dichos agregados. Como se indica, las cubiertas se desprenden poco después de que las vesículas se hayan formado. (A, cortesía de William Balch.)



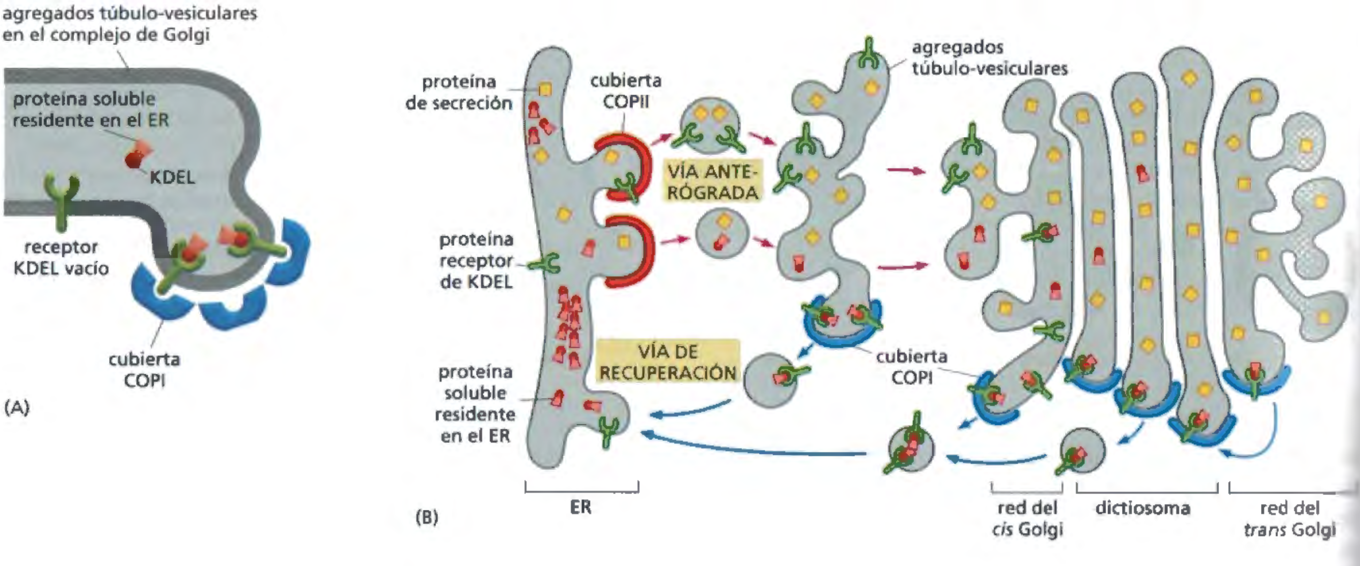


Figura 13–24 Modelo sobre la recuperación de las proteínas residentes en el ER. Aquellas proteínas residentes en el ER que escapan son devueltas al ER mediante un proceso de transporte vesicular. (A) El receptor KDEL presente en las agrupaciones túbulo-vesiculares y en el complejo de Golgi captura las proteínas residentes en el ER solubles y las transporta en vesículas recubiertas de COPI de vuelta al ER. Después de unir sus ligandos en este compartimiento de pH bajo, el receptor KDEL puede cambiar su conformación facilitando su reclutamiento en las vesículas recubiertas de COPI que están en formación. (B) La recuperación de las proteínas del ER se inicia en agregados túbulo-vesiculares y continúa en cada una de las regiones del complejo de Golgi. En el ER, con un pH neutro, las proteínas del ER se separan del receptor, que es devuelto al Golgi para su reutilización.

forma continua, cambiando gradualmente su composición a medida que determinadas proteínas seleccionadas son devueltas al ER. Un proceso de recuperación similar a éste se produce en el complejo de Golgi, después de que las agrupaciones túbulo-vesiculares hayan entregado su carga.

La vía de recuperación del ER utiliza señales de clasificación

La vía de recuperación para devolver las proteínas de nuevo al ER depende de *señales de recuperación al ER*. Por ejemplo, las proteínas de membrana residentes en el ER contienen señales que las unen directamente a las cubiertas de COPI, empaquetándose por tanto en vesículas de transporte COPI para la entrega retrógrada al ER. La señal de recuperación mejor caracterizada está formada por dos lisinas, seguidas por otros dos aminoácidos cualquiera, en el extremo C-terminal de la proteína de membrana del ER. Se denomina la *secuencia KKXX*, según el código de una letra para los aminoácidos.

Las proteínas solubles residentes en el ER, tales como BiP, también presentan una secuencia de recuperación corta en su extremo C-terminal, pero es diferente: está formada por una secuencia Lys-Asp-Glu-Leu o similar. Si esta señal (denominada *secuencia KDEL*) es eliminada de BiP mediante ingeniería genética, la proteína es secretada lentamente por la célula. Si la señal es transferida a una proteína que por lo general se secreta, la proteína es devuelta con eficiencia al ER, donde se acumula.

A diferencia de las señales de recuperación al ER de las proteínas de membrana que pueden interaccionar de forma directa con la cubierta COPI, las proteínas solubles residentes del ER han de unirse a unas proteínas receptoras especializadas como el *receptor KDEL*: una proteína de paso múltiple que se une a la secuencia KDEL y que empaqueta cualquier proteína que la presente en las vesículas de transporte retrógrado recubiertas de COPI (**Figura 13–24**). Para poder cumplir con esta función específica, el propio receptor KDEL debe ciclar entre el ER y el complejo de Golgi, y su afinidad por la secuencia KDEL debe ser diferente en cada uno de estos dos compartimientos. El receptor debe tener una mayor afinidad por la secuencia KDEL en las agrupaciones túbulo-vesiculares y en el complejo de Golgi para poder capturar con la eficacia necesaria las proteínas solubles residentes en el ER que se han escapado y que se encuentran dispersas a baja concentración. Sin embargo, debe tener una baja afinidad por KDEL en el ER para poder separarse de la secuencia KDEL a pesar de que en el ER hay una elevada concentración de proteínas residentes que contienen la secuencia KDEL.

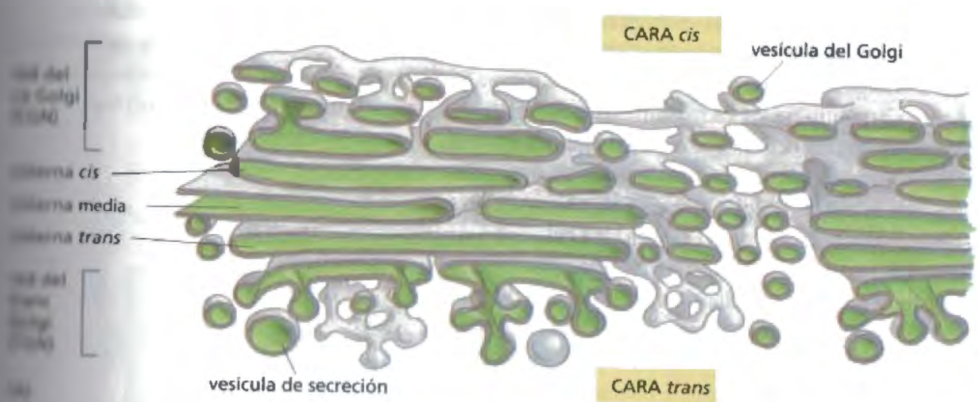
¿Cómo cambia la afinidad del receptor KDEL según el compartimiento en el que se encuentre? La respuesta es desconocida, pero podría estar relacionada con las diferentes condiciones iónicas y de pH característico de cada compartimiento que está regulado por tranportadores de iones en el compartimiento de la membrana. Tal como se describirá más adelante, estas interacciones proteína-proteína sensibles al pH son la base de muchas de las etapas de clasificación en la célula.

La mayoría de las proteínas de membrana que actúan en la interfase entre el ER y el complejo de Golgi, incluyendo las proteínas v- y t-SNARE y algunos de los receptores de transporte, entran en la vía de recuperación de vuelta al ER. Mientras que el reciclaje de algunas de estas proteínas depende de la presencia de señales, para algunas otras no parece requerirse señal. Mientras las señales de recuperación aumentan la eficacia del proceso de recuperación, algunas proteínas –incluyendo algunas enzimas del Golgi– entran al azar en vesículas que se dirigen al ER y son devueltas al ER pero con menor frecuencia. Muchas enzimas del Golgi están viajando constantemente entre el ER y el Golgi, pero su velocidad de retorno al ER es lo bastante lenta como para que la mayoría de la proteína se encuentre en el complejo de Golgi.

Muchas proteínas son retenidas selectivamente en el compartimiento en el que actúan

La vía de recuperación KDEL sólo explica en parte cómo las proteínas residentes del ER permanecen en el ER. Como era de esperar, las células que expresan proteínas residentes del ER modificadas genéticamente, de las que se ha eliminado la señal KDEL, secretan estas proteínas. Pero la tasa de secreción es mucho menor que la de una proteína de secreción normal. Parece que existe un mecanismo independiente de la señal KDEL que ancla las proteínas residentes en el ER y que sólo aquellas proteínas que escapan de la retención son capturadas y devueltas vía el receptor KDEL. Uno de los mecanismos sugeridos para explicar la retención de las proteínas residentes del ER consiste en que estas proteínas se unan unas y otras, formando complejos demasiado grandes para entrar de forma eficiente en las vesículas de transporte. Dado que las proteínas residentes del ER se encuentran en el ER a concentraciones elevadas (se estima que en el rango milimolar), interacciones de una afinidad relativamente baja podrían ser suficientes para mantener unidas a la mayoría de las proteínas en dichos complejos.

La agregación de proteínas que tienen su función en el mismo compartimiento– denominada *reconocimiento kin*– es un mecanismo general que utilizan los compartimientos para



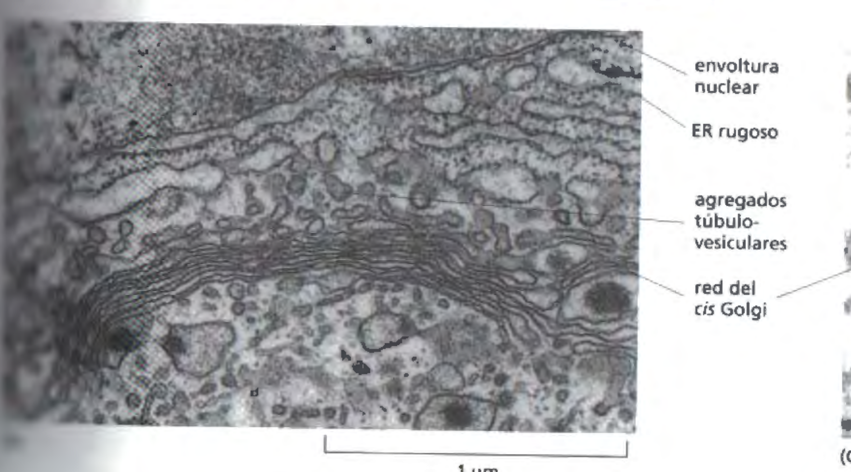




Figura 13–25 El complejo de Golgi. (A) Reconstrucción tridimensional del complejo de Golgi a partir de electromicrografías de una célula secretora animal. La cara *cis* del dictiosoma es la más próxima al ER. (B) Electromicrografía de una sección ultrafina en la que destaca la región de transición entre el ER y el complejo de Golgi en una célula animal. (C) Electromicrografía de un complejo de Golgi de una célula vegetal (del alga verde *Chlamydomonas*), visto en sección transversal. Por lo general, en las células vegetales el complejo de Golgi es más aparente y está más separado de los otros sistemas membranosos intracelulares. (A, redibujado de A. Rambourg e Y. Clermont, *Eur. J. Cell Biol.* 51:189-200, 1990; Con permiso de Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; B, cortesía de Brij J. Gupta; C, cortesía de George Palade.)

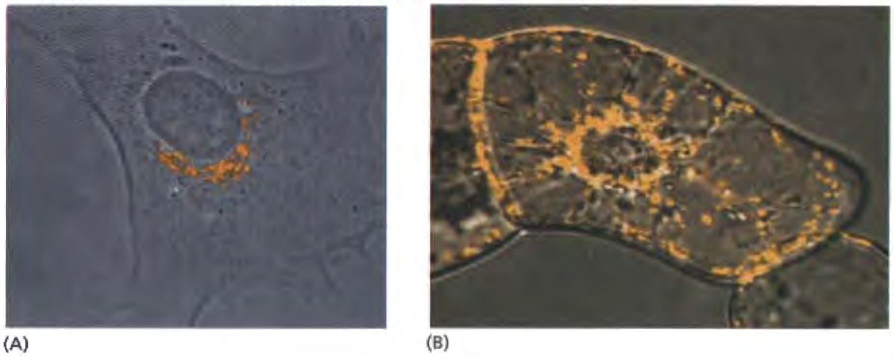


Figura 13–26 Localización del complejo de Golgi en células de animales y plantas. (A) El complejo de Golgi de un fibroblasto en cultivo teñido con un anticuerpo fluorescente que reconoce una proteína residente en el Golgi (*rojo*). El complejo de Golgi aparece polarizado y se sitúa en el sentido en el que se desplazaba la célula antes de su fijación. (B) El complejo de Golgi de una célula vegetal que lleva a cabo la expresión de una proteína de fusión que consiste en una proteína residente en el Golgi unida a la proteína fluorescente verde. Los puntos *naranja* brillantes (falso color) son dictiosomas del Golgi. (A, cortesía de John Henley y Mark McNiven; B, cortesía de Chris Hawes.)

organizar y mantener a sus proteínas residentes. Por ejemplo, las enzimas del Golgi que actúan juntas también se unen unas a otras limitando su entrada en las vesículas de transporte que dejan el complejo de Golgi.

El complejo de Golgi está formado por una serie de compartimientos ordenados

Debido a su estructura grande y regular, el complejo de Golgi fue uno de los orgánulos descritos por los primeros microscopistas. Está formado por una serie de compartimientos delimitados por membrana denominados *cisternas*, de forma aplanada, y que de alguna manera se parecen a un montón de tortitas. Cada apilamiento del Golgi, un dictiosoma, está formado por entre cuatro y seis cisternas (**Figura 13–25**), aunque en algunos protozoos flagelados puede haber hasta sesenta. En las células animales muchos dictiosomas están unidos entre sí mediante conexiones tubulares entre las cisternas correspondientes, formando un solo complejo que habitualmente se localiza en las proximidades del núcleo, cerca del centrosoma (**Figura 13–26A**). Esta localización depende de los microtúbulos. Si los microtúbulos se despolimerizan experimentalmente, el complejo de Golgi se reorganiza en dictiosomas individuales que se distribuyen por todo el citoplasma en la proximidad de los lugares de salida del ER. Algunas células, incluyendo muchos tipos celulares de plantas, tienen habitualmente cientos de dictiosomas del Golgi dispersos en el citoplasma (Figura 13–26B).

Durante su paso a través del complejo de Golgi, las moléculas transportadas sufren una serie ordenada de modificaciones covalentes. Cada uno de los dictiosomas del Golgi tienen dos caras distintas: una **cara *cis*** (o cara de entrada) y una **cara *trans*** (o cara de salida). Ambas caras *cis* y *trans* están estrechamente asociadas a unos compartimientos especiales, formados por una red de estructuras tubulares y cisternas: la **red *cis* Golgi (CGN**: *cis Golgy network*) y la **red *trans* Golgi (TGN**: trans *Golgy network*), respectivamente. El CGN es una colección de agrupaciones túbulo-vesiculares fusionadas que proceden del ER. Las proteínas y los lípidos entran por la red *cis* Golgi y salen por la red *trans* Golgi en vesículas de transporte con destino a la superficie celular o a otro compartimiento. Ambas redes son importantes en la clasificación de las proteínas: las proteínas que entran en el CGN pueden o bien seguir a través del Golgi o bien volver al ER. De manera similar, las proteínas que salen del TGN se mueven hacia delante y son clasificadas hacia su siguiente destino: lisosomas, vesículas de secreción o la superficie celular. También pueden ser devueltas a un compartimiento anterior.

Como se ha descrito en el Capítulo 12, en el ER se añade un mismo tipo de *N-oligosacárido en bloque* a muchas proteínas diferentes, que es modificado mientras la proteína aún permanece en el ER. Los intermediarios de oligosacáridos generados en las reacciones de síntesis contribuyen al plegado de las proteínas y a la salida hacia el citosol de las proteínas mal plegadas donde serán degradadas. Así pues, tiene un papel esencial en el control de calidad de las proteínas que salen del ER. Una vez cumplida dicha función, la célula queda libre para modificar y rediseñar los oligosacáridos para nuevas funciones. Esto ocurre en el complejo de Golgi donde se producen las estructuras heterogéneas que se encuentran en las proteínas maduras. Cuando llegan al CGN, las proteínas pasan a través de la red del *cis* Golgi antes de entrar en el primer compartimiento de procesamiento del Golgi (la cisterna *cis*). Después se desplazan al siguiente compartimiento (la cisterna media) y finalmente a la cisterna *trans*, donde se completa la glucosilación. El lumen de la cisterna *trans* se cree que forma un continuo con el TGN, el lugar donde las proteínas son clasificadas en diferentes paquetes de transporte y dirigidas hacia su destino final.

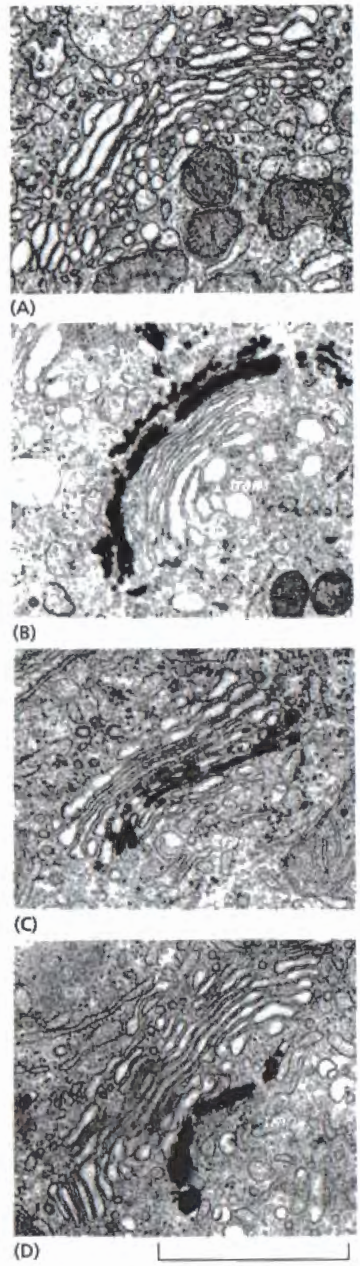


Figura 13-27 La compartimentación molecular del complejo de Golgi. La serie de electromicrografías muestra el complejo de Golgi (A) sin contrastar; (B) contrastado con osmio, que es reducido sobre todo por las cisternas del compartimiento *cis*, y (C y D) contrastado revelando la localización de enzimas específicas. La nucleósido difosfatasa se halla en las cisternas del *trans* Golgi (C), mientras que la enzima fosfatasa ácida se encuentra en la red del *trans* Golgi (D). Es de destacar que habitualmente se tiñe más de una cisterna. Por tanto, parece que las enzimas se encuentran especialmente enriquecidas más que localizadas de forma precisa en una cisterna determinada. (Por cortesía de Daniel S. Friend.)

Estas rutas de procesamiento de oligosacáridos tienen lugar siguiendo una secuencia ordenada en el dictiosoma, en el que cada cisterna contiene una gran cantidad de enzimas de procesamiento. Las proteínas se modifican a través de sucesivas etapas a medida que van de cisterna en cisterna a través del dictiosoma, de forma que las cisternas constituyen una unidad de procesamiento múltiple. Esta compartimentación podría parecer innecesaria, ya que cada enzima sólo actúa sobre su glucoproteína después de que haya sido convenientemente procesada por la enzima anterior. Sin embargo, parece claro que el procesamiento tiene lugar tanto en una secuencia espacial como en una secuencia bioquímica: así, las enzimas que catalizan las primeras etapas se localizan en las cisternas más *cis* del dictiosoma, mientras que las que catalizan las últimas etapas se encuentran en las cisternas más *trans*.

Los investigadores han descubierto las diferencias funcionales entre las subdivisiones *cis*, media y *trans* del complejo de Golgi mediante la localización, tanto por fraccionamiento físico del orgánulo como por microscopía electrónica marcando con anticuerpos las enzimas implicadas en el procesamiento de los *N*-oligosacáridos en distintas regiones del orgánulo. Por ejemplo, se encontró que la separación de los residuos de manosa y la adición de *N*-acetilglucosamina tenía lugar en el compartimiento medio, mientras que la adición de galactosa y de ácido siálico ocurría en el compartimiento *trans* y en la red del *trans* Golgi (**Figura 13-27**). La **Figura 13-28** resume la compartimentación funcional del complejo de Golgi.

El complejo de Golgi es en especial abundante en las células que están especializadas en la secreción de glucoproteínas, como las células mucosecretoras del epitelio intestinal, que secretan grandes cantidades de moco al intestino (**Figura 13-29**). En estas células se forman en el extremo *trans* del complejo de Golgi vesículas inusualmente grandes que se dirigen hacia el dominio de la membrana plasmática donde se produce la secreción.

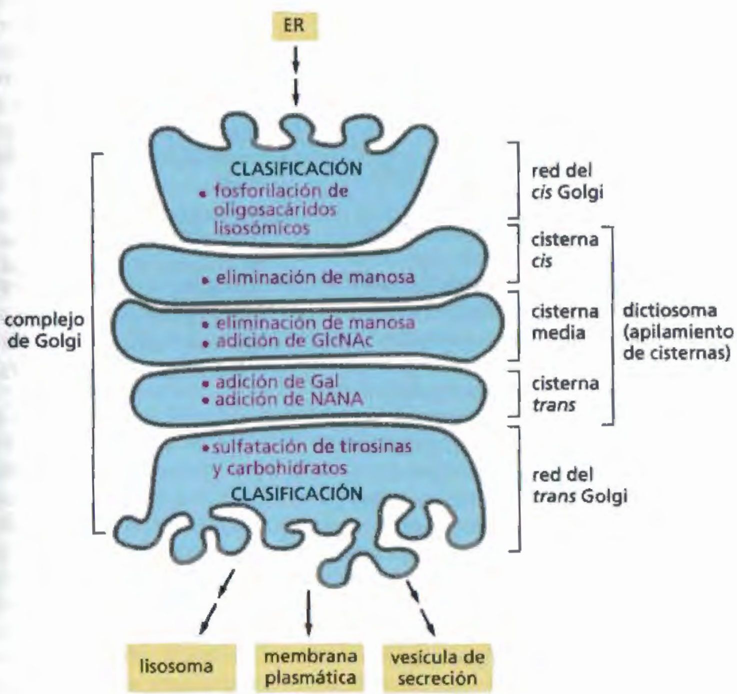


Figura 13-28 El procesamiento de oligosacáridos en el complejo de Golgi. La localización de cada una de las etapas de procesamiento que se muestran en la figura ha sido determinada por medio de la combinación de técnicas, entre las que se encuentran el subfraccionamiento de las membranas del complejo de Golgi y la microscopía electrónica tras la tinción con anticuerpos específicos contra algunas de las enzimas específicas de procesamiento. Las enzimas de procesamiento no están restringidas a una única cisterna sino que su distribución es gradual a través del dictiosoma, de forma que las enzimas que actúan al principio se encuentran presentes fundamentalmente en las cisternas del *cis* Golgi y las enzimas que actúan al final se localizan sobre todo en las cisternas del *trans* Golgi.

Las cadenas de oligosacáridos son procesadas en el complejo de Golgi

Mientras que el ER está lleno de proteínas solubles residentes y enzimas, las proteínas residentes en el complejo de Golgi son todas transmembrana. Parece ser que las reacciones enzimáticas que se realizan en el complejo de Golgi tienen lugar siempre sobre su membrana. Todas las glucosidasas y glucosiltransferasas son proteínas transmembrana de paso único, muchas de las cuales están organizadas en forma de complejos multienzimáticos. Así pues, los dos orgánulos biosintéticos en la ruta biosintética-secretora, el ER y el complejo de Golgi, están organizados de manera claramente diferente.

Sobre las glucoproteínas de los mamíferos se encuentran unidos dos grandes tipos de *N*-oligosacáridos, los **oligosacáridos complejos** y los **oligosacáridos ricos en manosa** (**Figura 13–30**). En ocasiones es posible encontrar ambos tipos de oligosacáridos unidos a la misma cadena polipeptídica (en diferentes lugares).

Los oligosacáridos complejos se forman cuando los *N*-oligosacáridos originales añadidos en el ER son modificados y se les añaden nuevos azúcares. Por el contrario, los oligosacáridos ricos en manosa son procesados pero no se les añaden nuevos azúcares en el complejo de Golgi. Contienen sólo dos *N*-acetilglucosaminas y muchos residuos de manosa, frecuentemente los mismos que se encuentran en el oligosacárido unido a lípido que se encuentra como precursor en el ER. Los oligosacáridos complejos pueden contener más de las dos *N*-acetilglucosaminas originales, así como un número variable de galactosa y ácido siálico y, en algunos casos, fucosa.

El ácido siálico es de especial importancia pues es el único azúcar en las glucoproteínas que presenta una carga negativa. Si un oligosacárido debe quedarse en la forma de rico en

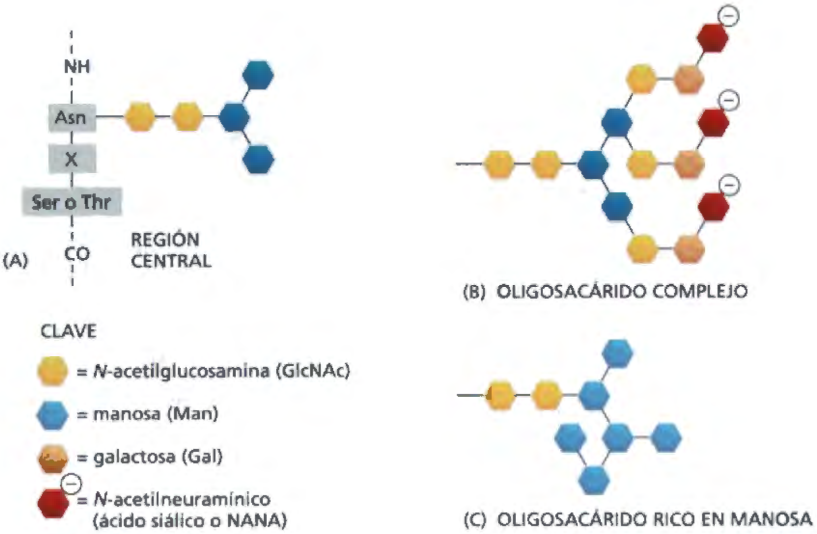


Figura 13–30 Las dos clases principales de oligosacáridos unidos a asparagina (*N*-oligosacáridos) encontrados en glucoproteínas maduras de mamífero. (A) Tanto los oligosacáridos complejos como los ricos en manosa comparten una *región central* que procede del oligosacárido unido a asparagina original que fue añadido en el ER (véase Figura 12–50) y que contiene dos *N*-acetilglucosaminas (GlcNAc) y tres manosas (Man). (B) Cualquier oligosacárido complejo consta de una *región central*, junto con una *región terminal* que contiene un número variable de una unidad especial de trisacáridos (*N-acetilglucosamina-galactosa-ácido siálico*) unidas al núcleo de manosas. Con frecuencia la región terminal está truncada y sólo contiene GlcNAc y galactosa (Gal) o sólo GlcNAc. Además, se puede añadir un residuo de fucosa al núcleo de GlcNAc unido a la asparagina (Asn). Así pues, aunque las etapas de procesamiento y posterior adición de azúcares están ordenadas estrictamente, los oligosacáridos complejos pueden ser heterogéneos. Además, aunque el oligosacárido complejo mostrado tiene tres ramas, también son comunes formas de dos y de cuatro ramas, dependiendo de la glucoproteína y de la célula en que se producen. (C) Los oligosacáridos ricos en manosa no son recortados hasta alcanzar la región central y contienen residuos adicionales de manosa. También se encuentran oligosacáridos híbridos (no mostrados) en los que una rama es Man y otra GlcNAc y Gal.

Los tres aminoácidos que se presentan en esta figura en color constituyen la secuencia reconocida por la enzima oligosacaril transferasa que añade el oligosacárido inicial a la proteína. Ser = serina; Thr = treonina; X = cualquier aminoácido excepto prolina.

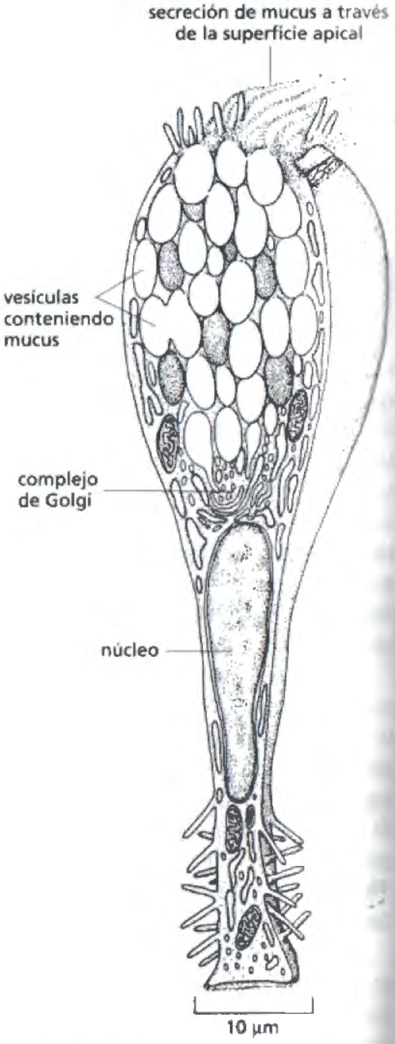


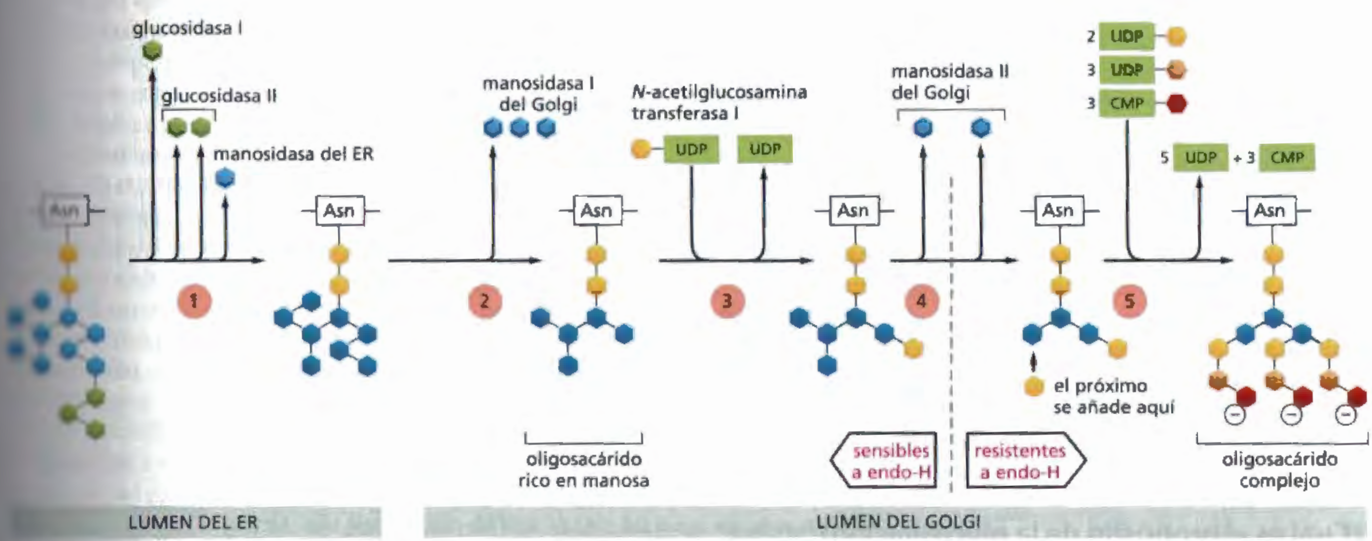
Figura 13–29 Célula caliciforme del intestino delgado. Este tipo de célula está especializada en la secreción de mucus, una mezcla de varias glucoproteínas y de proteoglucanos sintetizados en el ER y en el complejo de Golgi. Como todas las células epiteliales, las células caliciformes están altamente polarizadas, con el dominio apical de su membrana plasmática dirigido hacia el lumen del intestino y el dominio basolateral dirigido hacia la lámina basal. El complejo de Golgi también está muy polarizado, lo cual facilita la descarga del mucus mediante exocitosis en el dominio apical de la membrana plasmática. (De R.V. Krstic, Illustrated Encyclopedia of Human Histology. New York: Springer-Verlag, 1984. Con permiso de Springer-Verlag.)

manosa o tiene que ser procesado hacia un oligosacárido complejo depende fundamentalmente de su posición en la proteína. Si el oligosacárido es accesible a las enzimas de procesamiento en el complejo de Golgi, es probable que sea convertido en una forma compleja; si es inaccesible a estas enzimas, porque sus azúcares están estrechamente unidos a la superficie de la proteína, es probable que permanezca en su forma rica en manosa. El procesamiento que genera cadenas de oligosacáridos complejos sigue la secuencia ordenada de reacciones que se muestran en la **Figura 13–31**.

Más allá de estas reglas comunes en el procesamiento de los oligosacáridos que son compartidas por todas las células, los productos de las modificaciones de los carbohidratos que se realizan en el complejo de Golgi son muy complejos y han provocado la aparición de una nueva especialidad denominada glucobiología. Por ejemplo, el genoma humano codifica cientos de glucosil transferasas diferentes del complejo de Golgi, que se expresan de manera distinta en uno u otro tipo celular, lo que da lugar a una gran variedad de formas glucosiladas de una proteína o lípido concreto dependiendo del tipo celular y de su estado de diferenciación, y que estará en función de la colección de enzimas expresadas por la célula. La complejidad de las modificaciones no está limitada a los *N*-oligosacáridos sino que también se produce en los *O-oligosacáridos*, como veremos más adelante.

Los proteoglucanos se ensamblan en el complejo de Golgi

No sólo son las cadenas de *N*-oligosacárido de las proteínas las que son alteradas a medida que las proteínas pasan a través de las cisternas del Golgi, *en su camino* desde el ER a sus destinos finales; muchas proteínas también son modificadas de otras formas. Algunas tienen



CLAVE: = N-acetilglucosamina (GlcNAc) = manosa (Man) = glucosa (Glc) = galactosa (Gal) = ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico o NANA)

Figura 13–31 Procesamiento de los oligosacáridos en el ER y en el complejo del Golgi. El proceso es secuencial, esto es, cada uno de los pasos depende de las reacciones anteriores de cada serie. Etapa 1: el procesamiento comienza en el ER con la eliminación de los residuos de glucosa del oligosacárido transferido inicialmente a la proteína. A continuación, una manosidasa presente en la membrana del ER elimina un determinado residuo de manosa. Etapa 2: las etapas siguientes tienen lugar en los dictiosomas, donde en primer lugar la manosidasa I elimina tres residuos más de manosa. Etapa 3: la N-acetilglucosamina transferasa I añade un residuo de *N*-acetilglucosamina. Etapa 4: la manosidasa II elimina a continuación dos residuos más de manosa. Así se obtiene el núcleo final de tres residuos de manosa que se presenta en un oligosacárido complejo. En este estadio, el enlace que existe entre los dos residuos de *N*-acetilglucosamina del núcleo del oligosacárido se vuelve resistente al ataque de una endoglucosidasa altamente específica (*endo-H*). Dado que todas las estructuras posteriores son resistentes a endo-H, se utiliza el tratamiento con esta enzima para distinguir los complejos de oligosacáridos ricos en manosa. Etapa 5: por último, como se muestra en la Figura 13–30, se añaden residuos de *N*-acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico. Estas etapas finales de la síntesis de los oligosacáridos complejos ocurren en las cisternas del complejo de Golgi. Tres tipos de glucosil transferasas actúan de forma secuencial utilizando como sustrato azúcares que han sido activados por unión al nucleótido que se indica. Las membranas de las cisternas del Golgi contienen proteínas transportadoras específicas que permiten la entrada de cada uno de los azúcares-nucleótido intercambiados por los nucleósidos fosfato que se liberan después de que el azúcar se una a la proteína en la cara luminal.
Obsérvese que como orgánulo biosintético que es, el complejo de Golgi se diferencia esencialmente del ER: todos los azúcares son ensamblados en el lumen a partir de nucleótidos-azúcar. Por el contrario, en el ER el *N*-oligosacárido precursor es ensamblado parte en el citosol y parte en el lumen; todas las reacciones luminales utilizan como sustrato azúcares unidos a dolicol (véase Figura 12–52).

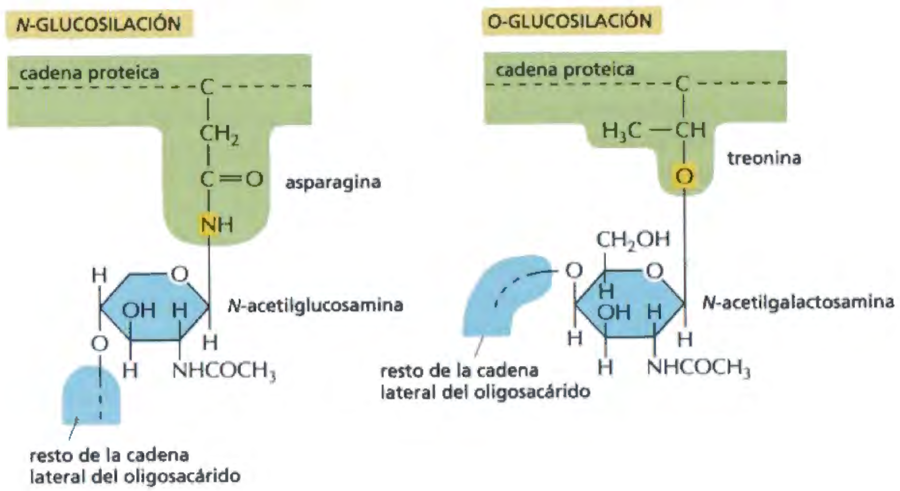


Figura 13–32 *N*- y *O*-glucosilación. En cada caso sólo se muestra el azúcar que está directamente unido a la cadena proteica.

azúcares añadidos a grupos OH de las cadenas laterales de determinadas serinas o treoninas. Como en el caso de la *N*-glucosilación, esta ***O*-glucosilación** (**Figura 13–32**) está catalizada por series de enzimas glucosil-transferasas que utilizan compuestos azúcar-nucleótido en el lumen del Golgi, añadiendo residuos de azúcar, uno a uno, a una proteína. Habitualmente primero se añade la *N*-acetilgalactosamina y, a continuación, un número variable de residuos de azúcar, desde unos cuantos hasta más de 10.

De todas las proteínas glucosiladas, las que lo están más son las *mucinas*, las glucoproteínas de las secreciones mucosas (véase Figura 13–29), y algunas *proteínas núcleo de proteoglucanos*, las cuales son modificadas produciendo **proteoglucanos**. Como se explica en el Capítulo 19, este proceso implica la polimerización de una o más *cadenas de glucosaminoglucano* (largos polímeros no ramificados compuestos por unidades repetidas de disacáridos; véase Figura 19–58) a través de una unión a xilosa en las serinas de una proteína central. Muchos proteoglucanos son secretados y pasan a ser componentes de la matriz extracelular, mientras que otros permanecen anclados a la membrana plasmática. Otros constituyen el componente principal de sustancias como el mucus que es secretado formando una cubierta protectora sobre muchos epitelios.

Los azúcares incorporados a los glucosaminoglucanos son altamente sulfatados justo después de que los polímeros se hayan formado en el complejo de Golgi, lo cual contribuye a la elevada carga negativa que presentan los proteoglucanos. Algunos residuos de tirosina también son sulfatados poco después de salir del complejo de Golgi. En ambos casos, la sulfatación depende de un dador de sulfato 3'-fosfoadenosina–5'-fosfosulfato (PAPS: 3'-***phos*****phoadenosine**-5'-***phosphosulfate***) (**Figura 13–33**), que es transportado desde el citosol hasta el lumen del compartimiento *trans* del Golgi.

¿Cuál es el propósito de la glucosilación?

Existe una diferencia importante entre la construcción de un oligosacárido y la síntesis de otras macromoléculas como el DNA, el RNA o las proteínas. Mientras que los ácidos nucleicos y las proteínas son copiadas de un molde a través de una serie repetida de pasos idénticos y utilizando la misma enzima o grupo de enzimas, los carbohidratos complejos requieren una enzima diferente en cada paso, de forma que cada producto de una reacción es reconocido como el sustrato exclusivo por la enzima siguiente de la serie. La amplia abundancia de glucoproteínas y las complejas vías que han tenido que evolucionar para sintetizarlas parecen sugerir que los oligosacáridos de las glucoproteínas y los glucoesfingolípidos cumplen funciones muy importantes.

Por ejemplo, la *N*-glucosilación es predominante en todos los eucariotas, incluyendo las levaduras. También se encuentran *N*-oligosacáridos de forma similar en la pared celular de las arqueas, lo que sugiere un origen evolutivo remoto de toda la maquinaria sintética requerida para su producción. La *N*-glucosilación contribuye al plegamiento de las proteínas de dos maneras. En primer lugar facilita la solubilidad de los intermediarios de plegamiento y evita de ese modo su agregación. En segundo lugar, las modificaciones secuenciales de los *N*-oligosacáridos establece un "glucocódigo" que determina la progresión del plegamiento

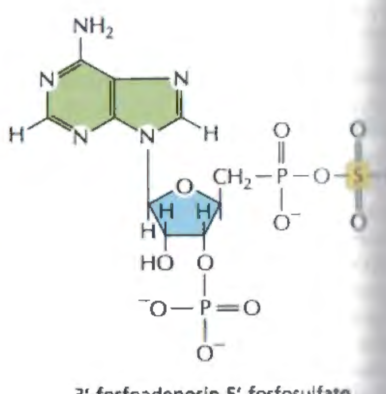


Figura 13–33 Estructura de PAPS.

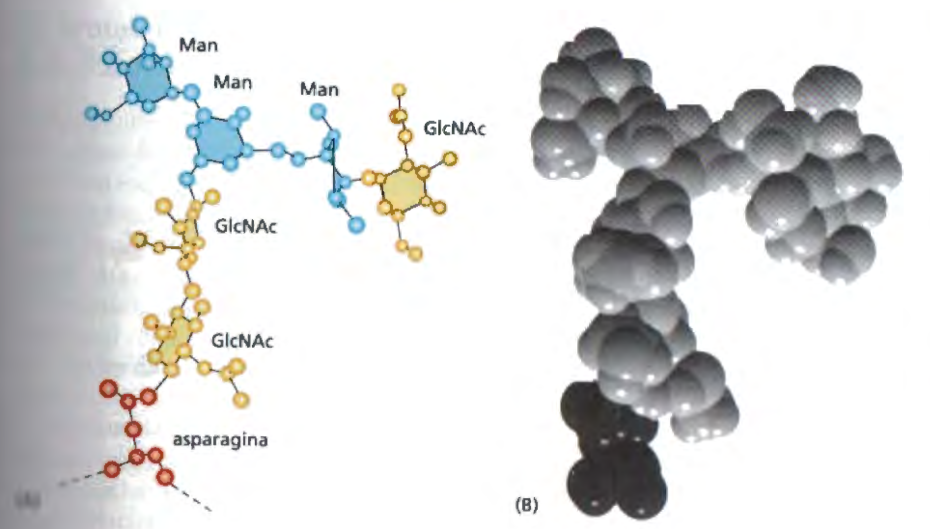


Figura 13–34 Estructura tridimensional de un pequeño *N*-oligosacárido. La estructura fue determinada por análisis cristalográfico de rayos X de una glucoproteína. Este oligosacárido tan sólo contiene 6 residuos de azúcar, mientras que el oligosacárido transferido inicialmente a las proteínas en el ER tiene 14 residuos de azúcar (véase Figuras 12–50 y 12–51). (A) Modelo del esqueleto del compuesto, en el que se muestran todos los átomos excepto los de hidrógeno. (B) Modelo espacial en el que la asparagina se identifica por átomos oscuros. (B, cortesía de Richard Feldmann.)

de las proteínas y participa en la unión de la proteína a las chaperonas (descritas en el Capítulo 12) y lectinas, por ejemplo, en el direccionamiento del transporte ER hacia el Golgi. Como se indicará más adelante, las lectinas también participan en la clasificación de proteínas en la red del *trans* Golgi.

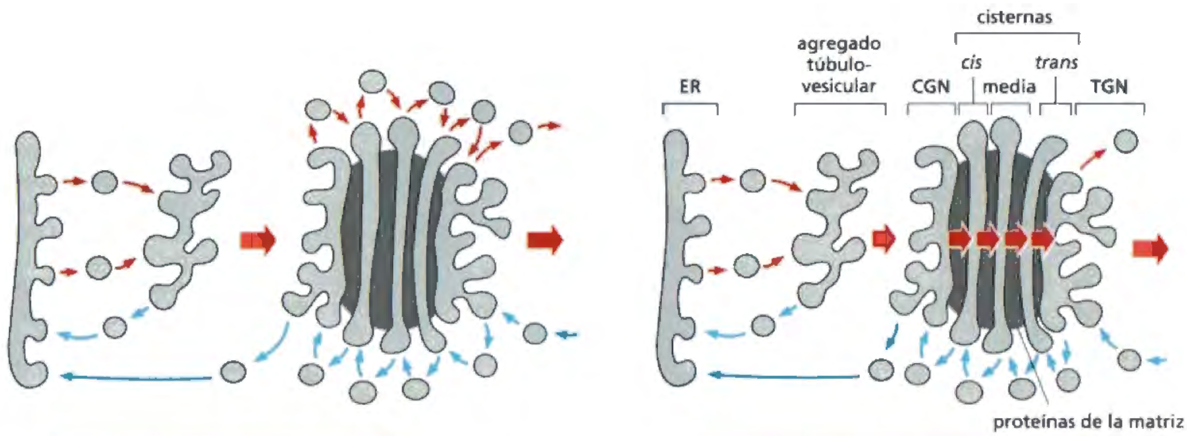
Debido a que las cadenas de azúcares tienen una flexibilidad limitada, incluso un pequeño *N*-oligosacárido que se proyecta desde la superficie de la glucoproteína puede limitar la aproximación de otras macromoléculas a la superficie proteica (**Figura 13–34**). De esta manera, por ejemplo, la presencia de oligosacáridos tiende a formar glucoproteínas más resistentes a la digestión por la acción de enzimas proteolíticas. Es posible que los oligosacáridos de la superficie celular formaran una cubierta protectora en las células ancestrales. Comparado con la rígida pared bacteriana, la cubierta de mucus tiene la ventaja de que permite a la célula cambiar de forma y moverse.

Las cadenas de azúcar han sido modificadas para realizar también otras funciones. Por ejemplo, la cubierta mucosa en el epitelio pulmonar y en las células intestinales protege contra muchos patógenos. El reconocimiento de las cadenas de azúcar por las *lectinas* en el espacio extracelular es importante en muchos procesos de desarrollo y en el reconocimiento célula-célula: por ejemplo, las *selectinas* son lectinas que participan en la adhesión célula-célula durante la migración de los linfocitos, como se describe en el Capítulo 19. La presencia de oligosacáridos puede modificar las propiedades antigénicas de una proteína haciendo de la glucosilación un factor importante a considerar en la producción de proteínas con finalidad farmacológica.

La glucosilación también tiene una función reguladora importante. Por ejemplo, la señalización a través del receptor de superficie celular Notch es importante para la determinación del comportamiento de las células en el desarrollo. Notch es una proteína transmembrana que es *O*-glucosilada por adición de una simple fucosa a algunos residuos de serina, treonina o hidroxilisina. Algunos tipos celulares expresan además otra glucosiltransferasa que, en el complejo de Golgi, añade una *N*-acetilglucosamina a cada una de esas fucosas. Esta adición cambia la especificidad del receptor Notch para las proteínas de señal de la superficie celular que activan al receptor.

El transporte a través del complejo de Golgi se lleva a cabo mediante transporte vesicular o maduración de cisternas

Todavía desconocemos de qué forma el complejo de Golgi adquiere y mantiene su estructura polarizada y cómo las moléculas se desplazan de una cisterna a otra. Las evidencias funcionales aportadas por los ensayos de transporte *in vitro* y la observación de numerosas vesículas de transporte en las proximidades de las cisternas del Golgi llevaron a la conclusión de que esas vesículas transportan proteínas entre las cisternas, formándose en una cisterna y fusionándose con la siguiente. De acuerdo con este **modelo de transporte vesicular**, el complejo de Golgi es una estructura relativamente estática, con sus enzimas colocadas en posición, mientras que las moléculas en tránsito se desplazan a través de las cisternas de for-



(A) MODELO DE TRANSPORTE VESICULAR

(B) MODELO DE MADURACIÓN DE CISTERNAS

ma secuencial, transportadas por las vesículas de transporte (**Figura 13–35**A). Un flujo retrógrado de vesículas recupera las moléculas que escapan del ER y del Golgi y las devuelve a los compartimientos anteriores. Es posible conseguir un flujo direccional permitiendo a las moléculas carga que han de avanzar, el acceso a vesículas de movimiento anterógrado. Aunque probablemente tanto las vesículas de transporte anterógrado como retrógrado tienen cubiertas de tipo COPI, las cubiertas pueden contener diferentes proteínas adaptadoras que confieran la especificidad de empaquetamiento de las moléculas carga. Una posibilidad alternativa es que las vesículas de transporte que se desplazan entre las cisternas del Golgi podrían no ser dirigidas, transportando materiales al azar adelante y atrás; el direccionamiento se mantendría por el aporte continuo de materiales en la cisterna *cis* y la extracción del mismo en la cisterna *trans*.

Una hipótesis diferente, denominada **modelo de maduración de cisternas**, considera al complejo de Golgi como una estructura dinámica en la que las propias cisternas se desplazan. Las agrupaciones túbulo-vesiculares que proceden del ER se fusionan unas con otras formando la red del *cis* Golgi. De acuerdo con este modelo, esta red madura de forma progresiva hasta formar una cisterna *cis*, después una cisterna media, y así cada vez. Así pues, en la cara *cis* de un dictiosoma continuamente se forman nuevas cisternas, las cuales migrarán a través del dictiosoma a medida que vayan madurando (Figura 13–35B). Este modelo viene apoyado por observaciones microscópicas que demuestran que grandes estructuras como las fibrillas de colágeno en los fibroblastos y las escamas de ciertas algas –que son demasiado grandes para caber en las vesículas de transporte clásicas– se desplazan progresivamente a través del dictiosoma.

En el modelo de maduración de cisternas, el flujo retrógrado explica la distribución característica de las enzimas del Golgi. Todo se desplaza continuamente en dirección anterógrada con la cisterna en maduración, incluyendo las enzimas de procesamiento que son propias del inicio del complejo de Golgi. Pero las vesículas recubiertas de COPI que se forman recolectan continuamente las enzimas apropiadas, casi todas ellas proteínas de membrana, y las transportan hacia atrás, hacia la cisterna anterior, en la que actúan. Una cisterna *cis* formada de nuevo recibirá su complemento normal de enzimas residentes sobre todo de la cisterna que se encuentra justo por encima de ella y después las pasará a la nueva cisterna *cis* que se formará.

Como se describirá más adelante, cuando una cisterna finalmente se desplaza hacia adelante formando parte de la red del *trans* Golgi, a partir de ella se generan varios tipos de vesículas recubiertas, hasta que la red desaparece y es reemplazada por la cisterna en maduración que se encuentra justo por debajo. Al mismo tiempo, otras vesículas de transporte están constantemente recuperando membrana de los compartimientos post-Golgi y devolviéndola a la red del *trans* Golgi.

Los modelos de transporte vesicular y de maduración de cisternas no son mutuamente excluyentes. Por el contrario, las evidencias sugieren que el transporte puede ocurrir por una combinación de los dos mecanismos, en las que algunas moléculas transportadas se desplacen con rapidez en vesículas de transporte, mientras que otras sean más lentas a medida que el complejo de Golgi se va renovando a través de la maduración de las cisternas.

Figura 13–35 Dos posibles modelos que explican la organización del complejo de Golgi y el transporte de proteínas desde una cisterna a la siguiente. Es posible que el transporte a través del Golgi en sentido hacia adelante (*flechas rojas*) implique elementos de los mecanismos que se muestran. (A) En el modelo de transporte vesicular, las cisternas del Golgi son orgánulos estáticos que contienen un juego característico de enzimas residentes. El paso de moléculas a través del Golgi se realiza mediante vesículas de transporte que se desplazan hacia adelante, formándose en una cisterna y fusionándose con la siguiente en sentido de *cis* hacia *trans*. (B) De acuerdo con el modelo alternativo de maduración de las cisternas, cada una de las cisternas del Golgi madura a medida que migra a través de un dictiosoma. En cada etapa, las proteínas residentes en el Golgi, que han sido transportadas hacia adelante en una cisterna, son devueltas hacia atrás a la cisterna anterior mediante vesículas recubiertas de COPI. Cuando una cisterna formada de nuevo se desplaza, por ejemplo, hacia la posición media, las enzimas del *cis* Golgi "sobrantes" deberán ser extraídas y transportadas hacia atrás a una nueva cisterna *cis*. De la misma forma, las enzimas *medias* serán recibidas mediante transporte retrógrado desde la cisterna que se encuentra justo por delante. De esta forma, una cisterna *cis* podría madurar a cisterna *media* a medida que se desplaza hacia el exterior.

Las proteínas de la matriz del complejo de Golgi organizan el dictiosoma

La arquitectura especial del complejo de Golgi depende tanto del citoesqueleto de microtúbulos, como ya se ha descrito, como de proteínas citoplasmáticas de la matriz del Golgi, que forman un esqueleto entre cisternas adyacentes y confieren al dictiosoma su integridad estructural. Algunas de las proteínas de la matriz forman cordones largos, filamentosos, que parece que ayudan a mantener las vesículas de transporte en la proximidad del orgánulo. Cuando una célula se prepara para dividirse, las proteínas quinasa mitóticas fosforilan las proteínas de la matriz del Golgi, provocando la fragmentación y dispersión del complejo de Golgi por el citosol. Entonces los fragmentos del Golgi son distribuidos de forma uniforme entre las dos células hijas donde las proteínas de matriz son desfosforiladas, permitiendo el reensamblaje del complejo de Golgi.

Hay que destacar que las proteínas de la matriz del Golgi pueden ensamblarse en dictiosomas localizados en las cercanías del centrosoma a pesar de que experimentalmente se impida que las proteínas del Golgi salgan del ER. Ello sugiere que las proteínas de la matriz son las principales responsables de la estructura y la localización del complejo de Golgi.

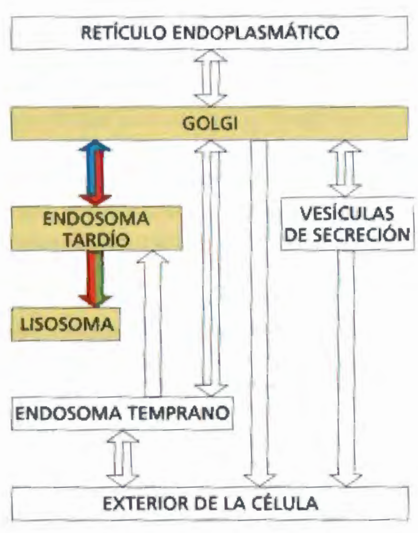
Resumen

Las proteínas correctamente plegadas y ensambladas en el ER son empaquetadas en vesículas de transporte recubiertas de COPII que se forman en la membrana del ER. Poco después, las vesículas pierden su cubierta y se fusionan unas con otras formando agrupaciones túbulo-vesiculares. Entonces las agrupaciones se desplazan siguiendo los microtúbulos hacia el complejo de Golgi, donde se fusionan entre sí formando la red del cis *Golgi. Cualquier proteína residente en el ER que escape del ER es devuelta allí desde las agrupaciones túbulo-vesiculares y el complejo de Golgi mediante transporte retrógrado en vesículas recubiertas de COPI.*

El complejo de Golgi, a diferencia del ER, contiene muchos azúcares, que son utilizados por enzimas glucosil transferasas para realizar reacciones de glucosilación de lípidos y de proteínas a medida que pasan a través del complejo de Golgi. Con frecuencia, las manosas de los N*-oligosacáridos que se añaden a las proteínas en el ER son eliminadas de manosas y posteriormente se añaden nuevos azúcares. Además, en el complejo de Golgi es donde tiene lugar la* O*-glucosilación y donde las cadenas de glucosaminoglucanos son añadidas a las proteínas centrales formando los proteoglucanos. La sulfatación de los azúcares de los proteoglucanos y de determinadas tirosinas también se produce en un compartimiento tardío del Golgi.*

El complejo de Golgi modifica las numerosas proteínas y lípidos que recibe desde el ER, y las distribuye hacia la membrana plasmática, lisosomas y vesículas de secreción. El complejo de Golgi es una estructura polarizada que consiste en uno o más apilamientos de cisternas en forma de disco, los dictiosomas. Cada uno de ellos se organiza en al menos tres compartimientos funcionalmente diferentes: las cisternas cis*, media y* trans*. Las cisternas* cis *y* trans *están conectadas a estructuras de clasificación especializadas, denominadas la red del* cis *Golgi y la red del* trans *Golgi, respectivamente. Las proteínas y lípidos se desplazan a través de los dictiosomas en sentido de* cis *a* trans*. Este desplazamiento puede ocurrir mediante transporte vesicular, por maduración progresiva de la cisterna cis, a medida que migra de forma continua a través del dictiosoma, o, más probablemente, por una combinación de ambos mecanismos. Parece que el mantenimiento de las enzimas concentradas en la cisterna donde se necesitan se consigue mediante un transporte retrógrado continuo desde la cisterna siguiente. Las proteínas nuevas, acabadas, alcanzan la red del* trans *Golgi, donde son empaquetadas en vesículas de transporte y enviadas a sus destinos específicos en la célula.*

TRANSPORTE DESDE LA RED DEL *TRANS* GOLGI A LOS LISOSOMAS



La red del *trans* Golgi clasifica todas las proteínas que pasan a través del complejo de Golgi (excepto las que son retenidas en él como residentes permanentes) de acuerdo con su destino final. El mecanismo de clasificación está especialmente bien estudiado para el caso de las proteínas destinadas al lumen de los lisosomas. En esta sección vamos a considerar este proceso de transporte selectivo. En primer lugar, se efectuará una breve descripción de la estructura y la función de los lisosomas.

Los lisosomas son el lugar principal de digestión intracelular

Los **lisosomas** son compartimientos delimitados por membrana rellenos de enzimas hidrolíticas solubles que controlan la digestión intracelular de macromoléculas. Contienen alrededor de 40 tipos de enzimas hidrolíticas, entre las que se encuentran proteasas, nucleasas, glucosidasas, lipasas, fosfolipasas, fosfatasas y sulfatasas. Todas ellas son **hidrolasas ácidas**. Para actuar en condiciones óptimas necesitan por una parte ser activadas mediante un corte proteolítico y por otra un medio ácido, como el que tiene el lisosoma que mantiene el pH alrededor de 4,5-5,0 en su interior. En este sentido, el citosol está doblemente protegido contra el ataque de su propio sistema digestivo: la membrana del lisosoma mantiene las enzimas alejadas del citosol, pero incluso en el caso de que se produzca alguna fuga pueden hacer poco daño en el citosol, ya que tiene unas condiciones de pH de aproximadamente 7,2.



Figura 13–36 Lisosomas. Las hidrolasas ácidas son enzimas hidrolíticas que están activas en condiciones ácidas. En la membrana, una ATPasa de tipo V bombea H^+ hacia el interior del lisosoma y mantiene su lumen a pH ácido.

Como en el caso de otros orgánulos intracelulares, el lisosoma no sólo contiene una dotación única de enzimas sino también una membrana envolvente con propiedades características. Por ejemplo, la mayoría de las proteínas de membrana lisosómicas están muy glucosiladas, lo que las protege de las proteasas lisosómicas del lumen. Los transportadores de la membrana lisosómica transportan los productos finales de la digestión de las macromoléculas –como por ejemplo aminoácidos, azúcares y nucleótidos– al citosol, donde podrán ser reutilizados o excretados.

Una *ATPasa de H^+ vacuolar* situada en la membrana del lisosoma utiliza la energía de hidrólisis del ATP para bombear H^+ al interior del lisosoma, manteniendo así el lumen a un pH ácido (**Figura 13–36**). La bomba de H^+ lisosómica es un miembro de la familia de *ATPasas de tipo V* que tiene una estructura similar a las ATP sintasas de la mitocondria y del cloroplasto (ATPasas de tipo F), que convierten la energía almacenada en el gradiente de H^+ en ATP (véase Figura 11–12). Sin embargo, a diferencia de estas enzimas, la ATPasa de H^+ vacuolar actúa en el sentido opuesto, bombeando H^+ en el orgánulo. ATPasas de tipo V similares o idénticas son las responsables de la acidificación de todos los orgánulos endocíticos y exocíticos, incluyendo lisosomas, endosomas, compartimientos concretos del complejo de Golgi y muchas vesículas de transporte y de secreción. El bajo pH propio del medio interior es adecuado para que se produzcan las reacciones propias del lumen del orgánulo y es una fuente de energía que dirige el transporte de metabolitos pequeños a través de la membrana.

Los lisosomas son heterogéneos

Los lisosomas fueron descubiertos mediante el fraccionamiento bioquímico de extractos celulares y, más tarde, fueron observados con el microscopio electrónico. Aunque son extraordinariamente diversos en cuanto a forma y tamaño, se demuestra que son miembros de una familia única de orgánulos mediante tinción con anticuerpos específicos. También pueden identificarse mediante técnicas histoquímicas, utilizando el precipitado producido por la acción de una hidrolasa ácida sobre su sustrato, para mostrar qué orgánulos contienen la hidrolasa (**Figura 13–37**). Utilizando este criterio, los lisosomas se hallan en todas las células eucariotas.

La heterogeneidad de la morfología lisosómica contrasta con la uniformidad relativa de la mayoría de los otros orgánulos celulares. La diversidad refleja la amplia variedad de funciones digestivas mediadas por las hidrolasas ácidas, como la digestión de desechos intra y extracelulares, la digestión de microorganismos fagocitados e incluso la nutrición celular. La diversidad de morfología de los lisosomas es un reflejo de la manera como se forman: endosomas tardíos que contienen material procedente tanto desde la membrana plasmática como hidrolasas ácidas de nueva síntesis. Los endosomas tardíos se fusionan con lisosomas preexistentes formando estructuras denominadas *endolisosomas*, que a su vez se fusionan unos

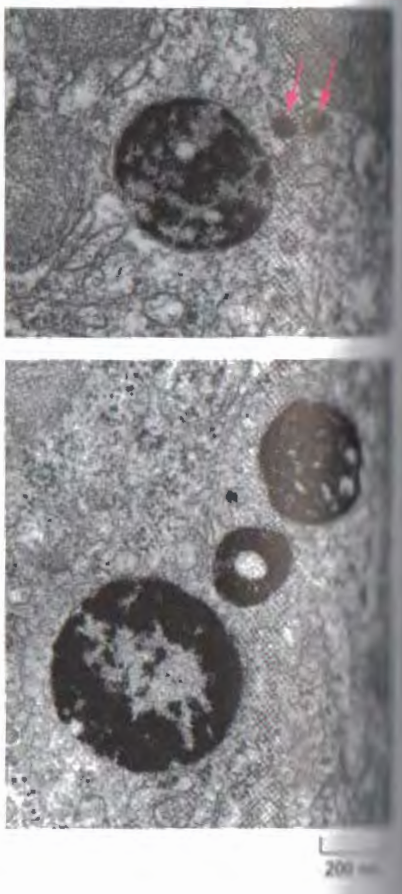


Figura 13–37 Visualización histoquímica de los lisosomas. Estas electromicrografías muestran dos secciones de una célula, contrastadas para poner de manifiesto la localización de la fosfatasa ácida, una enzima marcadora de lisosomas. Los grandes orgánulos envueltos de membrana, que contienen precipitados densos de fosfato de plomo, son lisosomas. Su diversa morfología refleja variaciones de la cantidad y de la naturaleza del material que están digiriendo. Los precipitados se producen cuando el tejido fijado con glutaraldehído (para fijar las enzimas en su sitio) se incuba con un sustrato de la fosfatasa en presencia de iones plomo. En el panel superior, se indican mediante *flechas rojas* dos pequeñas vesículas que probablemente transportan hidrolasas desde el complejo de Golgi. (Por cortesía de Daniel S. Friend.)

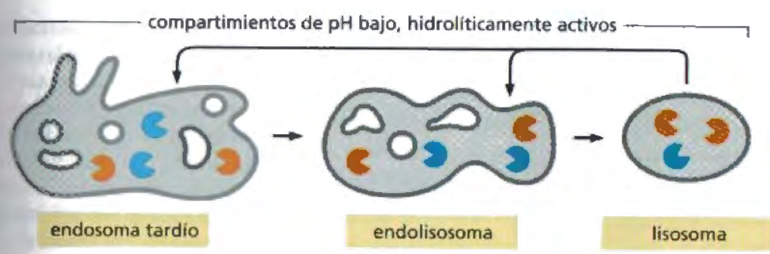


Figura 13-38 Modelo de maduración del lisosoma. La hetereogeneidad de la morfología del lisosoma refleja, al menos en parte, la naturaleza diversa de los materiales que son transportados al orgánulo así como las diferentes etapas del ciclo de maduración que se muestran.

con otros (**Figura 13–38**). Cuando ha sido digerido la mayor parte del material endocitado dentro de un endolisosoma, sólo permanecen en su interior aquellos materiales de digestión más lenta o indigeribles, y a estos orgánulos se los denomina lisosomas "clásicos". Son relativamente densos, redondos y pequeños, pero pueden volver a entrar en el ciclo fusionándose con endosomas tardíos o con endolisosomas. Así pues no existe una diferencia real entre endosomas tardíos y lisosomas: son el mismo orgánulo excepto que se encuentran en diferentes estados del ciclo de maduración. Por esta razón, a veces se considera a los lisosomas como una colección heterogénea de orgánulos distintos cuya única característica común es su elevado contenido de enzimas hidrolíticas. Como veremos a continuación, en las células vegetales es especialmente difícil aplicar una definición más ajustada.

Las vacuolas de las plantas y de los hongos son lisosomas muy versátiles

La mayoría de células vegetales y de hongos (incluyendo las levaduras) tienen una o varias vesículas muy grandes y llenas de fluido, llamadas **vacuolas**, que ocupan por lo general más del 30% del volumen celular y cerca del 90% en algunos tipos celulares (**Figura 13–39**). Las vacuolas están relacionadas con los lisosomas de las células animales y contienen numerosas enzimas hidrolíticas, pero sus funciones son muy diversas. Las vacuolas vegetales pueden actuar como almacén de nutrientes y de productos de desecho, como compartimiento de degradación, incrementando el volumen celular de una forma económica (**Figura 13–40**), y controlando la *presión de turgencia* (la presión osmótica que empuja hacia afuera la pared celular y que impide que la planta se marchite). Una misma célula puede tener diferentes vacuolas con distintas funciones como, por ejemplo, digestión y almacenamiento.

La vacuola es importante como aparato homeostático y permite a las células vegetales resistir grandes variaciones de su entorno. Por ejemplo, cuando el pH del medio disminuye,

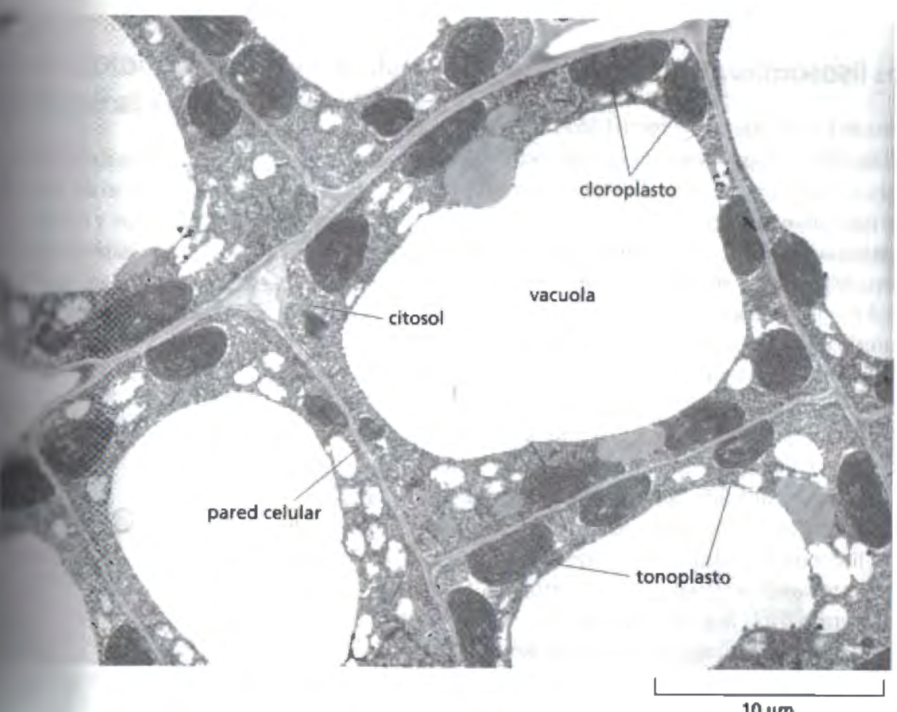


Figura 13-39 Las vacuolas de una célula vegetal. Esta electromicrografía de células de una hoja joven de tabaco muestra el citoplasma como una delgada capa que contiene numerosos cloroplastos, apretados contra la pared por la enorme vacuola. La membrana de la vacuola recibe el nombre de tonoplasto. (Por cortesía de J. Burgess.)

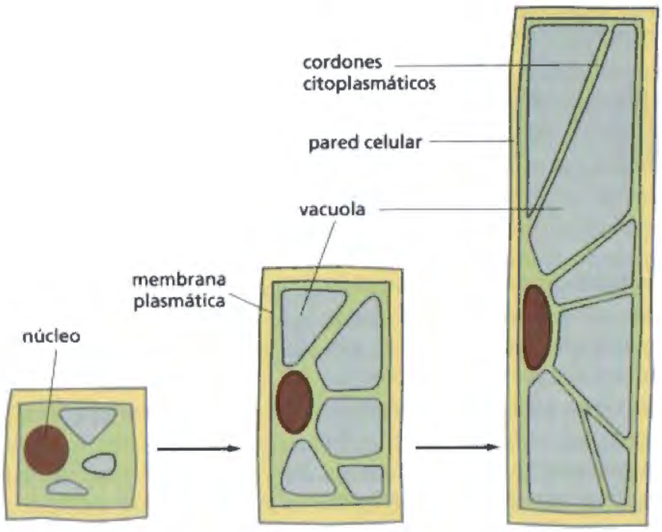


Figura 13–40 El papel de la vacuola en el control del tamaño de las células vegetales. Una célula vegetal puede aumentar notablemente su volumen sin incrementar el volumen del citosol. La relajación local de la pared permite una expansión celular impulsada por la turgencia que conlleva la captación de agua en el interior de una vacuola en expansión. Por último, el citoplasma queda confinado a un delgado estrato periférico, comunicado con la región perinuclear mediante cordones de citoplasma estabilizados por haces de filamentos de actina (no mostrado).

el flujo de H^+ hacia el citosol es controlado, al menos en parte, aumentando el transporte de H^+ a la vacuola, de manera que tiende a mantener constante el pH del citosol. De forma parecida, muchas células vegetales mantienen una presión de turgencia casi constante a pesar de que se produzcan grandes cambios en la osmolaridad del fluido que les rodea. Esto lo consiguen cambiando la presión osmótica del citosol y de la vacuola; en parte por la hidrólisis y resíntesis controlada en la vacuola de algunos polímeros como el polifosfato y, en parte, por la alteración del transporte de azúcares, aminoácidos y otros metabolitos a través de la membrana plasmática y vacuolar. La presión de turgencia regula las actividades de los diferentes transportadores de cada membrana para controlar los flujos.

Los seres humanos recolectan frecuentemente las sustancias almacenadas en las vacuolas de las plantas. En diferentes especies van desde la goma al opio o al aromatizante del ajo. Muchos productos almacenados tienen una función metabólica. Por ejemplo, las proteínas pueden ser almacenadas durante años en las vacuolas de algunas células de muchas semillas, como los guisantes y las judías. Cuando estas semillas germinan, las proteínas son hidrolizadas y los aminoácidos dan alimento al embrión. Los antocianos, pigmentos que se encuentran en las vacuolas, dan color a los pétalos de muchas flores atrayendo los insectos polinizadores, mientras que las moléculas nocivas, liberadas de las vacuolas cuando una planta es comida o dañada, proporcionan un sistema de defensa contra los depredadores.

Varias vías aportan materiales a los lisosomas

En general, los lisosomas son puntos de encuentro en los que convergen diferentes corrientes del tráfico intracelular. Una ruta que se dirige hacia fuera desde el ER vía complejo de Golgi entrega la mayoría de las enzimas digestivas, mientras que al menos tres vías desde diferentes orígenes introducen sustancias en los lisosomas para su degradación.

De estas vías, la mejor estudiada es la de las macromoléculas que son tomadas del fluido extracelular mediante *endocitosis*. Como se describirá, las moléculas endocitadas son entregadas en forma de pequeñas vesículas a orgánulos intracelulares de formas irregulares denominados *endosomas tempranos*. Allí los materiales endocitados se encuentran con las hidrolasas ácidas lisosómicas, transportadas al endosoma desde el complejo de Golgi. Algunas de las moléculas endocitadas son seleccionadas y recicladas a la membrana plasmática, mientras que otras se dirigen a los *endosomas tardíos*. El interior de los endosomas tardíos es medianamente ácido (pH ~6) y se cree que es el lugar donde empieza la digestión hidrolítica de las moléculas endocitadas. Tal como se ha indicado, los lisosomas maduros se forman por maduración a partir de los endosomas tardíos acompañados de un descenso más pronunciado del pH interno. A medida que los lisosomas maduran, las proteínas de membrana endosómicas son recuperadas selectivamente desde el lisosoma en desarrollo por vesículas de transporte que las entregan a los endosomas o a la red del *trans* Golgi.

En todas las células existe una segunda ruta que aporta materiales a los lisosomas para su degradación y mediante la cual pueden ser destruidas partes obsoletas de la propia célula: el proceso denominado **autofagia**. En una célula hepática, por ejemplo, una mitocondria

tiene una vida media de 10 días. En las imágenes de microscopía electrónica de células normales se pueden observar lisosomas conteniendo (y probablemente digiriendo) mitocondrias. El proceso de digestión se inicia al quedar rodeado el orgánulo por una doble membrana de origen desconocido, generándose un *autofagosoma*, que se fusiona con un lisosoma. El proceso está muy regulado, de forma que durante la remodelación celular se pueden seleccionar diferentes componentes celulares y ser destinados a su destrucción. Por ejemplo, el ER liso que prolifera en una célula hepática, como una respuesta detoxificadora frente a compuestos de naturaleza lipídica como el fenobarbital (descrito en el Capítulo 12), es eliminado de forma selectiva por medio de autofagia cuando se retira el compuesto.

De la misma manera otros orgánulos obsoletos, incluyendo peroxisomas senescentes o mitocondrias, pueden ser marcados selectivamente para degradación mediante autofagia. En condiciones de ayuno grandes porciones del citosol son capturados de manera no selectiva en autofagolisosomas. Los metabolitos derivados de la digestión del material capturado contribuyen a la supervivencia celular cuando la disponibilidad de nutrientes externos es limitante.

Además de contribuir al correcto equilibrio de funciones celulares básicas y a destruir aquellas partes de la célula que están obsoletas, la autofagia desempeña un papel en el desarrollo y en la salud. Ayuda a la reestructuración de las células en diferenciación eliminando aquellas estructuras que ya no son necesarias y participa en los mecanismos de defensa ante la infección de virus y bacterias. La autofagia es el mecanismo del que dispone la célula para la eliminación de orgánulos completos y complejos proteicos que la degradación proteosomal no puede realizar.

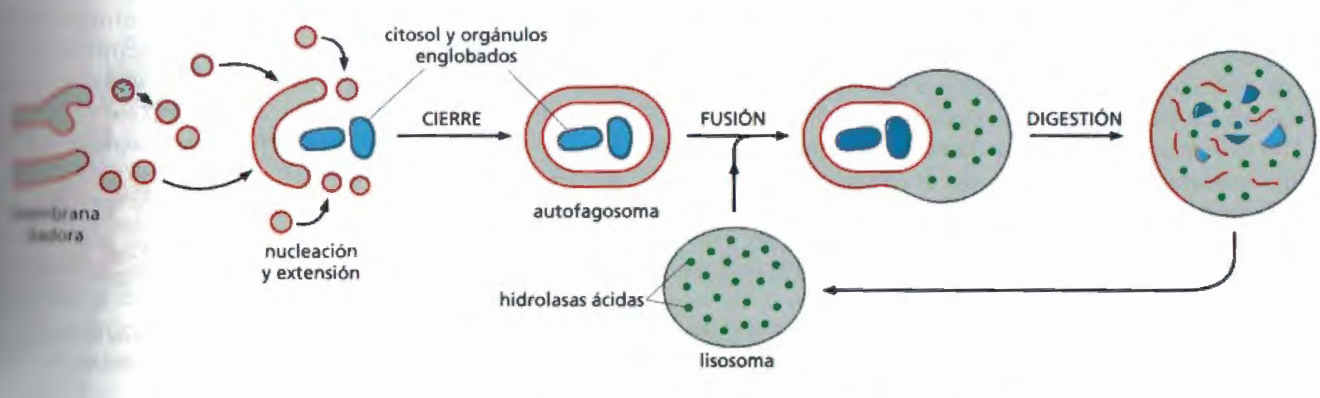
Aún se conoce muy poco sobre la formación de los autofagosomas o cómo se controla el proceso de autofagia dirigiéndolo a orgánulos específicos. Se han identificado más de 25 proteínas que participan en el proceso en levaduras y en células animales. La autofagia se divide en cuatro etapas: (1) nucleación y extensión de una membrana en una estructura en forma de U que delimita una porción de citosol, (2) cierre del autofagolisosoma en un compartimiento cerrado y delimitado por una doble membrana, (3) fusión del nuevo compartimiento con lisosomas y (4) digestión de la membrana interna del autofagolisosoma y de su contenido (**Figura 13–41**). Aún quedan muchos misterios por resolver, incluyendo la identificación del sistema de membranas a partir de las que se forma la envoltura del autofagolisosoma y cómo algunos orgánulos diana pueden ser envueltos con tanta especificidad.

Como se describirá más adelante, la tercera ruta que proporciona materiales a los lisosomas sólo tiene lugar en células que están especializadas en la *fagocitosis* de grandes partículas y de microorganismos. Estas células (macrófagos y neutrófilos en los vertebrados) pueden ingerir grandes objetos y formar un *fagosoma*. Parece que el fagosoma se transforma en lisosoma de la misma forma que hemos explicado para el caso del autofagosoma. La **Figura 13–42** resume estas tres rutas.

Un receptor de manosa 6-fosfato reconoce las proteínas lisosómicas en la red del *trans* Golgi

Ahora estudiaremos la ruta que conduce a las hidrolasas ácidas y a las proteínas de membrana a los lisosomas. Ambos tipos de proteínas son transportadas cotraduccionalmente en el ER rugoso y son transportadas a través del complejo de Golgi hasta el TGN. Las vesículas de transporte que conducen estas proteínas hasta los endosomas (desde donde las proteínas son llevadas a los lisosomas) parten del TGN. Las vesículas incorporan las proteínas lisosómicas y excluyen a muchas otras proteínas, que serán empaquetadas en otras vesículas.

Figura 13–41 Un modelo de autofagia. Después del proceso de nucleación en el citoplasma, se forma una estructura de membrana en forma de U por la fusión de vesículas de origen desconocido. Posteriormente, el autofagosoma se cierra mediante fusión de la membrana y rodea una porción del citoplasma de la célula mediante una doble membrana. A continuación, el autofagosoma se fusiona con lisosomas que contienen hidrolasas ácidas, digiriendo su contenido.



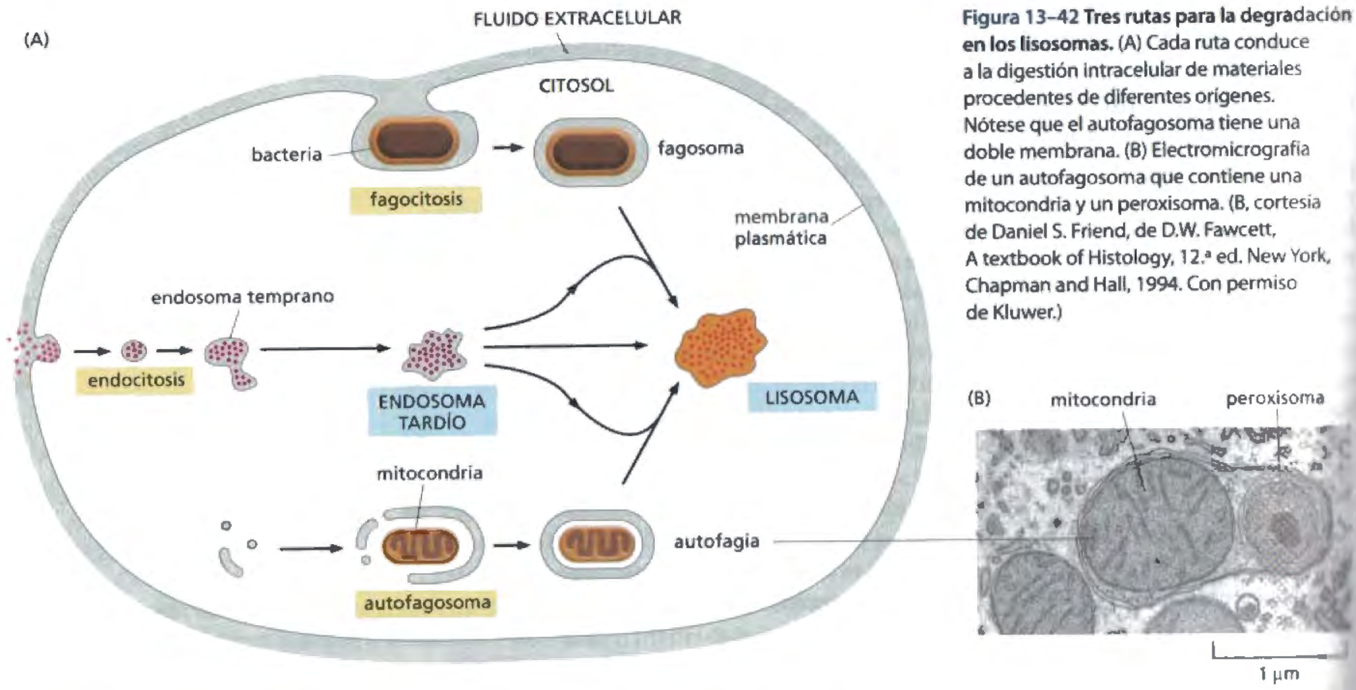


Figura 13–42 Tres rutas para la degradación en los lisosomas. (A) Cada ruta conduce a la digestión intracelular de materiales procedentes de diferentes orígenes. Nótese que el autofagosoma tiene una doble membrana. (B) Electromicrografía de un autofagosoma que contiene una mitocondria y un peroxisoma. (B, cortesía de Daniel S. Friend, de D.W. Fawcett, A textbook of Histology, 12.ª ed. New York, Chapman and Hall, 1994. Con permiso de Kluwer.)

¿Cómo son reconocidas y seleccionadas las proteínas lisosómicas con la precisión necesaria? Conocemos la respuesta para las hidrolasas lisosómicas. Estas hidrolasas presentan un solo marcador en forma de *grupos manosa 6-fosfato (M6P)*, los cuales son añadidos exclusivamente a los *N*-oligosacáridos de estas enzimas lisosómicas solubles, probablemente mientras están en el lumen de la red del *cis* Golgi (**Figura 13–43**). **Proteínas receptoras de M6P** transmembrana de M6P presentes en el TGN reconocen los grupos M6P. Las proteínas receptoras se unen a las hidrolasas lisosómicas en el lado luminal de la membrana y a las proteínas adaptadoras, en el proceso de ensamblaje de las cubiertas de clatrina, por el lado citosólico. De esta manera ayudan a empaquetar las hidrolasas en vesículas recubiertas de clatrina que se forman a partir del TGN. Las vesículas pierden su cubierta y entregan después su contenido a un endosoma temprano.

El receptor M6P viaja como una lanzadera entre determinadas membranas

El receptor M6P une su oligosacárido específico a pH 6,5-6,7 en el TGN y lo libera a pH 6, que es el pH del interior de los endosomas tardíos. Así, a medida que el pH se reduce a lo largo de la maduración del endosoma, las hidrolasas lisosómicas se separan del receptor de M6P e inician la hidrólisis del material capturado mediante endocitosis. Una fosfatasa ácida elimina el grupo fosfato de la manosa destruyendo la señal y contribuyendo a la liberación de las hidrolasas ácidas del receptor de M6P. Una vez han liberado las enzimas, los receptores M6P son introducidos en vesículas recubiertas de retrómero que se forman en los endosomas; los receptores son devueltos al TGN para su reutilización (**Figura 13–44**). El transporte en cualquier dirección requiere la existencia de señales en la cola citoplasmática del receptor M6P que dirigen el transporte de la proteína hacia el endosoma o de vuelta al complejo de Golgi. Estas señales son reconocidas por el complejo de retrómero (véase Figura 13–9) que recluta receptores M6P en vesículas en los endosomas. El reciclaje del receptor M6P tiene un gran parecido al del receptor KDEL descrito, aunque se diferencia en cuanto al tipo de vesículas recubiertas implicadas en este transporte.

No todas las moléculas de hidrolasas que están marcadas con M6P alcanzan el lisosoma. Algunas consiguen escapar del proceso de empaquetamiento en la red del *trans* Golgi y son transportadas, "por defecto", a la superficie celular, desde donde son secretadas al fluido extracelular. No obstante, algunos receptores M6P también toman un desvío hacia la membrana plasmática, donde recapturan a las hidrolasas lisosómicas escapadas y las devuelven mediante una *endocitosis mediada por receptor* a los lisosomas vía endosomas tempranos y tardíos. Dado que las hidrolasas lisosómicas precisan de un medio ácido para su actividad, pueden provocar pocos daños en el medio extracelular que tiene habitualmente un pH neutro de 7,4.

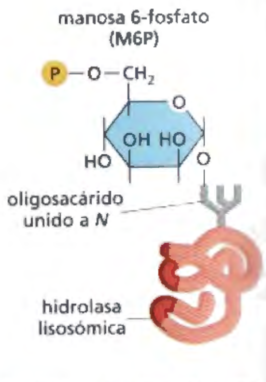


Figura 13–43 La estructura de la manosa 6-fosfato en una enzima lisosómica.

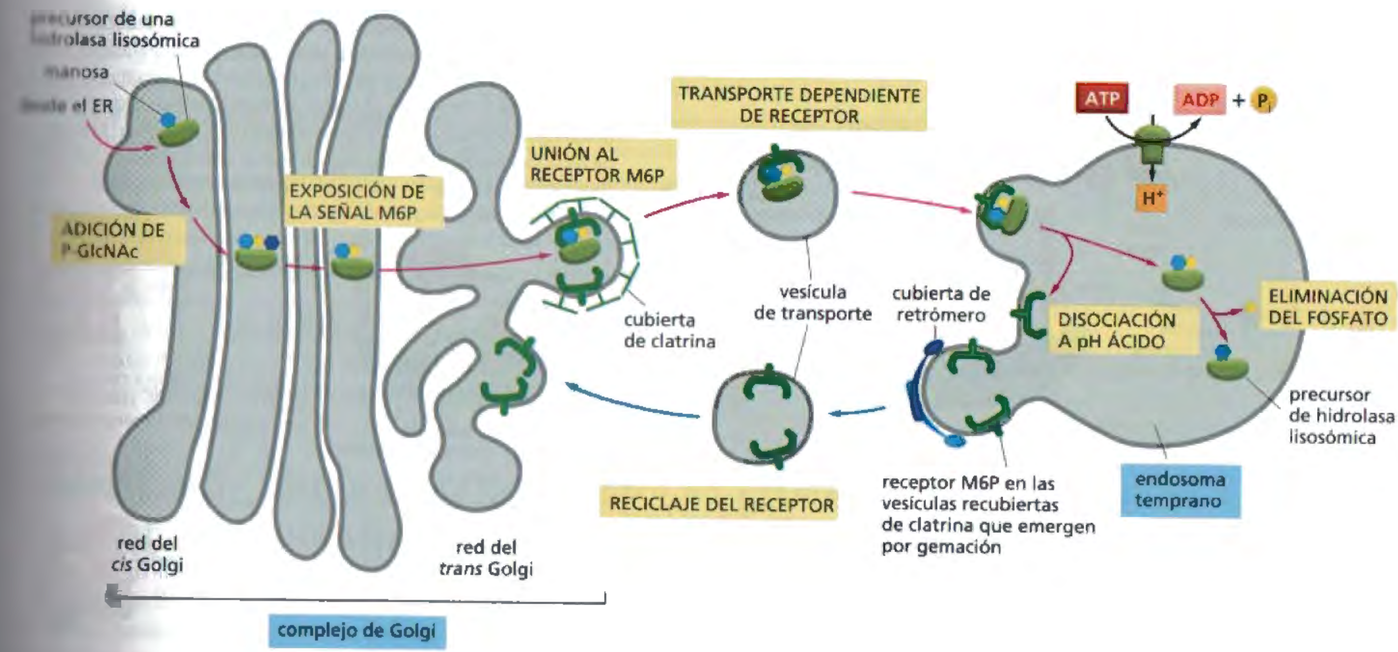


Figura 13–44 Transporte a los lisosomas de las hidrolasas lisosómicas recién sintetizadas. La acción secuencial de dos enzimas en las redes del *cis* y del *trans* Golgi añade grupos manosa 6-fosfato (M6P) a los precursores de las enzimas lisosómicas (véase Figura 13–45). Son separadas de todas las demás proteínas en el TGN porque unas proteínas adaptadoras monoméricas de la cubierta de clatrina se unen a los receptores de M6P que a su vez reconocen y unen a las hidrolasas ácidas lisosómicas modificadas. Las vesículas recubiertas de clatrina formadas en el TGN pierden su cubierta y se fusionan con los endosomas tempranos. Al bajo pH de los endosomas tardíos, las hidrolasas se disocian de los receptores de M6P; los receptores vacíos son reciclados en vesículas recubiertas de retrómero hasta el complejo de Golgi, para rondas posteriores de transporte. En los endosomas, el fosfato es eliminado de los residuos de manosa unidos a las hidrolasas con el fin de asegurar que las hidrolasas no vuelvan al complejo de Golgi con el receptor.

Una región señal en la cadena polipeptídica proporciona la clave para la unión de M6P

El sistema de clasificación que segrega las hidrolasas lisosómicas y las dirige hacia los endosomas tardíos funciona porque en el complejo de Golgi sólo se añaden grupos de manosa 6-fosfato a las glucoproteínas adecuadas. Este marcaje específico requiere un reconocimiento también específico de las hidrolasas por la enzima del Golgi responsable de añadir los grupos M6P. Dado que todas las glucoproteínas abandonan el ER con las cadenas de *N*-oligosacáridos idénticas, la señal para añadir las unidades de M6P a los oligosacáridos tiene que residir en alguna parte de la cadena polipeptídica de cada hidrolasa. Experimentos de ingeniería genética han mostrado que la señal de reconocimiento es un grupo de aminoácidos vecinos sobre la superficie de cada proteína que forman una *región señal*.

La adición de grupos de M6P a las hidrolasas lisosómicas está catalizada por dos enzimas que actúan de manera secuencial. La primera es una Glc-NAc fosfotransferasa en el *cis* Golgi que une específicamente la hidrolasa y añade GlcNAc-fosfato a uno o dos de los residuos manosa de cada cadena de oligosacárido (**Figura 13–45**). Entonces una segunda enzima en el *trans* Golgi elimina el residuo GlcNAc, dejando un marcador M6P, acabado de generar. Como muchas hidrolosas lisosomales contienen múltiples oligosacáridos, adquieren muchos residuos MGP y proporcionan una señal de alta afinidad para el receptor de MGP.

En humanos, los defectos en la GlcNAc fosfotransferasa causan una enfermedad de acumulación lisosómica

Defectos genéticos que afectan a una o más de las hidrolasas lisosómicas son la causa de una serie de **enfermedades de almacenamiento lisosómico** en la especie humana. Estos defectos provocan una acumulación en los lisosomas de sus sustratos no digeridos. Esta acumulación tiene consecuencias patológicas profundas, frecuentemente en el sistema nervioso. En la mayoría de los casos se producen como consecuencia de una mutación en un gen estructural que codifica una hidrolasa lisosómica. Este es el caso de la *enfermedad de Hurler*, en la que la enzima necesaria para la rotura de cierto tipo de cadenas de glucosaminoglicano es defectuosa o está ausente. La forma más grave de enfermedad de acumulación lisosómica es una alteración muy poco frecuente denominada *enfermedad de inclusión celular* (*enfermedad celular-I*). En esta situación, la mayoría de las enzimas hidrolíticas han desaparecido de los lisosomas de los fibroblastos y sus sustratos no digeridos se acumulan formando grandes *inclusiones* en las células de los pacientes.

La enfermedad celular-I es debida a un solo defecto génico que, como en el caso de la mayoría de las deficiencias genéticas, es recesivo, es decir, sólo presentan la enfermedad los

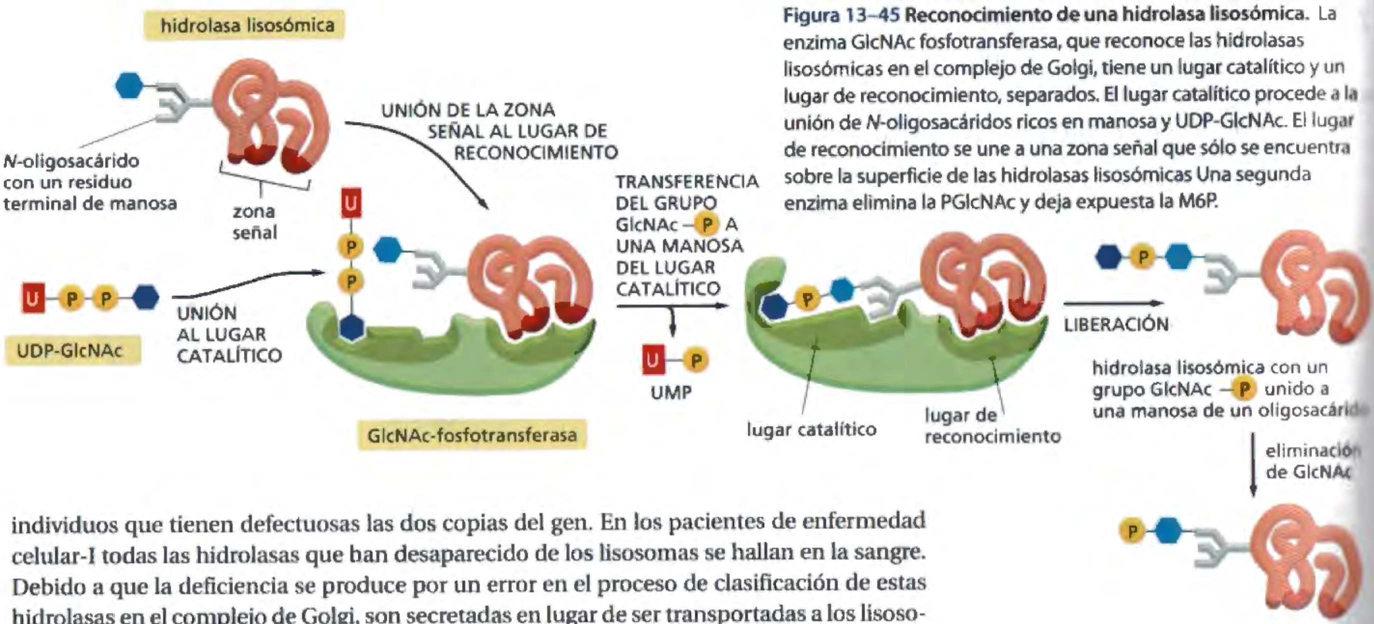


Figura 13-45 Reconocimiento de una hidrolasa lisosómica. La enzima GlcNAc fosfotransferasa, que reconoce las hidrolasas lisosómicas en el complejo de Golgi, tiene un lugar catalítico y un lugar de reconocimiento, separados. El lugar catalítico procede a la unión de *N*-oligosacáridos ricos en manosa y UDP-GlcNAc. El lugar de reconocimiento se une a una zona señal que sólo se encuentra sobre la superficie de las hidrolasas lisosómicas Una segunda enzima elimina la PGlcNAc y deja expuesta la M6P.

individuos que tienen defectuosas las dos copias del gen. En los pacientes de enfermedad celular-I todas las hidrolasas que han desaparecido de los lisosomas se hallan en la sangre. Debido a que la deficiencia se produce por un error en el proceso de clasificación de estas hidrolasas en el complejo de Golgi, son secretadas en lugar de ser transportadas a los lisosomas. Este error de clasificación es debido a una GlcNAc-fosfotransferasa defectuosa o ausente. En este caso, las enzimas lisosómicas no son fosforiladas en la red del *cis* Golgi, por lo que los receptores M6P no las reconocen ni clasifican en las vesículas de transporte apropiadas en el TGN. Por el contrario, las hidrolasas lisosómicas son transportadas a la superficie celular y son secretadas por la ruta por defecto.

En la enfermedad celular-I, los lisosomas de algunos tipos celulares, como los hepatocitos, contienen una dotación normal de enzimas lisosómicas. Este hecho implica que tiene que existir otra vía para dirigir las hidrolasas a los lisosomas, la cual se utiliza en algunos tipos celulares pero no en otros. Se desconoce la naturaleza de esta vía independiente de M6P. De manera similar, una ruta independiente de M6P presente en todas las células selecciona las proteínas de la membrana lisosómica desde el TGN para su transporte hacia los endosomas tardíos, por lo que su distribución es normal en la enfermedad celular-I. Estas proteínas de membrana salen del TGN en vesículas recubiertas de clatrina que son diferentes de aquellas que transportan las hidrolasas ácidas con señal M6P y emplean diferentes proteínas adaptadoras.

Todavía se desconoce por qué las células necesitan más de una vía de clasificación para construir lisosomas, aunque quizá no sea sorprendente que en proteínas solubles y unidas a membrana actúen mecanismos diferentes, en especial porque –con la excepción de los receptores de M6P– estas proteínas de membrana son residentes en el lisosoma y no es necesario devolverlas al TGN.

Algunos lisosomas son exocitados

El direccionamiento de material a los lisosomas no es necesariamente el final de la ruta. La *secreción lisosómica* de su contenido no digerido permite a la célula eliminar los restos no digeribles. En la mayoría de las células esta vía parece ser menor y sólo se utiliza cuando las células están estresadas. Pero algunos tipos celulares contienen lisosomas especializados que han adquirido la maquinaria para la fusión con la membrana plasmática. Por ejemplo, los *melanocitos* de la piel producen y almacenan pigmentos en sus lisosomas. Estos *melanosomas* rellenos de pigmento lo liberan al espacio extracelular de la epidermis mediante exocitosis. Entonces, el pigmento es captado por los queratinocitos, que confieren a la piel la pigmentación normal. En algunos trastornos genéticos, defectos en la exocitosis de los melanosomas bloquean este proceso de transporte, lo que provoca el albinismo.

Resumen

Los lisosomas están especializados en la digestión intracelular. Contienen proteínas de membrana características y una amplia variedad de enzimas hidrolíticas solubles que trabajan mejor a pH 5. Una bomba de ATP de su membrana, que impulsa protones, mantiene el pH bajo. Las proteínas li-

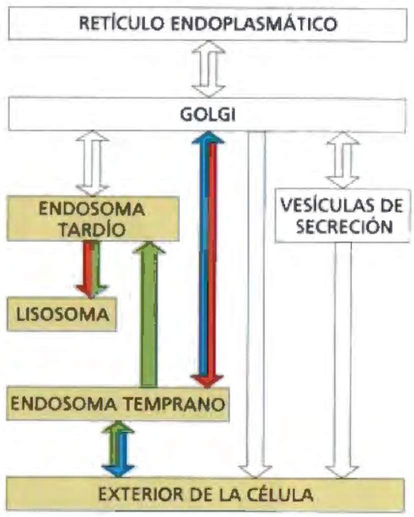
lisosómicas recién sintetizadas son transferidas al lumen del ER, son transportadas a través del complejo de Golgi y luego conducidas por medio de vesículas de transporte desde la red del trans *Golgi a los endosomas tardíos mediante vesículas de transporte recubiertas de clatrina.*

Las hidrolasas lisosómicas contienen N*-oligosacáridos que son modificados covalentemente de una forma característica en la red del* cis *Golgi, de manera que sus residuos de manosa son fosforilados. Estos grupos de manosa 6-fosfato (M6P) son reconocidos por un receptor de la red del* trans *Golgi, el cual separa las hidrolasas del resto de las moléculas y ayuda a empaquetarlas en el interior de vesículas de transporte que descargan su contenido en los endosomas. El receptor M6P oscila, hacia adelante y hacia atrás, entre la red del* trans *Golgi y estos endosomas. El bajo pH de los endosomas y la eliminación del grupo fosfato de la M6P facilitan la disociación de las hidrolasas lisosómicas de estos receptores y dirigen el transporte de las hidrolasas en un solo sentido. Un sistema de transporte diferente utiliza vesículas de transporte recubiertas de clatrina para transportar proteínas de membrana residentes en los lisosomas desde la red del* trans *Golgi.*

TRANSPORTE HACIA EL INTERIOR DE LA CÉLULA DESDE LA MEMBRANA PLASMÁTICA: ENDOCITOSIS

Las rutas que llevan hacia los lisosomas desde la superficie celular empiezan con la **endocitosis**, mediante la cual las células captan macromoléculas, sustancias particuladas y, en casos especiales, otras células. En este proceso, el material que va a ser ingerido es rodeado progresivamente por una pequeña porción de la membrana plasmática, que primero se invagina y luego se estrangula formando una *vesícula endocítica* que contiene el material o partícula ingerida. Se pueden distinguir dos tipos de endocitosis en función del tamaño de las vesículas que se forman. En la *fagocitosis* ("comida de la célula"), se ingieren partículas grandes mediante grandes vesículas llamadas *fagosomas* (generalmente de un diámetro >250 nm). En la *pinocitosis* ("bebida de la célula"), se ingieren fluido y solutos vía pequeñas *vesículas pinocíticas* (de aproximadamente 100 nm de diámetro). La mayoría de las células eucariotas ingieren continuamente fluidos y solutos por pinocitosis; las grandes partículas son ingeridas con más eficacia por células fagocíticas especializadas.

Algunas células fagocíticas especializadas pueden ingerir grandes partículas



La **fagocitosis** es una forma especial de endocitosis en la que una célula utiliza grandes vesículas endocíticas denominadas **fagosomas** para ingerir grandes partículas, tales como microorganismos y células muertas. <TCAT> En los protozoos, la fagocitosis constituye un sistema de alimentación: las grandes partículas atrapadas en los fagosomas acaban en los lisosomas y los productos de los procesos digestivos posteriores pasan al citoplasma donde son utilizados como alimento. Sin embargo, en los organismos pluricelulares son pocas las células capaces de ingerir grandes partículas de forma eficiente. Por ejemplo, en el intestino de los animales las partículas de alimento son digeridas mediante procesos que se realizan fuera de las células y éstas importan los productos de hidrólisis de pequeño tamaño.

En la mayoría de los animales, la fagocitosis es importante con finalidades diferentes a la de la nutrición y la llevan a cabo principalmente células especializadas: las denominadas *fagocitos profesionales*. En los mamíferos actúan como fagocitos profesionales dos tipos de glóbulos blancos: los **macrófagos** y los **neutrófilos**. Estas células, que se desarrollan a partir de células madre hematopoyéticas (descritas en el Capítulo 23), ingieren microorganismos invasores defendiéndonos de las infecciones. Los macrófagos también desempeñan un importante papel al recoger a las células moribundas y a las que han muerto por apoptosis (descrita en el Capítulo 18). En términos cuantitativos, la eliminación de células senescentes y muertas es de lejos la función más importante. Por ejemplo, los macrófagos fagocitan más de 10^{11} de eritrocitos viejos a diario en cada uno de nosotros.

Mientras que las vesículas endocíticas implicadas en la pinocitosis son pequeñas y uniformes, los fagosomas tienen un diámetro que está determinado por el tipo de partícula que ingieren y pueden llegar a ser tan grandes como la propia célula fagocítica (Figura 13–46). Los fagosomas se fusionan con los lisosomas dentro de la célula; entonces, el material ingerido es degradado. Cualquier sustancia no digerible permanecerá en el interior de los lisosomas y formará *cuerpos residuales* que pueden ser excretados de las cé-

lulas mediante exocitosis, como hemos descrito. Algunos de los componentes de la membrana plasmática internalizada nunca alcanzan el lisosoma porque son recuperados del fagosoma mediante vesículas de transporte y son devueltos a la membrana plasmática.

Para que una partícula sea fagocitada, primero debe unirse a la superficie del fagocito. Sin embargo, no se ingieren todas las partículas que se unen. Los fagocitos tienen toda una gama de receptores de superficie especializados que se encuentran unidos funcionalmente a la maquinaria fagocítica de la célula. La fagocitosis es un proceso regulado. Es decir, para que se inicie la respuesta hace falta que los receptores activados transmitan la señal al interior de la célula. Por el contrario, la pinocitosis es un proceso constitutivo. Se produce de forma constante con independencia de las necesidades de la célula. Los agentes desencadenantes de la fagocitosis mejor caracterizados son los anticuerpos, que nos protegen contra los microorganismos infecciosos uniéndose a su superficie y formando una cubierta en la que la región de las colas de los anticuerpos se hallan expuestas al exterior. Esta región de la cola es el denominado fragmento Fc (descrito en el Capítulo 25). La cubierta de anticuerpos es reconocida entonces por los *receptores Fc* de la superficie de los macrófagos y de los neutrófilos; la unión induce a la célula fagocítica a extender pseudópodos que rodean la partícula y se fusionan por sus extremos para formar el fagosoma (**Figura 13–47**A). La polimerización local de actina iniciada por GTPasas de la familia Rho y por sus activadores Rho-GEF (descritos en los Capítulos 15 y 16) da forma a los pseudópodos. Una GTPasa de Rho activa provoca la activación de las PI quinasa locales y se inicia la polimerización local de actina como respuesta a una acumulación local de $PI(4,5)P_2$ en la membrana (véase Figura 13–11). Para cerrar el fagosoma y completar el proceso de engullimiento, la actina se despolimeriza en respuesta a una reducción de $PI(4,5)P_2$ que es fosforilado por acción de una PI 3-quinasa, la cual lo convierte en $PI(3,4,5)P_3$. Este compuesto es necesario para que pueda cerrarse el fagosoma y podría también dar una nueva forma a la red de actina que facilita la invaginación del fagosoma en formación (Figura 13–47B). Así la síntesis y degradación de fosfoinositoles regula las etapas secuenciales de la formación del fagosoma.

Se han caracterizado algunas otras clases de receptores que provocan fagocitosis. Algunos reconocen componentes del *complemento*, que colaboran con los anticuerpos marcando a los microorganismos para su destrucción (descrito en el Capítulo 24). Otros reconocen directamente células que han muerto por apoptosis. Las células apoptóticas pierden la característica distribución de fosfolípidos en su membrana plasmática. Como consecuencia de ello, la fosfatidilserina cargada negativamente que por lo general se encuentra confinada a la cara citosólica de la bicapa lipídica se expone en el exterior de la célula, donde activa la fagocitosis de la célula muerta.

Sorprendentemente los macrófagos fagocitan una serie de partículas inanimadas –como cristal, bolas de vidrio o látex y fibras de asbesto– mientras que no fagocitan células ani-

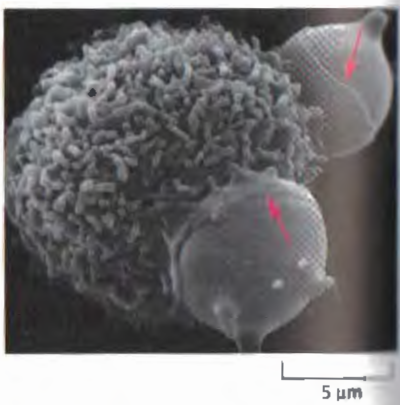


Figura 13–46 Fagocitosis por un macrófago. Electromicrografía de barrido de un macrófago de ratón que está fagocitando dos eritrocitos modificados químicamente. Las *flechas rojas* indican los bordes de las finas extensiones (pseudópodos) del macrófago que se proyectan a modo de collares engullendo los eritrocitos. (Cortesía de Jean Paul Revel.)

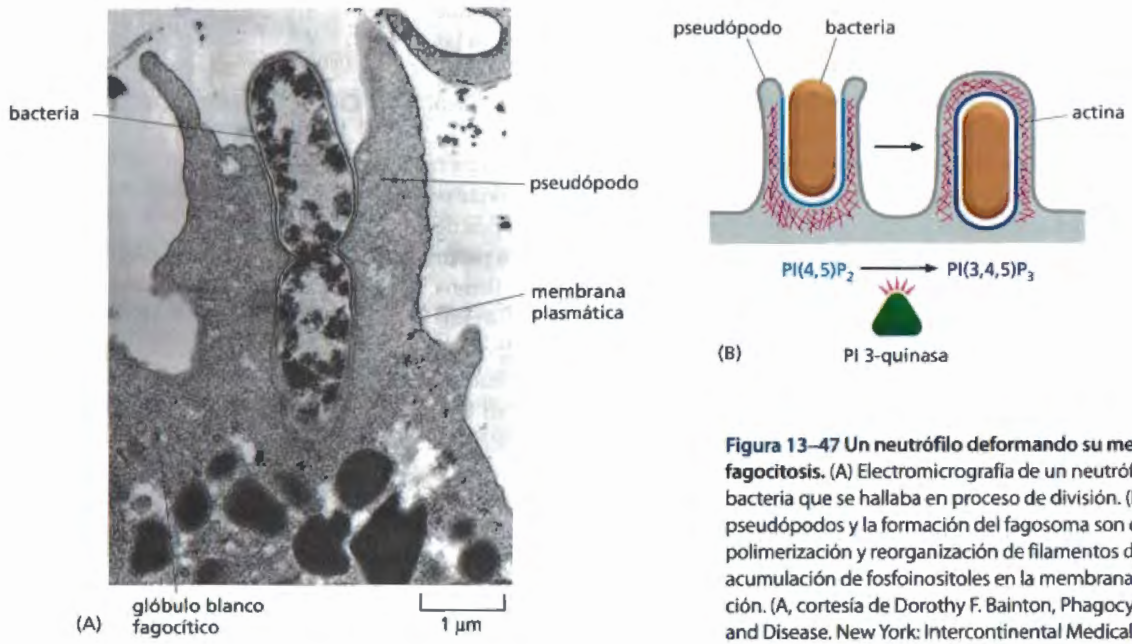


Figura 13–47 Un neutrófilo deformando su membrana durante la fagocitosis. (A) Electromicrografía de un neutrófilo fagocitando una bacteria que se hallaba en proceso de división. (B) La extensión de pseudópodos y la formación del fagosoma son consecuencia de la polimerización y reorganización de filamentos de actina en respuesta a la acumulación de fosfoinositoles en la membrana del fagosoma en formación. (A, cortesía de Dorothy F. Bainton, Phagocytic Mechanism in Health and Disease. New York: Intercontinental Medical Book Corporation, 1971.)

males vivas. Parece que las células vivas muestran señales de "no me comas" en forma de proteínas de superficie celular que se unen a receptores de inhibición en la superficie de los macrófagos. Los receptores inhibidores reclutan tirosina fosfatasas que antagonizan los procesos de señalización intracelular que son necesarios para iniciar la fagocitosis, inhibiendo de forma local el proceso fagocítico. Así pues, la fagocitosis, como muchos otros procesos celulares, es la consecuencia de un equilibrio entre señales positivas que activan el proceso y señales negativas que lo inhiben. Se cree que en las células apoptóticas ocurre tanto una aparición de señales de "cómeme" (como la presencia en la superficie extracelular de fosfatidilserina) como la pérdida de señales de "no me comas", lo que provoca que sean rápidamente fagocitadas por los macrófagos.

Las vesículas de pinocitosis se forman en la membrana plasmática a partir de depresiones revestidas

Casi todas la células eucariotas ingieren continuamente zonas de su membrana plasmática en forma de pequeñas vesículas pinocíticas (endocíticas) que posteriormente retornan a la superficie de la célula. La velocidad a la que se internaliza la membrana plasmática en este proceso de **pinocitosis** varía de un tipo celular a otro, pero es bastante elevada. Por ejemplo, un macrófago ingiere cada hora una cantidad de fluido igual al 25% de su propio volumen. Esto significa que cada minuto debe ingerir un 3% de su membrana plasmática, es decir, un 100% en media hora. Los fibroblastos presentan una velocidad menor (1% de su membrana plasmática por minuto), mientras que algunas amebas ingieren la membrana plasmática todavía más rápidamente. Dado que el área de la superficie y el volumen celular no varían durante este proceso, está claro que toda la membrana que es eliminada por endocitosis debe ir añadiéndose por el proceso complementario de *exocitosis*. En este sentido, endocitosis y exocitosis son procesos ligados que se puede considerar que constituyen un *ciclo endocítico-exocítico*. El acoplamiento entre la exocitosis y la endocitosis es especialmente estricto en estructuras que se caracterizan por el recambio rápido de membrana como es el caso de la sinapsis neuronal.

Por lo general, la parte endocítica de este ciclo empieza en regiones especializadas de la membrana plasmática llamadas **depresiones recubiertas de clatrina** que ocupan alrededor de un 2% del área total de la membrana plasmática. La vida media de las depresiones revestidas de clatrina es corta: un minuto después de haber sido formadas, se invaginan hacia el interior de la célula y se separan de la membrana formando las vesículas revestidas de clatrina (**Figura 13–48**). En fibroblastos aislados, se ha estimado que aproximadamente cada minuto 2500 vesículas revestidas de clatrina abandonan la membrana plasmática. Estas vesículas revestidas son más transitorias incluso que las depresiones revestidas: segundos más tarde de ser formadas, se despojan de su revestimiento siendo así capaces de fusionarse con los endosomas tempranos. Dado que las depresiones revestidas de clatrina están llenas de fluido extracelular, cuando se invaginan formando vesículas revestidas también se internalizan las sustancias disueltas en el fluido extracelular: un proceso denominado *endocitosis de fase fluida*.

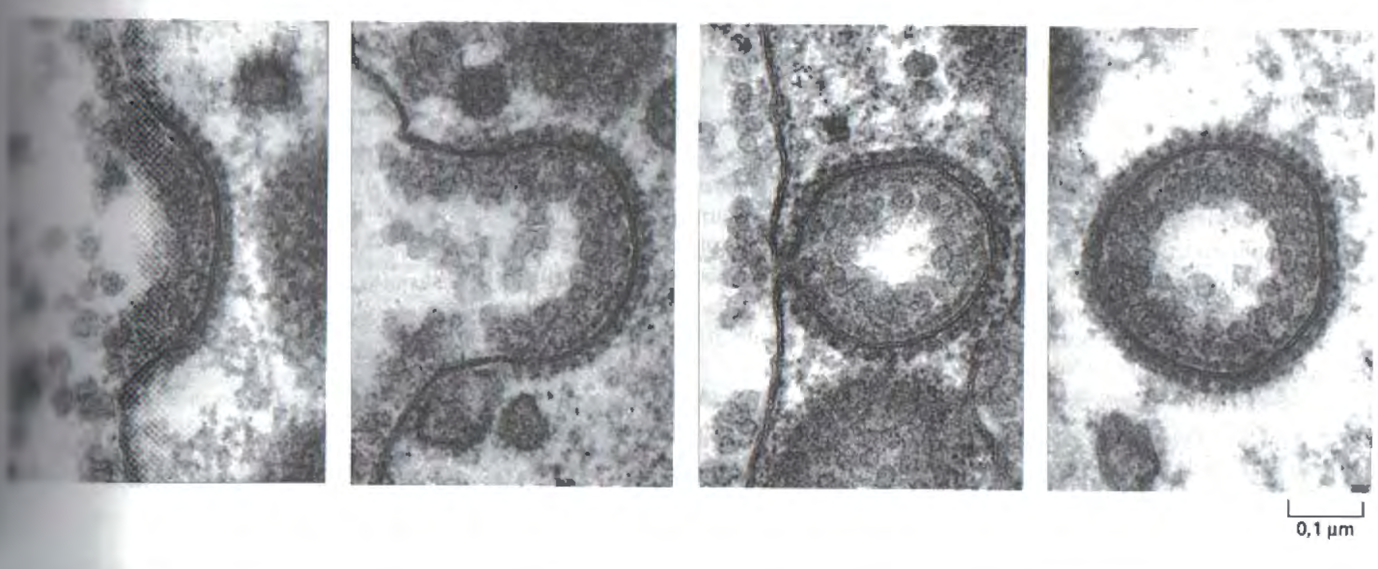


Figura 13–48 Formación de vesículas recubiertas de clatrina en la membrana plasmática. Estas electromicrografías ilustran la secuencia probable de acontecimientos que se producen durante la formación de una vesícula recubierta de clatrina a partir de una depresión revestida de clatrina. Las depresiones y las vesículas revestidas que aparecen en las fotografías son mucho mayores que las que se presentan en las células de tamaño normal. Intervienen en la captación de lipoproteínas en un gran oocito de gallina y forman la yema del huevo. En la superficie extracelular de la membrana plasmática –que se corresponde con la superficie interior de la vesícula– puede verse una capa electrodensa que corresponde a las lipoproteínas asociadas a sus receptores. (Cortesía de M.M. Perry y A.B. Gilbert, de *J. Cell Sci.* 39:257-272, 1979. Con el permiso de The Company of Biologists.)

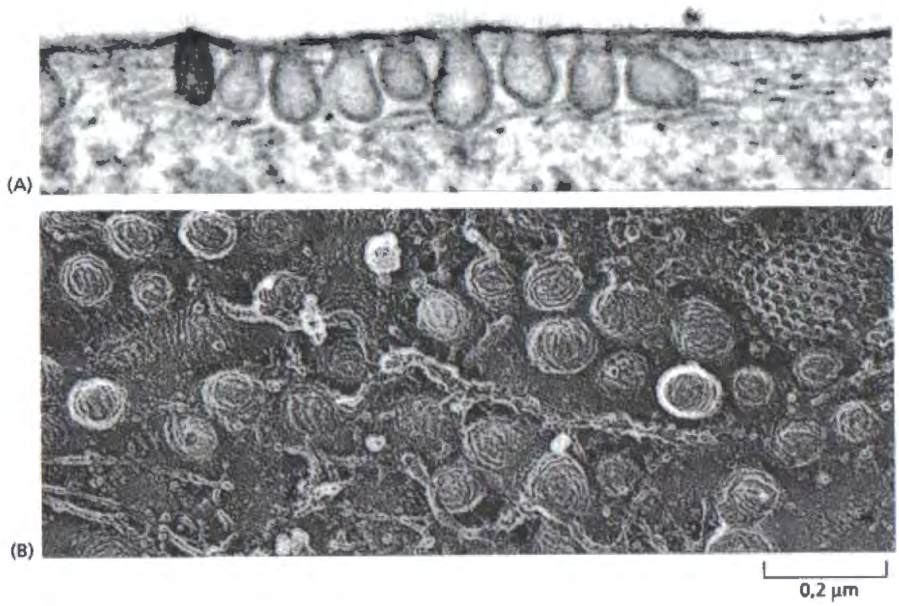


Figura 13–49 Caveolas situadas en la membrana plasmática de un fibroblasto. (A) Esta electromicrografía muestra una membrana plasmática con una gran densidad de caveolas. Obsérvese que no se distingue ninguna cubierta citosólica. (B) Esta imagen de grabado por congelación muestra la textura de "coliflor" de la cara citosólica de la membrana de las caveolas. Parece que la textura regular es debida a los agregados de caveolina en la membrana. En la esquina superior derecha puede observarse una depresión recubierta de clatrina. (Cortesía de R.G.W. Anderson, de K.G. Rothberg et al., *Cell* 68:673-682, 1992. Con el permiso de Elsevier.)

No todas las vesículas pinocíticas están recubiertas de clatrina

Además de las depresiones recubiertas de clatrina y de las vesículas, existen mecanismos mediante los cuales las células pueden formar vesículas de pinocitosis, aunque son menos conocidos. Una de estas vías se inicia en las **caveolas** (en latín "pequeñas cavidades"), reconocidas originalmente por su capacidad para transportar moléculas a través de las células endoteliales, que forman la superficie interna de los vasos sanguíneos. Las caveolas están presentes en la membrana plasmática de la mayoría de los tipos celulares y en algunos de ellos mediante microscopía electrónica se observan como invaginaciones pronunciadas (**Figura 13–49**). Se cree que se forman a partir de las denominadas *balsas lipídicas* o "*lipid-raft*" que son regiones de membrana plasmática especialmente ricas en colesterol, glucoesfingolípidos y proteínas unidas a la membrana de tipo GPI (véase Figura 10–14). La proteína estructural mayoritaria de las caveolas son las **caveolinas**, una familia de proteínas integrales de membrana con una estructura poco frecuente, en las que la cadena polipeptídica se inserta en forma de bucle en la membrana por la cara citosólica sin llegar a cruzar la membrana.

A diferencia de las vesículas recubiertas de clatrina, de COPI y de COPII, se cree que las caveolas son capaces de invaginarse y concentrar proteínas de transporte gracias a la composición lipídica de la membrana caveolar, más que por el ensamblaje de proteínas de cubierta citosólicas. Las caveolinas pueden estabilizar las balsas lipídicas, que se encuentran enriquecidas en ciertas proteínas de membrana. Las caveolas se separan de la membrana gracias a la dinamina y liberan su contenido en un compartimiento similar a los endosomas (denominado *caveosoma*) o, en una célula polarizada, en la membrana plasmática de la membrana opuesta (en un proceso denominado *transcitosis* que se describe más adelante). Dado que las caveolinas son proteínas integrales de membrana no se separan de las vesículas después de la endocitosis y son transportadas a los compartimientos diana en los que se mantienen asociadas a dominios discretos de membrana. Algunos virus animales como SV40 y papilomavirus (que producen verrugas) entran en las células en vesículas derivadas de caveolas. Los virus son transportados en primer lugar al caveosoma, desde donde se desplazan en vesículas de transporte especializadas al ER. El genoma viral sale del ER través de su membrana y alcanza el citosol desde donde es importado al núcleo iniciando el ciclo de infección.

Las vesículas endocíticas también pueden formarse a partir de balsas libres de caveolina y entregar su carga a los caveosomas. Las moléculas endocitadas a través de caveolas evitan el paso a través de endosomas y lisosomas y, por tanto, están protegidas de la exposición a un pH bajo y a las hidrolasas ácidas; se desconoce cómo son transportadas desde el caveosoma a otros destinos en la célula.

Las células utilizan la endocitosis mediada por receptor para importar macromoléculas extracelulares seleccionadas

En la mayoría de células animales, las depresiones y las vesículas revestidas de clatrina constituyen una ruta eficiente para captar determinadas macromoléculas del fluido extracelular. En este proceso, denominado **endocitosis mediada por receptor**, las macromoléculas se unen a receptores transmembrana complementarios de la superficie celular, se acumulan en depresiones revestidas y entran en la célula en forma de complejos receptor-macromolécula en vesículas recubiertas de clatrina (véase Figura 13–48). Dado que los ligandos son capturados selectivamente por los receptores, la endocitosis mediada por receptor proporciona un mecanismo de concentración selectivo que incrementa más de cien veces la eficiencia de la internalización de determinados ligandos. De esta forma, incluso componentes minoritarios del fluido extracelular se pueden captar de forma específica y en grandes cantidades sin internalizar un gran volumen de fluido extracelular. Un ejemplo bien conocido y fisiológicamente importante es el proceso mediante el cual las células de los mamíferos suelen captar el colesterol.

Muchas células animales captan colesterol por endocitosis mediada por receptor y así adquieren la mayor parte del colesterol que necesitan para la síntesis de las membranas. Si esta ingestión se bloquea, el colesterol se acumula en la sangre y puede contribuir a la formación en las paredes de los vasos sanguíneos (arterias) de *placas ateroscleróticas*, depósitos de lípidos y de tejido fibroso que causan apoplejías y ataques cardíacos al impedir la circulación sanguínea arterial. De hecho, fue un estudio de humanos con una alta predisposición genética a la *aterosclerosis* el que permitió identificar por primera vez el mecanismo de endocitosis mediada por receptor.

La mayor parte del colesterol se transporta en la sangre unido a proteínas, formando unas partículas conocidas como **lipoproteínas de baja densidad** (**LDL:** ***low-density lipoprotein***) (**Figura 13–50**). Cuando la célula necesita colesterol para la síntesis de membranas, produce proteínas receptoras de LDL y las inserta en su membrana plasmática. Una vez en la membrana, los *receptores de LDL* difunden hasta asociarse con depresiones revestidas de clatrina que se hallan en proceso de formación (**Figura 13–51**A). Dado que las depresiones revestidas se separan constantemente de la membrana formando vesículas revestidas, cualquier partícula de LDL que se halle unida a los receptores en las depresiones revestidas es internalizada con rapidez. Después de desprenderse de su cubierta de clatrina, las vesículas de endocitosis liberan su contenido en los endosomas tempranos, que se encuentran cerca de la periferia celular. Una vez que las LDL y los receptores LDL se encuentran al pH bajo de los endosomas, las LDL se separan de su receptor y son transportadas, vía endosomas tardíos, a los lisosomas. En estos orgánulos, los ésteres de colesterol de las partículas LDL son hidrolizados dando lugar a colesterol libre, que de esta forma queda a disposición de la célula para la biosíntesis de membrana. Si se acumula demasiado colesterol libre en la célula, ésta detiene tanto la síntesis de colesterol como la síntesis de receptores de LDL, con lo que la célula produce y absorbe menos colesterol.

Esta vía regulada para la absorción del colesterol está perturbada en algunos individuos que heredan unos genes defectuosos para la producción de receptores de LDL. Los niveles

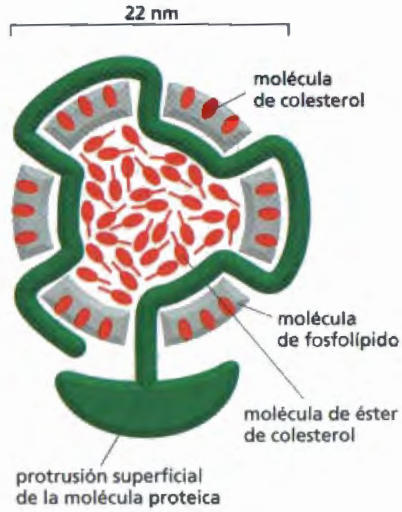


Figura 13–50 Esquema de una partícula de lipoproteína de baja densidad (LDL: *low density lipoprotein*). Cada partícula esférica tiene una masa de 3×10^6 daltons y un núcleo de alrededor de 1500 moléculas de ésteres de colesterol esterificado con ácidos grasos de cadena larga. Una monocapa lipídica formada por unas 800 moléculas de fosfolípido y unas 500 moléculas de colesterol no esterificado rodea el núcleo de ésteres de colesterol. Una única molécula de proteína, de unos 500.000 daltons, organiza la partícula y es la responsable de la unión específica de las LDL a los receptores LDL de la superficie de las células.

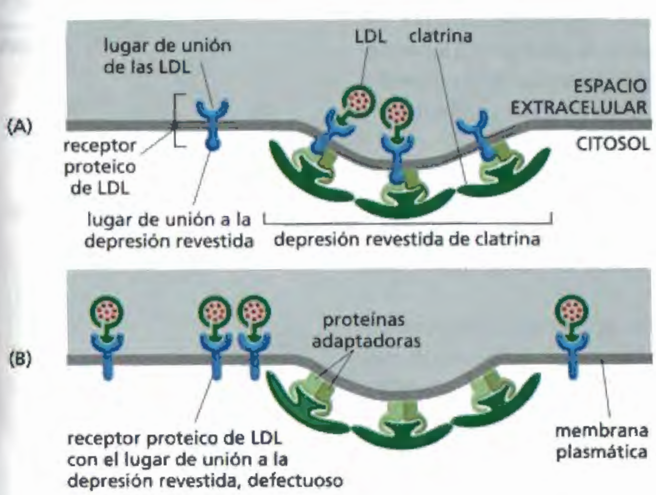


Figura 13–51 Receptores normales y mutantes de LDL. (A) Proteínas receptoras de LDL unidas a una depresión revestida de la membrana plasmática de una célula normal. El receptor humano de LDL es una glucoproteína transmembrana de paso único compuesta por unos 840 residuos de aminoácido, de los cuales únicamente 50 se hallan en el lado citoplasmático de la membrana. (B) Célula mutante en la que las proteínas receptoras de LDL son anormales porque carecen del dominio citoplasmático que les permite unirse a las proteínas adaptadoras en las depresiones recubiertas de clatrina. Estas células unen LDL pero no pueden ingerirlo. En la mayoría de las poblaciones humanas, uno de cada 500 individuos tiene alterado uno de los genes que codifica los receptores de LD y, como consecuencia de ello, tiene una elevada probabilidad de morir prematuramente de un ataque cardíaco debido a aterosclerosis.

elevados de colesterol en sangre resultantes predisponen a estos individuos a una aterosclerosis prematura y muchos de ellos pueden morir a una edad temprana de un ataque cardíaco como consecuencia de alteraciones de las arterias coronarias si no son tratados con fármacos que reduzcan sus niveles de colesterol sanguíneo. En algunos casos, las células no tienen receptor. En otros, los receptores son defectuosos –bien en su lugar de unión extracelular para las LDL o bien en el lugar de unión intracelular que fija el receptor al recubrimiento de las depresiones revestidas con clatrina (véase Figura 13–51B). En este último caso, el número de receptores LDL es normal, pero no pueden localizarse en las depresiones revestidas de clatrina de la membrana plasmática. Aunque las LDL se unen a la superficie de estas células mutantes, no se incorporan a la célula. Este hecho demuestra directamente la importancia que tienen las depresiones revestidas de clatrina para la endocitosis mediada por receptor del colesterol.

Se han descrito más de 25 receptores diferentes que participan en la endocitosis mediada por receptor de diferentes tipos de moléculas. Aparentemente todos ellos utilizan la ruta de internalización dependiente de clatrina y se concentran en vesículas recubiertas de clatrina gracias a señales presentes en sus colas citoplasmáticas que se unen a las proteínas adaptadoras de la cubierta de clatrina. Muchos de estos receptores, como el receptor de las LDL, entran en las depresiones revestidas con independencia de si se han unido o no a sus ligandos específicos. Otros entran sobre todo cuando se han unido a su ligando específico, lo cual sugiere que es necesario un cambio conformacional inducido por el ligando para llegar a las depresiones. No obstante, no todas las proteínas de la membrana plasmática se acumulan en depresiones revestidas de clatrina, lo cual indica que estas depresiones actúan como filtros moleculares recogiendo ciertas proteínas de la membrana plasmática (receptores) y excluyendo a otras.

Estudios de microscopía electrónica de células en cultivo expuestas de forma simultánea a diferentes ligandos marcados han demostrado que en una misma depresión recubierta pueden agruparse muchos tipos de receptores diferentes, mientras que otros receptores sólo se concentran en depresiones revestidas de clatrina diferentes. La membrana plasmática de una depresión recubierta de clatrina puede acumular unos 1000 receptores de varias clases. Aunque parece que todos los complejos receptor-ligando que utilizan esta ruta endocítica terminan en el mismo compartimiento endosómico, el destino posterior de las moléculas endocitadas varía, como se explica a continuación.

El material endocitado que no es recuperado por los endosomas termina en los lisosomas

El compartimiento endosómico de una célula puede ser complejo. Puede ser reconocido al microscopio electrónico añadiendo al medio extracelular una molécula fácilmente detectable, como la enzima peroxidasa, y permitiendo que las células la capten por endocitosis a diferentes tiempos. La distribución de la molécula después de ser captada revela que el compartimiento endosómico es como una serie de túbulos heterogéneos rodeados de membrana y vesículas que se distribuyen desde la periferia de la célula hasta la región perinuclear, donde a menudo se pueden observar cerca del complejo de Golgi. Mediante estos experimentos de marcaje pueden distinguirse con rapidez dos tipos de endosomas. Las moléculas trazadoras aparecen en un minuto en los **endosomas tempranos**, justo por debajo de la membrana plasmática. Después de entre 5 y 15 minutos, se desplazan a los **endosomas tardíos**, cerca del complejo de Golgi y del núcleo. Los endosomas tempranos y tardíos difieren en su composición proteica. Por ejemplo, la transición de endosoma temprano a tardío se acompaña de la liberación de Rab5 y la unión de Rab7.

Como ya mencionamos, la presencia en la membrana del endosoma de una ATPasa vacular, que bombea H^+ desde el citosol hacia el endosoma, mantiene ácido el lumen del compartimiento endosómico (pH ~6,0). En general, los endosomas tardíos son más ácidos que los tempranos. Este gradiente de ambientes ácidos desempeña un papel crucial en la función de estos orgánulos.

Los materiales endocitados se mezclan en los endosomas tempranos con hidrolasas lisosómicas recién sintetizadas y es probable que acaben en los lisosomas. No obstante, muchas moléculas se salvan específicamente de su destrucción. Son recicladas desde los endosomas tempranos hacia la membrana plasmática mediante vesículas de transporte. Sólo las moléculas que no son recuperadas a los endosomas son entregadas a los lisosomas para su degradación. Aunque en los endosomas tempranos se puede iniciar una primera di-

gestión suave, muchas hidrolasas son sintetizadas y entregadas en forma de proenzimas, denominadas *zimógenos*, que presentan dominios inhibidores extra en su extremo *N*-terminal que mantienen a la hidrolasa inactiva hasta que dicho dominio es eliminado por proteolisis. Las hidrolasas son activadas cuando los endosomas tardíos se convierten en endolisosomas como consecuencia de la fusión con lisosomas preexistentes que contienen la dotación completa de hidrolasas ácidas y que digieren los dominios inhibidores de las enzimas de nueva síntesis. Además, el pH de los endosomas tempranos no es suficientemente bajo para activar a las hidrolasas ácidas de manera óptima. Son estas razones las que explican cómo la célula puede recuperar la mayoría de las proteínas de membrana desde los endosomas tempranos reciclándolas hacia la membrana plasmática.

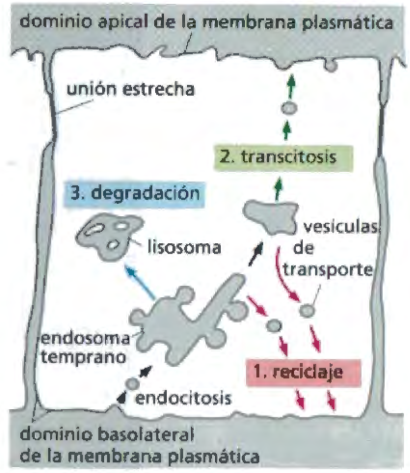


Figura 13–52 Posibles destinos de los receptores transmembrana que han sido endocitados. Se muestran tres rutas que parten del compartimiento endosómico en una célula epitelial. Los receptores recuperados son devueltos (1) al mismo dominio de membrana del que procedían (*reciclaje*) o (2) a un dominio diferente de la membrana plasmática (*transcitosis*). Los receptores que no han sido recuperados específicamente de los endosomas siguen la ruta que va desde el compartimiento endosómico hasta los lisosomas, donde son degradados (*degradación*). La formación de agregados de oligómeros en la membrana endosómica puede ser una de las señales que guíe a los receptores hacia la vía de degradación. Si el ligando que es endocitado con su receptor permanece unido al receptor en el medio ácido del endosoma, sigue la misma vía que el receptor; en caso contrario es entregado a los lisosomas.

Determinadas proteínas son recuperadas de los endosomas tempranos y devueltas a la membrana plasmática

Los endosomas tempranos forman un compartimiento que actúa como la estación principal de clasificación en la ruta endocítica, tal como lo hace la red del *cis* y del *trans* Golgi en la vía biosintética-secretora. En el ambiente ligeramente ácido del endosoma temprano, muchos receptores internalizados cambian su conformación y liberan su ligando, como ya se ha descrito en el caso de los receptores M6P con sus hidrolasas lisosómicas en los endosomas tardíos, todavía más ácidos. Por lo general, los ligandos endocitados que se disocian de sus receptores en el endosoma temprano están predestinados a ser destruidos en los lisosomas junto con los otros contenidos del endosoma no unidos a membrana. No obstante, algunos otros ligandos endocitados permanecen unidos a sus receptores y comparten su destino.

El destino de los receptores –y de algunos ligandos unidos a ellos– varía según el tipo de receptor de que se trate: (1) la mayoría de los receptores son reciclados y vuelven al mismo dominio de la membrana plasmática de donde proceden; (2) algunos viajan a un dominio de membrana plasmática diferentes, mediante *transcitosis*, y (3) algunos se dirigen a los lisosomas donde son degradados (**Figura 13–52**).

El receptor de LDL sigue la primera de estas rutas. Se disocia de su ligando LDL en el endosoma y es reciclado hacia la membrana plasmática para su reutilización, mientras que la LDL descargada es transportada a los lisosomas (**Figura 13–53**). Las vesículas de transporte de reciclaje se forman a partir de tubos largos y estrechos que se extienden a partir de los endosomas tempranos. Es probable que la geometría de estos tubos contribuya al proceso de clasificación: debido a que los túbulos tienen una gran superficie de membrana rodean-

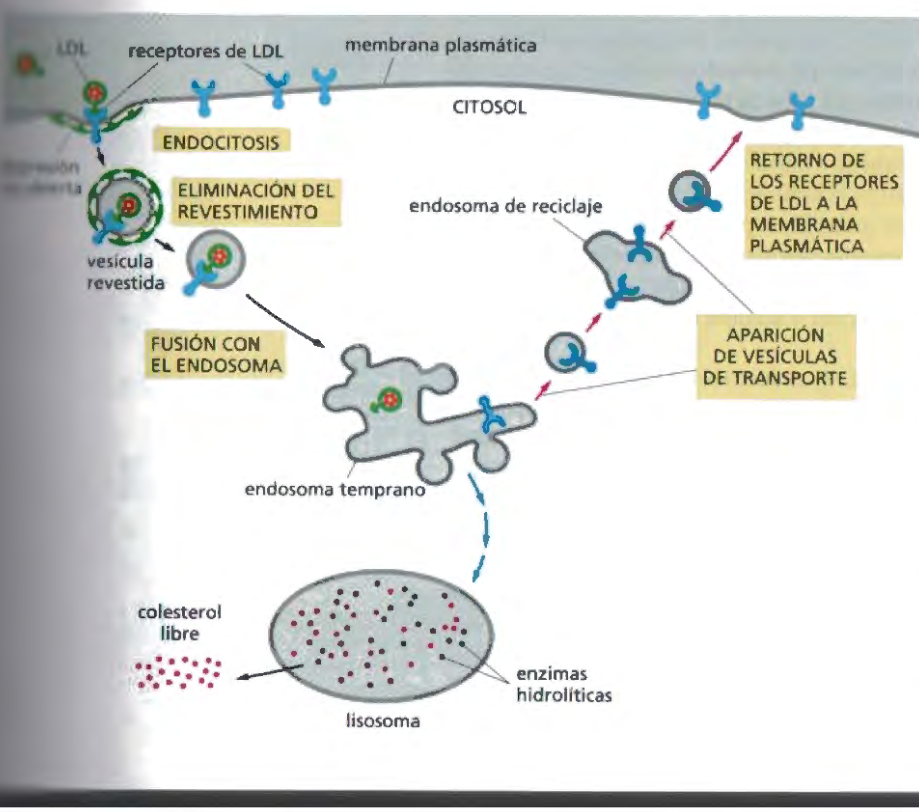


Figura 13–53 Endocitosis de LDL mediada por receptor. <GCTA> Nótese que en el ambiente ácido del endosoma, las LDL se disocian de su receptor. Después de una serie de pasos (véase Figura 13–55), las LDL acaban en los lisosomas, donde se degradan y se libera el colesterol, en una forma no esterificada, que contenían. Los receptores proteicos de LDL vuelven a la membrana plasmática vía vesículas de transporte recubiertas de clatrina que, tal como se muestra en la figura, brotan de la región tubular del endosoma. Para simplificar el esquema, se muestra un solo receptor de LDL que entra en la célula y que retorna a la membrana plasmática. Esté ocupado o no, cada receptor de LDL realiza un ciclo completo, hacia adentro y de nuevo hacia la membrana de la célula, cada 10 minutos, dando un total de varios cientos de vueltas en su vida media de 20 horas.

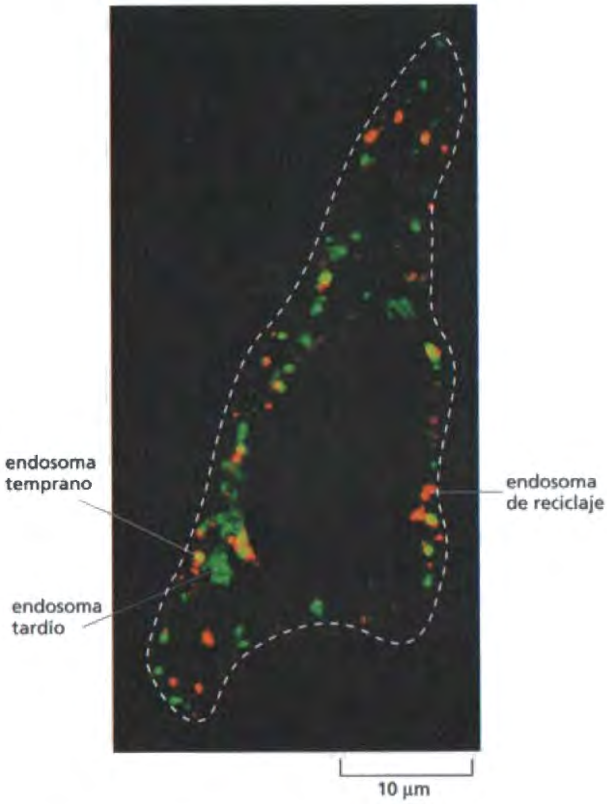


Figura 13–54 Clasificación de las proteínas de membrana en la ruta endocítica. Los receptores de transferrina están implicados en la captación de nutrientes, desplazándose entre los endosomas y la membrana plasmática. Por el contrario, los receptores de opiáceos son inhibidos por endocitosis seguidos de degradación en los lisosomas cuando son activados por opiáceos como la morfina y la heroína, así como por péptidos endógenos denominados encefalinas y endorfinas. La endocitosis de ambos tipos de receptores se inicia en las depresiones recubiertas de clatrina. A continuación son transportados a los endosomas tempranos, desde donde sus caminos divergen: los receptores de transferrina son clasificados hacia los endosomas de reciclaje mientras que los receptores de opiáceos lo son hacia los endosomas tardíos. La micrografía muestra ambos receptores –marcados con diferentes colorantes fluorescentes– 30 min después de la endocitosis (los receptores de transferrina marcados en *rojo* y los receptores opiáceos en *verde*). En ese momento, algunos endosomas tempranos contienen ambos receptores y se ven como estructuras *amarillas*, debido a la superposición de la luz verde y de la luz roja procedentes de los colorantes fluorescentes. Por el contrario, los endosomas de reciclaje y los endosomas tardíos están especialmente enriquecidos en receptores de transferrina o en receptores de opiáceos respectivamente, mostrándose como estructuras rojas o verdes. (Cortesía de Mark von Zastrow.)

do un pequeño volumen, las proteínas de membrana tienden a concentrarse en ellos. Las vesículas de transporte que devuelven el material a la membrana plasmática comienzan a formarse en los túbulos, pero también pueden separarse porciones tubulares de los endosomas tempranos y fusionarse entre sí formando los denominados *endosomas de reciclaje*, que sirven como una estación de paso para el tráfico existente entre los endosomas tempranos y la membrana plasmática. Esta ruta de reciclaje actúa sin parar y compensa la endocitosis que tiene lugar continuamente en la membrana plasmática.

El **receptor de transferrina** sigue una ruta de reciclaje similar a la del receptor LDL, pero en este caso el ligando también se recicla. La transferrina es una proteína soluble que transporta el hierro en la sangre. El receptor de la transferrina de la superficie celular descarga la transferrina, con el hierro unido, en los endosomas tempranos mediante un proceso de endocitosis mediada por receptor. El bajo pH del endosoma hace que la transferrina libere el hierro que transporta. La transferrina libre de hierro (llamada apotransferrina) permanece unida a su receptor. El complejo receptor-apotransferrina entra en las estructuras tubulares de los endosomas tempranos y a partir de allí es reciclado de vuelta a la membrana plasmática (**Figura 13–54**). Cuando la apotransferrina vuelve al pH neutro del fluido extracelular, se disocia del receptor y queda libre, pudiendo captar más hierro y comenzar de nuevo el ciclo. De esta forma, la transferrina actúa como una lanzadera entre el fluido extracelular y el compartimiento endosómico, evitando entrar en contacto con los lisosomas y entregando el hierro en el interior celular a medida que es necesario para el crecimiento y proliferación celular.

La segunda ruta que pueden seguir los receptores endocitados a partir de los endosomas es la que siguen muchos receptores de señalización, incluyendo los receptores opiáceos (véase Figura 13–54) y el receptor que une el *factor de crecimiento epidérmico* (*EGF*: *epidermal growth factor*). El EGF es una proteína pequeña de señalización extracelular que estimula la división de las células de la epidermis y de otros tipos celulares. A diferencia de los receptores de LDL, estos receptores sólo se acumulan en depresiones revestidas después de haber unido EGF, y la mayoría de ellos no se reciclan sino que son degradados en los lisosomas junto con el EGF captado. Por consiguiente, la unión de EGF produce en primer lugar la activación de las vías de señalización intracelulares y, como consecuencia de ello, reduce la concentración de los receptores de EGF en la superficie celular, un proceso llamado *regulación por disminución* (*down-regulation*), que reduce la sensibilidad de la célula al EGF (véase Figura 15–29).

La endocitosis mediada por receptor y dependiente de clatrina es un proceso muy regulado. En primer lugar, los receptores son modificados covalentemente con la proteína pequeña ubiquitina. Pero, a diferencia de la *poliubiquitinización* que añade una cadena de ubiquitina que marca a la proteína para su degradación por los proteosomas (descrito en el Capítulo 6), la unión de ubiquitina en la clasificación de proteínas en la ruta endocítica dependiente de clatrina une sólo una o dos moléculas de ubiquitina a la proteína: es el proceso denominado *monoubiquitinización* o *multiubiquitinización*, respectivamente. Las proteínas de unión a ubiquitina reconocen la ubiquitina unida y ayudan a dirigir los receptores modificados hacia las depresiones recubiertas de clatrina. Después de su entrega en los endosomas, otras proteínas de unión a ubiquitina las reconocen y las ayudan a superar las etapas posteriores de clasificación.

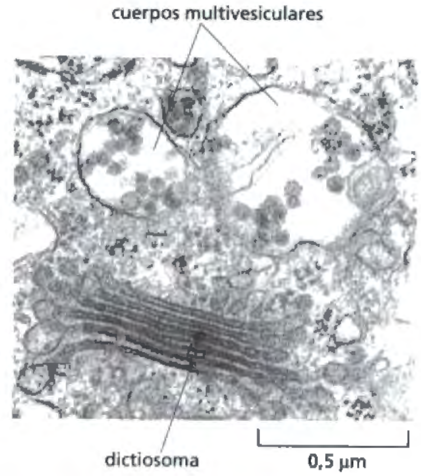


Figura 13-55 Electromicrografía de un cuerpo multivesicular de una célula vegetal. La gran cantidad de membrana interna será entregada a la vacuola, el equivalente vegetal al lisosoma, para su degradación.

En la ruta hacia los endosomas tardíos se forman cuerpos multivesiculares

Como ya hemos descrito, muchas de las moléculas endocitadas se desplazan desde los endosomas tempranos hasta los tardíos. En este proceso, los endosomas tempranos migran lentamente a lo largo de los microtúbulos hacia el interior celular, emitiendo túbulos de membrana y vesículas que reciclan material hacia la membrana plasmática y el TGN. Al mismo tiempo, la membana que delimita los endosomas en migración forma depresiones hacia el interior que vesiculan y producen vesículas internas: los **cuerpos multivesiculares** (**Figura 13-55**). Finalmente, los cuerpos multivesiculares pueden fusionarse con un compartimiento endosómico tardío o entre sí formando los endosomas tardíos. Al final de la vía, los endosomas tardíos se convierten en lisosomas como consecuencia tanto de su fusión con lisosomas preexistentes como de su progresiva acidificación (**Figura 13-56**).

Los cuerpos multivesiculares contienen aquellas proteínas de membrana endocitadas que han de degradarse. Como parte del proceso de clasificación de proteínas, los receptores destinados a degradación, como los receptores EGF ocupados que se han descrito, se concentran de forma específica en las membranas que invaginan en los cuerpos multivesiculares. De este modo tanto los receptores como cualquier molécula de señalización unida estrechamente a ellos será accesible en su totalidad a las enzimas digestivas, que la degradarán (**Figura 13-57**). Además de las proteínas de membrana endocitadas, los cuerpos mul-

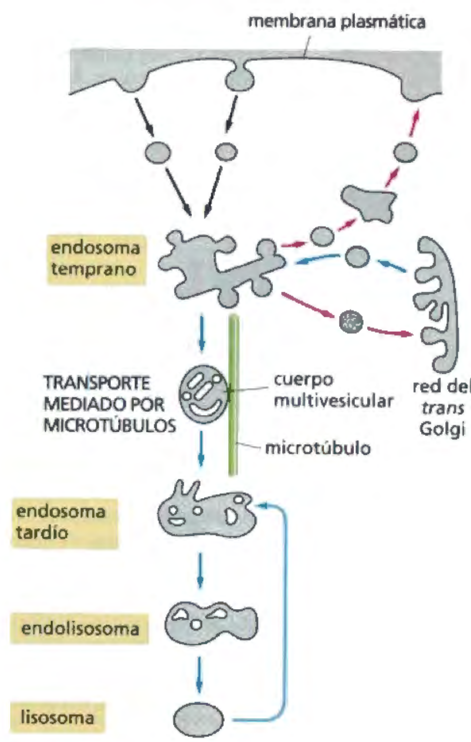
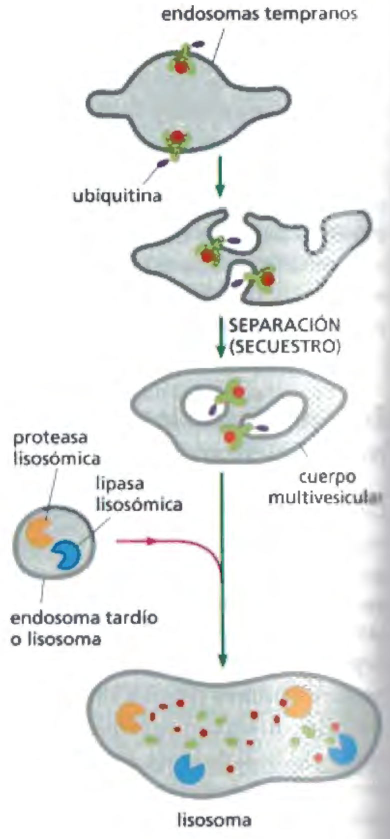


Figura 13-56 Detalles de la vía endocítica que va desde la membrana plasmática hasta los lisosomas. La maduración de los endosomas tempranos a tardíos tiene lugar a través de la formación de los cuerpos multivesiculares, que contienen grandes cantidades de membrana invaginada y vesículas internas (de ahí su nombre). Los cuerpos multivesiculares se desplazan hacia el interior a lo largo de microtúbulos, mientras forman vesículas de transporte que reciclan componentes a la membrana plasmática. Se transforman gradualmente en endosomas tardíos, bien mediante fusión unos con otros o bien fusionándose con algunos endosomas tardíos preexistentes. Los endosomas tardíos ya no envían vesículas a la membrana plasmática.

Figura 13–57 Secuestro de proteínas endocitadas en las membranas internas de los cuerpos multivesiculares. Finalmente, las proteasas y las lipasas de los lisosomas digieren la totalidad de las membranas internas en los cuerpos multivesiculares formadas por invaginaciones. Los procesos de invaginación son esenciales para conseguir la completa digestión de proteínas de membrana endocitadas: por ejemplo, dado que la membrana exterior del cuerpo multivesicular se mantiene formando un continuo con la del lisosoma, las hidrolasas lisosómicas no pueden digerir los dominios citosólicos de las proteínas transmembrana, como el receptor de EGF que se muestra, si no se encuentran en las vesículas internas.



tivesiculares también contienen la mayoría del contenido soluble de los endosomas tempranos destinado a los endosomas tardíos y a su digestión en los lisosomas.

La clasificación hacia las vesículas internas de los cuerpos multivesiculares requiere de una o más etiquetas de ubiquitina, que se añaden en las regiones citosólicas de las proteínas de membrana. Estas etiquetas ayudan en primer lugar a dirigir las proteínas hacia las vesículas recubiertas de clatrina. Una vez entregadas en la membrana endosómica, las etiquetas de ubiquitina son de nuevo reconocidas por una serie de proteínas citosólicas, denominadas *ESCRT-0, -I, -II y -III*, que se unen secuencialmente pasando la carga de un complejo al siguiente y por último participan en el proceso de clasificación de las proteínas hacia las vesículas internas en los cuerpos multivesiculares (**Figura 13–58**). La invaginación de membrana en los cuerpos multivesiculares también depende de una quinasa de lípidos que fosforila fosfatidilinositol produciendo PI(3)P, que es utilizado como sitio de anclaje adicional de los complejos ESCRT; para poderse unir a la membrana endosómica estos complejos requieren tanto PI(3)P como la presencia de moléculas carga ubiquitinizadas. Una segunda PI quinasa añade otro grupo fosfato a PI(3)P y produce PI(3,5)P_2, requerido por ESCRT-III para

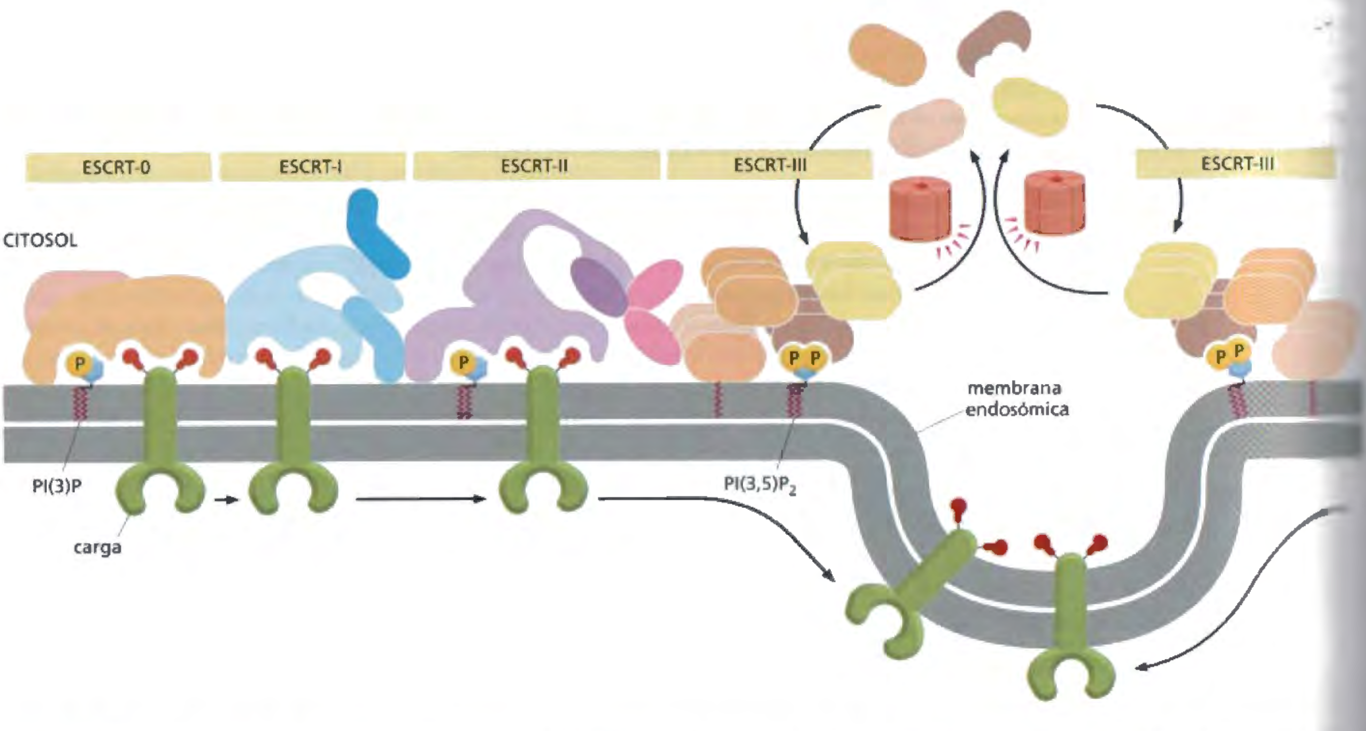


Figura 13–58 Clasificación de las proteínas de membrana endocitadas en las vesículas internas de un cuerpo multivesicular. Una serie de complejos fenómenos de unión pasan las proteínas carga ubiquitinizadas de uno a otro complejo ESCRT y las concentran en las áreas de membrana que se invagin desde el citosol hacia el lumen del endosoma formando las vesículas de membrana internas del cuerpo multivesicular. Los complejos ESCRT son solubles en el citosol y son reclutados por las membranas cuando son necesarios. En primer lugar, ESCRT-0 se une tanto a la ubiquitina unida a la proteína carga como al grupo de cabeza del PI(3)P. ESCRT-0 se separa de la membrana pasando la proteína cargada sobre ESCRT-I. A continuación ESCRT-I se disocia, cediendo la proteína cargada al complejo ESCRT-II; al final, ESCRT-II se disocia y el complejo ESCRT-III se une a la membrana. A diferencia de ESCRT-0, -I y -II, ESCRT-III no se une de forma directa a la proteína carga ubiquitinizada. Por el contrario, se cree que su polimerización en estructuras multiméricas confina la carga en áreas específicas de membrana que entonces se invaginan, dejando a los componentes ESCRT en la superficie de la membrana endosómica. Una AAA-ATPasa (cilindros *rojos*) despolimeriza los complejos ESCRT-III para que puedan ser reutilizados.

formar grandes complejos multiméricos en la membrana. Se desconoce cómo el ensamblaje de los complejos ESCRT produce en último lugar la invaginación de membrana y la separación de las vesículas internas, ya que los complejos ESCRT no forman parte de las membranas que invaginan.

Las células mutantes con déficit de función ESCRT tienen deficiencias de señalización. En estas células, los receptores activados no pueden ser inhibidos mediante endocitosis ni empaquetados en cuerpos multivesiculares por lo que la señal es más prolongada, lo que puede producir una proliferación descontrolada y cáncer.

La misma maquinaria ESCRT que dirige la vesiculación interior en la membrana del endosoma temprano formando los cuerpos multivesiculares es utilizada por el virus HIV, el virus Ébola y otros virus recubiertos, para vesicular desde la membrana plasmática al espacio extracelular. Los dos procesos son equivalentes desde el punto de vista topológico, ya que en ambos casos se trata de la formación de vesículas desde la superficie citosólica de la membrana (**Figura 13–59**).

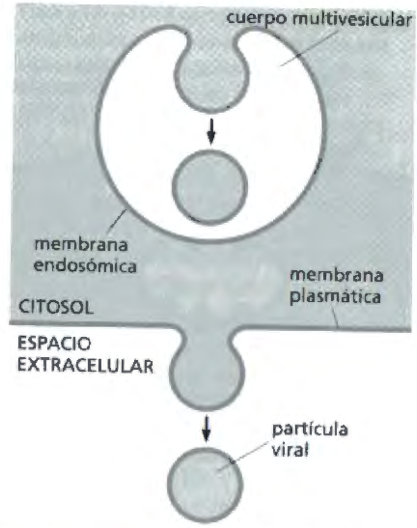


Figura 13–59 Los complejos ESCRT en la formación de los cuerpos multivesiculares y la vesiculación viral. En los dos procesos topológicamente equivalentes indicados por las flechas, los complejos ESCRT deforman las membranas en yemas que protuyen desde el citosol.

La transcitosis transporta macromoléculas a través de monocapas de células epiteliales

Algunos receptores de superficie de las células polarizadas epiteliales transportan específicamente moléculas de un espacio extracelular a otro mediante **transcitosis** (**Figura 13–60**). Estos receptores son endocitados y siguen una ruta que va desde los endosomas hacia un dominio de membrana diferente (véase Figura 13–52). Por ejemplo, las ratas recién nacidas obtienen anticuerpos de la leche materna (que les ayudan a protegerse de las infecciones) transportándolos a través de su epitelio intestinal. El lumen del intestino es algo ácido; a este bajo pH, los anticuerpos de la leche se unen a receptores específicos de la superficie apical (absortiva) de las células epiteliales del intestino y son internalizados a través de de-

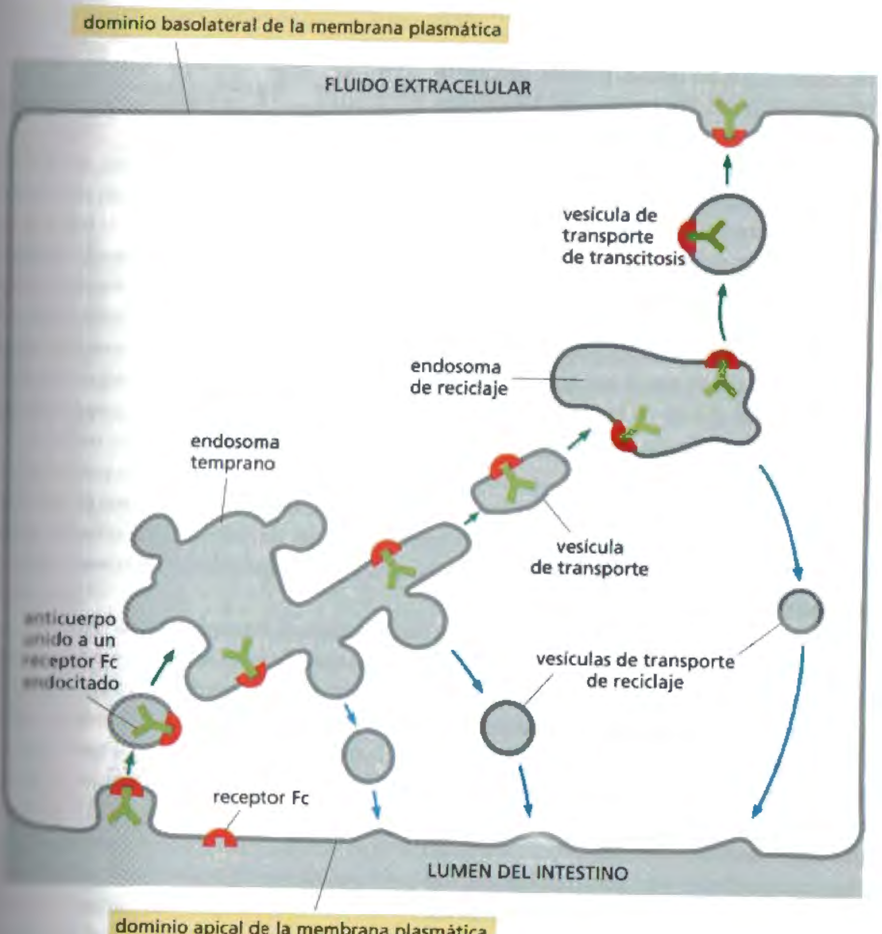


Figura 13–60 El papel que desempeñan los endosomas de reciclaje en la transcitosis. Los endosomas de reciclaje son una estación de paso en la vía transcitótica. En el ejemplo mostrado, un receptor de anticuerpos de una célula intestinal se une al anticuerpo y es endocitado, transportando finalmente el anticuerpo hasta el dominio basolateral de la membrana. El receptor se denomina receptor Fc porque se une a la región Fc del anticuerpo (descrito en el Capítulo 25).

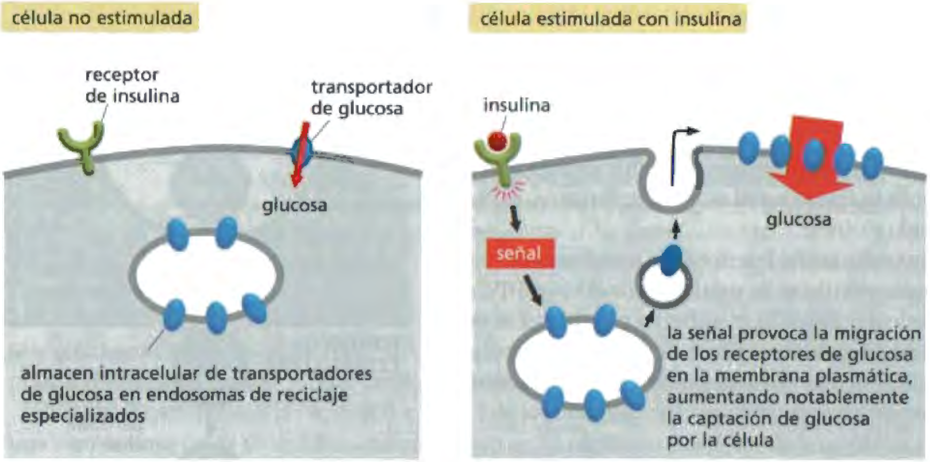


Figura 13–61 Almacenamiento de proteínas de la membrana plasmática en los endosomas de reciclaje. Los endosomas de reciclaje pueden actuar como un almacén intracelular de proteínas de membrana especializadas, permitiendo su rápida movilización cuando sean necesarias. En el ejemplo que se muestra, la unión de insulina al receptor de insulina activa una vía de señalización que causa la rápida inserción de los transportadores de glucosa, en la membrana plasmática de una célula adiposa o muscular, e incrementa en gran medida su captación de glucosa.

presiones y de vesículas revestidas de clatrina; al final, son transferidos a los endosomas tempranos. Los complejos permanecen intactos en los endosomas y se recuperan en vesículas de transporte que se fusionan con el dominio basolateral de la membrana plasmática. Al ser expuestos al pH neutro del fluido extracelular, los anticuerpos se disocian de sus receptores y entran en el torrente circulatorio de las crías.

La vía transcitótica que va desde los endosomas tempranos hasta la membrana plasmática no es directa. En primer lugar, los receptores se desplazan desde los endosomas tempranos a un compartimiento endosómico intermedio, el **endosoma de reciclaje** descrito (véase Figura 13–60). La gran variedad de rutas que pueden seguir los diferentes receptores a partir de los endosomas implica que, además de los lugares de unión para sus ligandos y de los lugares de unión para las depresiones recubiertas, muchos tipos de receptores también tienen señales de clasificación que los guían hacia el tipo apropiado de vesícula que parte del endosoma y lo transporta hacia la membrana diana apropiada en la célula.

Una propiedad única de los endosomas de reciclaje es que las células pueden regular la salida de las proteínas de membrana desde el compartimiento. De este modo, las células pueden ajustar a sus necesidades el flujo de proteínas a través de la ruta transcitótica. Aunque los mecanismos son inciertos, esta regulación permite a los endosomas de reciclaje desempeñar un papel importante en el control de la concentración de determinadas proteínas de membrana. Por ejemplo, las células grasas y las musculares contienen acumulaciones intracelulares importantes de transportadores de glucosa que son responsables de la captación de glucosa a través de la membrana plasmática. Estas proteínas de transporte de membrana son almacenadas en endosomas de reciclaje especializados hasta que la hormona *insulina* estimula que la célula incremente su captación de glucosa. En respuesta a la señal de insulina, las vesículas de transporte emergen con rapidez desde los endosomas de reciclaje y entregan un gran número de transportadores de glucosa a la membrana plasmática, incrementando en gran medida la velocidad de captación de glucosa por la célula (**Figura 13–61**).

Las células epiteliales tienen dos compartimientos endosómicos tempranos distintos pero un solo compartimiento endosómico tardío común

En células epiteliales polarizadas, la endocitosis ocurre tanto en el *dominio basolateral* de la membrana plasmática como en el *dominio apical*. El material endocitado en cada dominio entra primero en un compartimiento endosómico temprano único en cada uno de los dominios específicos. Este fenómeno permite que los receptores endocitados sean reciclados a su dominio original de membrana, a menos que contengan señales de clasificación que les obliguen a transitar al otro dominio. Las moléculas endocitadas desde cada dominio que no son recuperadas en los endosomas tempranos son transportadas a un compartimiento endosómico tardío común, situado cerca del centro de la célula, y acaban siendo degradadas en los lisosomas (**Figura 13–62**).

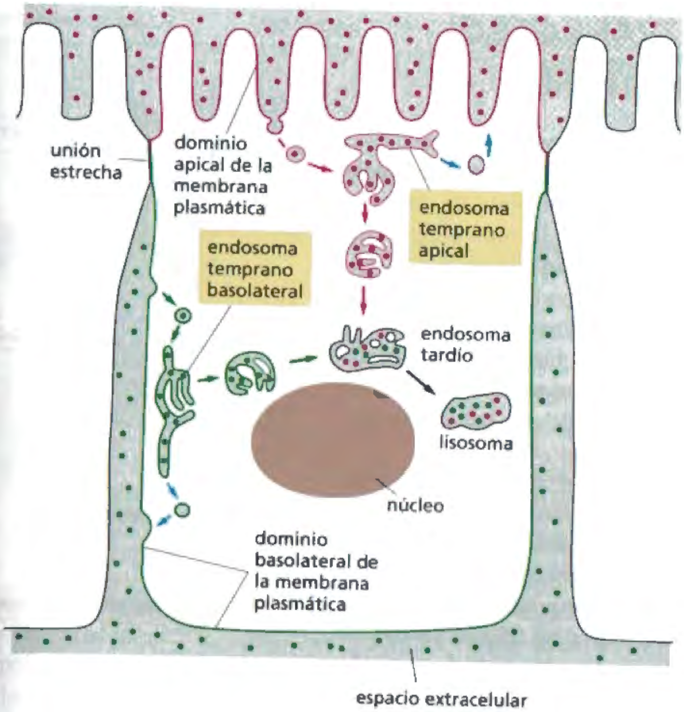


Figura 13–62 Dos compartimientos endosómicos tempranos distintos en una célula epitelial. Los dominios basolateral y apical de la membrana plasmática se comunican con distintos compartimientos endosómicos tempranos. Sin embargo, las moléculas endocitadas en ambos dominios que no tienen señales para su reciclaje o transcitosis se encontrarán en un compartimiento endosómico tardío común antes de ser digeridas en los lisosomas.

El hecho de que las células tengan unos cuantos endosomas tardíos conectados o muchos desconectados parece depender del tipo celular y del estado fisiológico de la célula. Como en el caso de muchos otros orgánulos de membrana, los endosomas del mismo tipo pueden fusionarse unos con otros (en un ejemplo de la fusión homotípica descrita anteriormente) y generar grandes endosomas conectados.

Resumen

Las células ingieren fluidos, moléculas y partículas por endocitosis: determinadas regiones de la membrana plasmática se invaginan y se desprenden formando vesículas endocíticas. Por lo general muchas de las partículas y moléculas endocitadas acaban en los lisosomas, donde son degradadas. La endocitosis tiene lugar tanto constitutivamente como en respuesta a señales extracelulares. La endocitosis es tan frecuente en muchas células que cada hora es internalizada una fracción importante de la membrana plasmática. Las células mantienen su tamaño porque la mayoría de los componentes de la membrana plasmática (proteínas y lípidos) son devueltos de forma continua a la superficie celular por exocitosis. Este gran ciclo endocítico-exocítico está mediado sobre todo por depresiones y vesículas revestidas de clatrina.

Muchos receptores de la superficie celular que se unen a determinadas macromoléculas extracelulares son marcadas con ubiquitina y son guiadas hacia las depresiones revestidas de clatrina. Por lo tanto, estos receptores y sus ligandos son internalizados de forma eficiente en vesículas recubiertas de clatrina, un proceso denominado endocitosis mediada por receptor. Las vesículas revestidas pierden rápidamente su cubierta de clatrina y se fusionan con los endosomas tempranos.

La mayoría de los ligandos se separan de sus receptores en el ambiente ácido de los endosomas y acaban en los lisosomas, mientras que la mayoría de receptores son reciclados a la superficie celular para su reutilización mediante vesículas de transporte. Sin embargo, los complejos receptor-ligando pueden seguir otras rutas desde el compartimiento endosómico. En algunos casos tanto el receptor como el ligando acaban degradándose en los lisosomas, dando lugar a la inhibición del receptor; en estos casos, los receptores etiquetados con ubiquitina reclutan varios complejos ESCRT, que dirigen la invaginación y separación de vesículas endosómicas en la formación de los cuerpos multivesiculares. En otros casos, tanto el receptor como el ligando son transferidos a un dominio de la membrana plasmática diferente de aquel en que se originó: es el proceso llamado transcitosis. La vía de la transcitosis incluye endosomas de reciclaje, que almacenan las proteínas de membrana plasmática hasta que sean necesarias.

TRANSPORTE DESDE LA RED DEL *TRANS* GOLGI HASTA EL EXTERIOR CELULAR: EXOCITOSIS

Después de considerar el sistema digestivo interno de la célula y los diversos tipos de tráfico de membranas que convergen en los lisosomas, la descripción se centrará en el complejo de Golgi y las rutas secretoras que conducen al exterior celular. Normalmente, las vesículas de transporte destinadas a la membrana plasmática abandonan la red del *trans* Golgi (TGN: trans *Golgi network*) manteniendo un flujo constante en forma de túbulos de formas irregulares. Las proteínas de membrana y los lípidos de estas vesículas aportan nuevos componente a la membrana plasmática celular, mientras que las proteínas solubles de estas vesículas son secretadas al espacio extracelular. La fusión de las vesículas con la membrana plasmática se llama **exocitosis**. De esta forma, por ejemplo, las células producen y secretan la mayoría de los proteoglucanos y glucoproteínas de la *matriz extracelular*, como se describe en el Capítulo 19.

Todas las células necesitan esta **ruta secretora constitutiva**, que funciona constantemente. No obstante, las células especializadas en la secreción disponen de una segunda ruta secretora en la que las proteínas solubles y otras sustancias se almacenan primero en *vesículas de secreción* y más tarde son segregadas. Es la **ruta secretora regulada**, que se encuentra sobre todo en células especializadas en secretar rápidamente productos cuando son necesarios -como hormonas, neurotransmisores o enzimas digestivas (**Figura 13-63**). En esta sección, consideraremos el papel del complejo de Golgi en estas dos rutas de secreción y compararemos los mecanismos que intervienen en ambas.

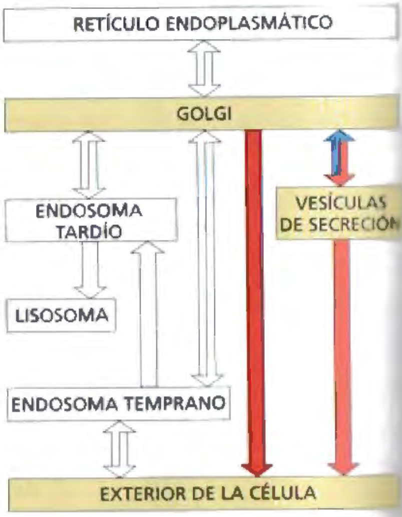
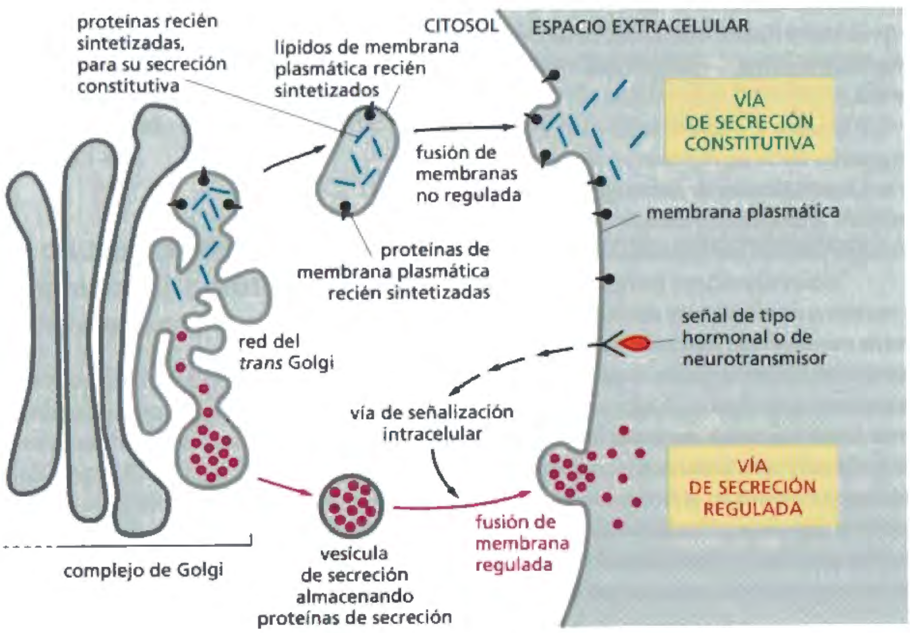


Figura 13-63 Las vías de secreción regulada y constitutiva. <ACAG>Las dos vías divergen en la red del *trans* Golgi. La vía de secreción constitutiva está presente en la totalidad de las células. Muchas proteínas solubles son secretadas continuamente por la célula a través de esta vía, que también nutre a la membrana plasmática con proteínas y lípidos recién sintetizados. Las células especializadas en la secreción también disponen de una vía de secreción regulada, mediante la cual determinadas proteínas de la red del *trans* Golgi son conducidas en vesículas secretoras, en las que las proteínas son empaquetadas y concentradas hasta que una determinada señal extracelular estimula su secreción. La secreción regulada de pequeñas moléculas, como la histamina, tiene lugar de forma similar; estas moléculas son transportadas activamente desde el citosol hasta vesículas de secreción ya formadas. En esta área, a menudo forman complejos con determinadas macromoléculas (proteoglucanos en el caso de la histamina), de manera que pueden ser almacenadas en grandes cantidades sin producir una presión osmótica excesivamente elevada.

Parece que muchas proteínas y lípidos son transportados automáticamente desde el ER y desde el complejo de Golgi hasta la superficie celular

Una célula capaz de realizar una secreción regulada tiene que separar al menos tres tipos de proteínas antes de abandonar en la red del *trans* Golgi las destinadas a los lisosomas (vía endosomas), las destinadas a las vesículas de secreción y las destinadas a ser descargadas inmediatamente en la superficie celular (**Figura 13-64**). Ya se ha señalado que las proteínas destinadas a los lisosomas son seleccionadas para ser empaquetadas en vesículas de transporte específicas (con manosa 6-fosfato en el caso de las hidrolasas lisosómicas); parece que otras señales análogas a éstas dirigen a las *proteínas de secreción* al interior de las vesículas de secreción. La vía de secreción constitutiva no selectiva transporta la mayoría de



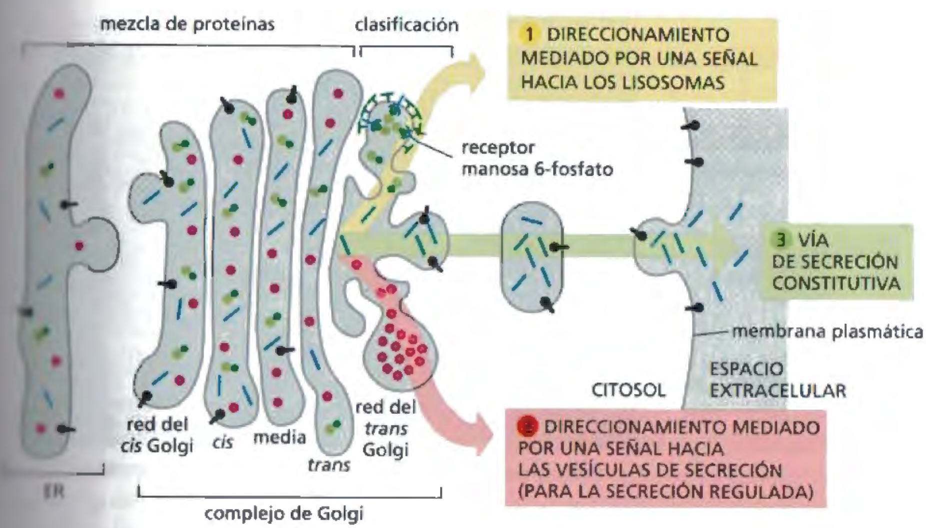


Figura 13–64 Los tres procesos mejor conocidos de clasificación de proteínas en la red del *trans* Golgi. (1) Las proteínas marcadas con manosa 6-fosfato (M6P) son dirigidas hacia los lisosomas (vía endosomas tardíos) mediante vesículas de transporte recubiertas de clatrina (véase Figura 13–44). (2) Las proteínas cuyas señales las dirigen hacia vesículas de secreción, son concentradas en estas vesículas como parte de una vía de secreción regulada que sólo está presente en estas células secretoras especializadas. (3) En las células no polarizadas, las proteínas que no presentan características especiales son transportadas hasta la membrana plasmática mediante una vía de secreción constitutiva. Sin embargo, en las células polarizadas, las proteínas de secreción y las de membrana plasmática son dirigidas selectivamente hacia el dominio apical o hacia el dominio basolateral de la membrana plasmática, de forma que al menos una de estas dos rutas ha de estar mediada por una señal, como veremos más adelante.

las otras proteínas dirigidas a la membrana celular. Dado que la entrada en esta ruta no requiere ninguna señal particular, también se denomina **vía por defecto**. Así, parece que en células no polarizadas, tales como las células de la serie blanca de la sangre o los fibroblastos, cualquier proteína del lumen del complejo de Golgi es automáticamente arrastrada por la vía constitutiva a menos que sea devuelta de forma específica al ER, retenida como proteína residente en el propio complejo de Golgi o seleccionada para las rutas que conducen a la secreción regulada o a los lisosomas. En células polarizadas, en las que se han de transferir distintos productos a diferentes dominios de la superficie celular, las opciones son más complejas.

Las vesículas secretoras emergen por gemación desde la red del *trans* Golgi

Las células que están especializadas en secretar rápidamente algunos de sus productos en respuesta a una señal, concentran y almacenan estos productos en **vesículas secretoras** (denominadas *gránulos de secreción* o *vesículas de núcleo denso* porque se observan núcleos densos cuando se miran al microscopio electrónico). Las vesículas secretoras se forman a partir de la red del *trans* Golgi y liberan su contenido al exterior celular en respuesta a una señal específica. El producto secretado puede ser tanto una molécula pequeña (como la histamina) como una proteína (una hormona o una enzima digestiva).

Las proteínas destinadas a las vesículas de secreción (a menudo denominadas *proteínas de secreción*) son empaquetadas en vesículas adecuadas en la red del *trans* Golgi. En este caso, parece que el mecanismo implica la agregación selectiva de las proteínas de secreción. Estos agregados electrodensos pueden verse al microscopio electrónico en el lumen de la red del *trans* Golgi. Se desconoce cuál es la señal que dirige a las proteínas de secreción a estos agregados, pero parece que es una zona señal que se presenta en muchas proteínas de esta clase. Si un gen que codifica una proteína secretora es expresado artificialmente en una célula secretora de otro tipo, que por lo general no fabrica esta proteína, la proteína extraña se empaqueta de manera apropiada en vesículas de secreción. Esta observación demuestra que aunque las proteínas que expresa y empaqueta una célula determinada son diferentes, todas las proteínas contienen secuencias comunes de clasificación que actúan de forma correcta incluso cuando las proteínas se expresan en células que habitualmente no las producen.

Tampoco se conoce cómo se segregan los agregados de las proteínas de secreción en las vesículas secretoras. Las vesículas de secreción contienen proteínas de membrana especiales, algunas de las cuales pueden actuar como receptores uniendo el material agregado en la red del *trans* Golgi. No obstante, los agregados son demasiado grandes para que cada molécula de la proteína secretada pueda unirse a su propio receptor, como se propone para el transporte de enzimas lisosómicas. La captura de los agregados en las vesículas de secreción se puede parecer más a la captación de partículas por fagocitosis en la superficie celular, donde la membrana plasmática se cierra envolviendo grandes estructuras.

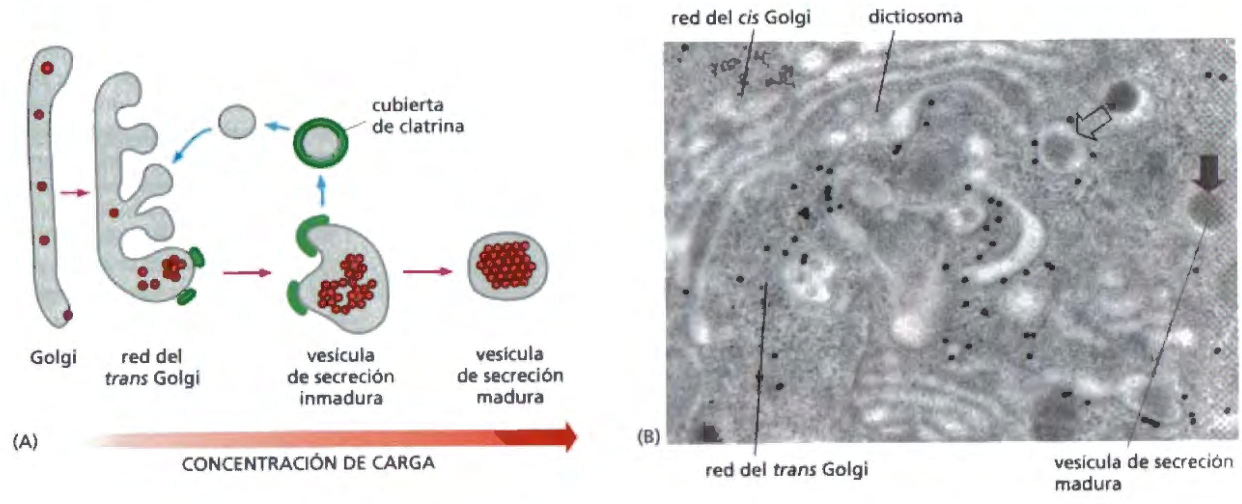
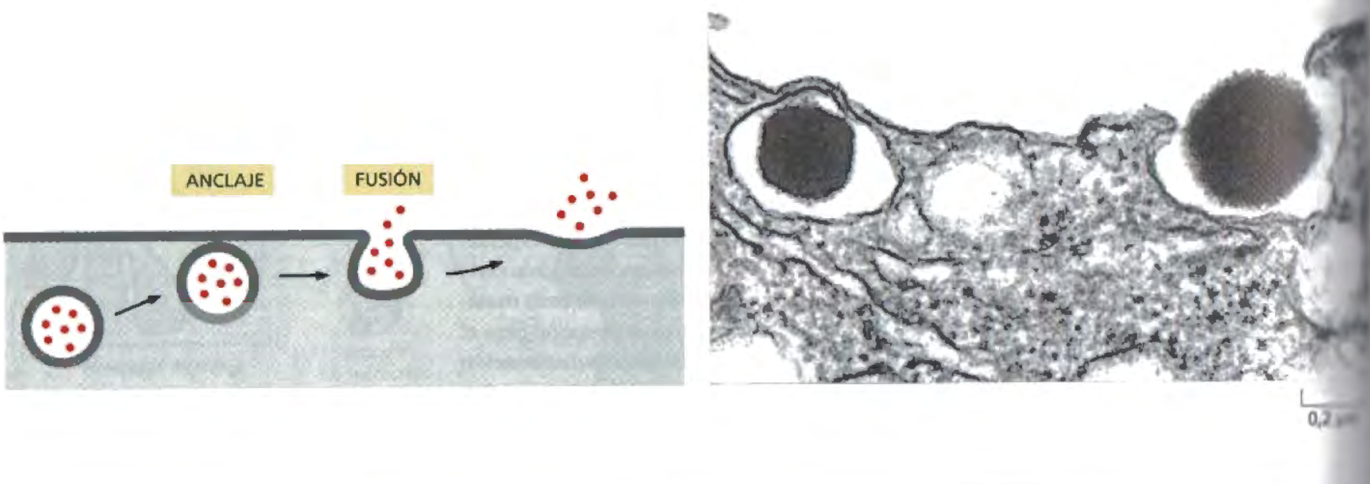


Figura 13–65 Formación de las vesículas de secreción. (A) Las proteínas de secreción son clasificadas y concentradas en vesículas de secreción mediante dos mecanismos. En primer lugar, se agregan en el ambiente iónico de la red del *trans* Golgi; con frecuencia los agregados aumentan su condensación a medida que la vesícula de secreción va madurando y su lumen se acidifica. En segundo lugar, un exceso de contenido luminal y de membrana que está presente en las vesículas inmaduras es recuperado mediante vesículas recubiertas de clatrina a medida que la vesícula de secreción va madurando. (B) Esta electromicrografía muestra algunas vesículas secretoras que se están formando a partir de la red del *trans* Golgi en una célula β del páncreas secretora de insulina. Para localizar las moléculas de clatrina, se ha utilizado un anticuerpo conjugado con esferas de oro coloidal (*puntos negros*). Las vesículas de secreción inmaduras (*flecha vacía*), que contienen la proteína precursora de la insulina (proinsulina), contienen áreas de clatrina. Las cubiertas de clatrina ya no se ven en las vesículas de secreción maduras, que tienen un núcleo muy condensado (*flecha rellena*). (Cortesía de Lelio Orci.)

Inicialmente, la mayor parte de la membrana de las vesículas de secreción que se han formado en la red del *trans* Golgi, rodean los grupos de agregados de proteínas de secreción. Estas **vesículas de secreción inmaduras** tienen el aspecto de cisternas de la red del *trans* Golgi dilatadas que se han separado del dictiosoma. A medida que la vesículas van madurando, pueden fusionarse unas con otras y sus contenidos se concentran (**Figura 13–65**A), probablemente como consecuencia tanto de la recuperación continua de la membrana que es reciclada hacia los endosomas tardíos y el TGN como de la acidificación progresiva por el incremento de concentración en la membrana de la vesícula de bombas de H^+ impulsadas por ATP. Es de destacar que son ATPasas de tipo V las responsables de la acidificación de todos los orgánulos endocíticos y exocíticos (véase Figura 13–36). El grado de concentración de proteínas durante la formación y la maduración de las vesículas de secreción es sólo una pequeña parte del aumento total de concentración de entre 200 y 400 veces que presentan estas proteínas desde que abandonan el ER. Las proteínas de secreción y de membrana se concentran a medida que se desplazan desde el ER a través del complejo de Golgi debido al transporte de recuperación, retrógrado, mediado por vesículas recubiertas de COPI que las excluye (Figura 13–24).

El reciclaje de membrana es importante tanto para devolver componentes al complejo de Golgi como para concentrar el contenido de las vesículas de secreción. Las vesículas im-

Figura 13–66 Exocitosis de vesículas secretoras. La electromicrografía muestra la liberación de insulina desde una vesícula secretora de una célula β-pancreática. (Cortesía de Lelio Orci, en L. Orci, J-D. Vassali y A. Perrelet, *Sci. Am.* 256: 85-94, 1988. Con permiso de Scientific American.)



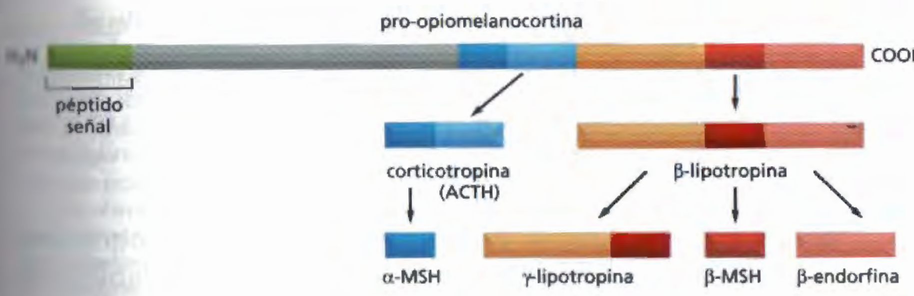


Figura 13–67 Las rutas alternativas de procesamiento de la prohormona pro-opiomelanocortina. Los cortes iniciales son realizados por proteasas que cortan cerca de parejas de aminoácidos cargados positivamente (Lys-Arg, Lys-Lys, Arg-Lys o Arg-Arg). Mediante reacciones accesorias se obtienen los productos finales de secreción. Diferentes tipos celulares tienen diferentes tipos de enzimas, de manera que el mismo precursor prohormonal puede ser utilizado para producir diferentes hormonas peptídicas. Por ejemplo, en el lóbulo anterior de la pituitaria a partir de la pro-opiomelanocortina sólo se producen la corticotropina (ACTH) y la β-lipotropina, mientras que en el lóbulo intermedio se producen principalmente la hormona estimuladora de los α-melanocitos (α-MSH), la γ-lipotropina, la β-MSH y la β-endorfina.

implicadas en esta recuperación se forman como vesículas recubiertas de clatrina que emergen de la superficie de las vesículas de secreción inmaduras y pueden verse incluso sobre vesículas de secreción que aún no se han separado del dictiosoma (véase Figura 13–65B).

Debido a que las vesículas maduras finales están tan densamente rellenas de componentes, la célula secretora puede descargar con rapidez grandes cantidades de material por exocitosis en cuanto es estimulada (**Figura 13–66**).

A menudo las proteínas son procesadas proteolíticamente durante la formación de las vesículas secretoras

La concentración no es el único proceso por el que se ven afectadas las proteínas secretoras a medida que las vesículas secretoras maduran. Muchas hormonas polipeptídicas y neuropéptidos, así como muchas enzimas hidrolíticas secretadas, se sintetizan como proteínas precursoras inactivas. La proteolisis es necesaria para liberar las moléculas activas de los precursores. Esta hidrólisis se inicia en la red del *trans* Golgi y continúa en las vesículas secretoras y a veces en el fluido extracelular después de que haya ocurrido la secreción. Por ejemplo, muchos polipéptidos secretados tienen una *prosecuencia* N-terminal que es eliminada justo antes de la secreción, formándose la proteína madura. Así, estas proteínas se sintetizan como *pre-proproteínas*, en las que el *prepéptido* consiste en el péptido señal del ER que se elimina en el ER rugoso (Figura 12–38). En otros casos, las moléculas peptídicas señal se sintetizan como *poliproteínas* que contienen muchas copias de una misma secuencia de aminoácidos. En casos aún más complejos se sintetizan varias moléculas peptídicas señal como partes de una sola poliproteína que es la precursora de los diferentes productos finales, los cuales son cortados de forma individual a partir de la cadena polipeptídica inicial. La misma poliproteína puede ser procesada de formas diferentes produciendo diferentes péptidos en diferentes tipos celulares (**Figura 13–67**).

¿Por qué es tan común el procesamiento proteolítico en la ruta secretora? Algunos de los péptidos producidos así, como las *encefalinas* (neuropéptidos de cinco aminoácidos con una actividad parecida a la morfina), son demasiado cortos en sus formas maduras para ser cotransportados hacia el lumen del ER o para poder tener las señales necesarias para empaquetarse en las vesículas secretoras. Además, en el caso de las enzimas hidrolíticas secretadas –o de cualquier proteína cuya actividad pueda ser peligrosa en el interior de la célula– el retraso en la activación de la proteína hasta que llega a una vesícula de secreción o hasta que haya sido secretada, proporciona una clara ventaja: evita que actúe antes de tiempo dentro de la célula en la que ha sido sintetizada.

Las vesículas de secreción esperan cerca de la membrana plasmática hasta que una señal les haga liberar su contenido

Una vez cargadas, las vesículas secretoras tienen que ir al lugar de secreción, que en algunos casos se encuentra alejado del complejo de Golgi. Las células nerviosas proporcionan el ejemplo más extremo. Las proteínas secretoras, como los neurotransmisores (neuropéptidos) que deben ser liberados en las terminales nerviosas al final del axón, son sintetizadas y empaquetadas en vesículas del cuerpo celular, donde se sitúan los ribosomas, el ER y el complejo de Golgi. Así, han de viajar a lo largo del axón hasta alcanzar las terminales nerviosas, que pueden estar a más de un metro de distancia. Como se indicó en el Capítulo 16, unas proteínas motoras propulsan a las vesículas a lo largo de los microtúbulos axonales,

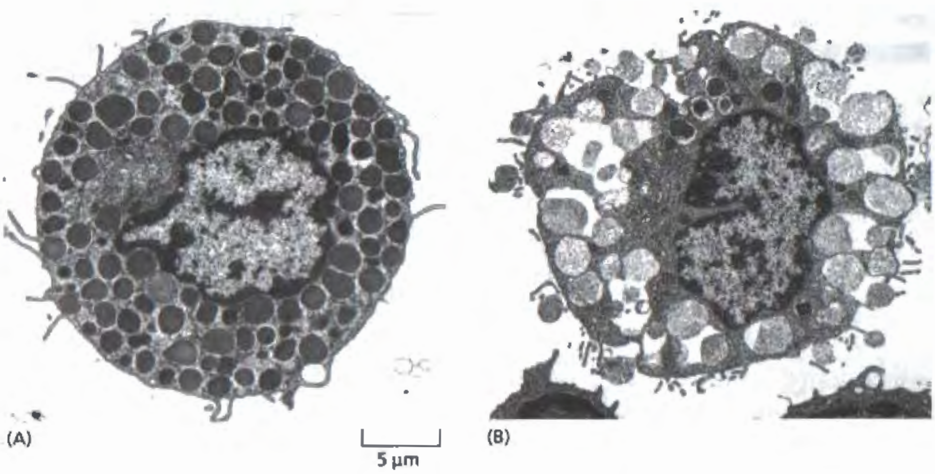


Figura 13–68 Electromicrografías que muestran el proceso de exocitosis en las células cebadas de rata. (A) Célula cebada no estimulada. (B) Esta célula ha sido estimulada por un ligando extracelular soluble a secretar la histamina que acumulaba. Las vesículas que contienen histamina aparecen oscuras, mientras que las que la han liberado son claras. El material que queda en las vesículas vacías consiste en una red de proteoglucanos a la que por lo general se halla unida la histamina almacenada. Cuando la vesícula secretora se ha fusionado con la membrana plasmática, la membrana de la vesícula secretora actúa normalmente como diana a la cual se unen otras vesículas de secreción. Así, la célula de (B) presenta grandes cavidades delimitadas por las membranas fusionadas de muchas vesículas secretoras vacías, que ahora se hallan en continuidad con la membrana plasmática. Esta continuidad no siempre es visible en el plano del corte realizado a través de la célula. (De D. Lawson, C. Fewtrell, B. Gomperts y M. Raff. *J. Exp. Med.* 142:391-402, 1975. Con el permiso de The Rockefeller University Press.)

cuya orientación uniforme guía a las vesículas en el sentido apropiado. Los microtúbulos también guían a las vesículas hacia la superficie celular en la exocitosis constitutiva.

Mientras que las vesículas que contienen materiales para liberación constitutiva se fusionan con la membrana plasmática en cuanto la alcanzan, las vesículas de secreción de la vía regulada esperan cerca de la membrana hasta que la célula reciba una señal de secreción y entonces se fusionan. A menudo la señal es un mensajero químico, como una hormona, que se une a los receptores de la superficie celular. La activación de estos receptores genera señales intracelulares, que a menudo incluyen un incremento transitorio de la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol. En el caso de las terminales nerviosas, normalmente la señal inicial para la exocitosis es una excitación eléctrica (un potencial de acción) que se ha producido por la unión de un transmisor químico a los receptores de la superficie celular. Cuando el potencial de acción llega a las terminales nerviosas, provoca una entrada de Ca^{2+} en el terminal axónico a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. La unión de iones Ca^{2+} a sensores específicos activa la fusión de las vesículas secretoras (denominadas vesículas sinápticas) con la membrana y libera su contenido al espacio extracelular (véase Figura 11–35).

La velocidad de liberación del transmisor (que sólo tarda milisegundos) indica que las proteínas que intervienen en la reacción de fusión no necesitan reorganizaciones complejas ni muchas etapas. Después de que las vesículas se han anclado a la membrana plasmática presináptica, son cebadas, lo que las deja preparadas para la fusión rápida. Las SNARE pueden estar parcialmente apareadas, pero sus hélices no están aún por completo enrolladas en la estructura de haz de cuatro hélices que se precisa para la fusión (véase Figura 13–18). Se cree que otras proteínas impiden que las SNARE completen la fusión hasta que el flujo de calcio elimine el bloqueo. En una sinapsis típica, parece que sólo unas cuantas vesículas están cebadas y listas para exocitosis. La utilización de unas cuantas vesículas a la vez permite a una sinapsis disparar una y otra vez en rápida sucesión. Con cada disparo, son cebadas nuevas vesículas sinápticas, que reemplazan a las que ya se han fusionado y han liberado su contenido.

La exocitosis regulada es una respuesta localizada de la membrana plasmática y del citoplasma subyacente

La histamina es una pequeña molécula segregada por las *células cebadas*. Es liberada mediante la ruta regulada en respuesta a ligandos específicos que se unen a los receptores de superficie de la célula cebada (véase Figura 25–27). La histamina provoca muchos de los síntomas desagradables que acompañan a las reacciones alérgicas, tales como el prurito o los estornudos. Cuando las células cebadas se incuban en un medio que contiene un estimulante soluble, se observa una exocitosis masiva por toda la superficie celular (**Figura 13–68**). Sin embargo, si el ligando estimulante se une a un lecho sólido de forma que sólo pueda interactuar con una región localizada de la superficie de la célula cebada, la exocitosis queda restringida a la región en la que la célula está en contacto con el ligando (**Figura 13–69**).

Este experimento demuestra que respecto a la exocitosis regulada, algunas regiones individuales de la membrana plasmática pueden responder de forma independiente. Como resultado de ello la célula cebada, a diferencia de una célula nerviosa, no responde como un

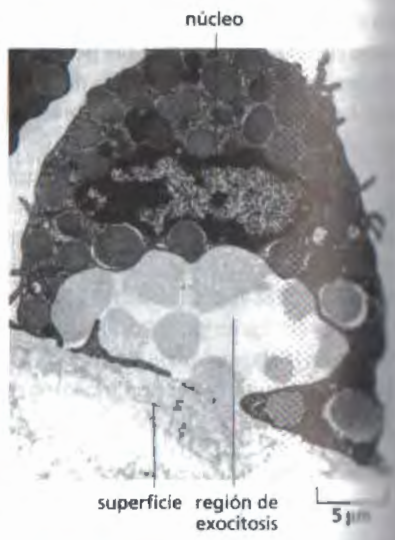


Figura 13–69 La exocitosis como respuesta localizada. Esta electromicrografía muestra una célula cebada estimulada a segregar histamina por un estimulante acoplado a una amplia esfera sólida. La exocitosis se ha producido únicamente en la región de la célula que se halla en contacto con esta superficie. (De D. Lawson, C. Fewtrell y M. Raff. *J. Cell Biol.* 79:394-400, 1978. Con el permiso de The Rockefeller University Press.)

todo cuando está estimulada; la activación de los receptores, las señales intracelulares resultantes y la exocitosis posterior están localizadas en la región particular de la célula que ha sido excitada. De manera similar, esta exocitosis localizada permite a un linfocito asesino secretar las proteínas que inducen la muerte celular sobre una única célula infectada con precisión sin dañar a las células vecinas (véase Figura 25–46).

Los componentes de membrana de las vesículas de secreción son rápidamente recuperados desde la membrana plasmática

Cuando una vesícula secretora se fusiona con la membrana plasmática, su contenido se descarga desde la célula por exocitosis y su membrana pasa a formar parte de la membrana plasmática. Este hecho podría incrementar notablemente el área de la superficie de la membrana plasmática, pero sólo ocurre de forma transitoria ya que es constante la eliminación de componentes de membrana de la superficie celular mediante endocitosis; este proceso es por lo menos tan rápido como lo ha sido el de adición de componentes por exocitosis, un proceso reminiscente del ciclo de exocitosis-endocitosis descrito. La hipótesis más probable es que después de su recuperación desde la membrana plasmática, las proteínas de membrana de la vesícula secretora son o bien recicladas o bien dirigidas hacia los lisosomas para su degradación. La cantidad de membrana vesicular que se añade temporalmente a la membrana plasmática puede ser enorme: cuando una célula acinar del páncreas es estimulada a secretar sus enzimas digestivas, en la membrana plasmática apical (el área de la cual es de sólo 30 μm^2) se insertan alrededor de 900 μm^2 de membrana vesicular.

Así pues, el control del tráfico de membrana desempeña un papel importante en la composición de las diferentes membranas celulares. Para mantener constante el tamaño de cada uno de los compartimientos de membrana en las vías secretora y endocítica, el equilibrio entre los flujos de membrana anterógrado y retrógrado debe estar controlado finamente. Para que las células crezcan, el flujo anterógrado tiene que ser mayor que el retrógrado, de modo que la membrana aumente de superficie. Para que las células mantengan un tamaño constante, los flujos anterógrado y retrógrado han de ser iguales. Aún conocemos muy poco sobre los mecanismos que controlan estos flujos.

Algunos procesos de secreción regulada permiten aumentar la membrana plasmática

Una de las funciones importantes de la exocitosis regulada es la de aportar más membrana para aumentar la superficie de la membrana plasmática celular cuando sea necesario. Un ejemplo espectacular es la expansión de membrana que se produce en el proceso de celularización del embrión de mosca, que inicialmente es una sola célula con cerca de 6000 núcleos rodeados por una única membrana plasmática. En pocas decenas de minutos el embrión es convertido en el mismo número de células que de núcleos. Este proceso de celularización requiere una enorme cantidad de nueva membrana plasmática, que es añadida por una cuidada y ordenada fusión de vesículas que de inmediato forma la membrana plasmática que rodea las células. Fenómenos de fusión similares a éste son necesarios para aumentar la membrana en los anillos de constricción de células de animales y plantas durante la *citocinesis*, proceso por el cual las dos células hijas se separan después de la mitosis (descrita en el Capítulo 17).

La mayoría de las células, sobre todo las que se encuentran sometidas a estrés mecánico, sufren con frecuencia a lo largo de su vida pequeñas roturas de su membrana plasmática. En un proceso sorprendente, en el que se cree que ocurren fenómenos de fusión homotípicas vesícula-vesícula como de exocitosis, se forma rápidamente un tapón en la superficie celular a partir de fuentes de membrana accesibles en las proximidades, como lisosomas. Además de constituir una barrera de emergencia frente a los escapes, este tapón también ayuda a reducir la tensión de la membrana alrededor del área de la herida permitiendo a la bicapa lipídica “normal” fluir de nuevo hasta recuperar la continuidad y sellar la rotura. En la reparación de heridas, la fusión y exocitosis de vesículas está desencadenada por el incremento súbito de Ca^{2+} que es abundante en el medio extracelular y penetra en el interior de la célula en cuanto la membrana se rompe. En la **Figura 13–70** se muestran tres ejemplos en los que la exocitosis permite la expansión de la membrana plasmática.

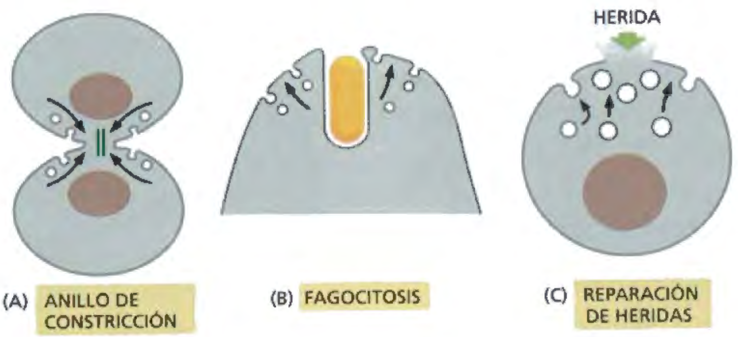


Figura 13–70 Tres ejemplos de exocitosis regulada que aumentan la superficie de la membrana plasmática. (A, B) Parece que las vesículas que se fusionan con la membrana plasmática durante la citocinesis y la fagocitosis proceden de los endosomas, mientras que (C) las que se encuentran implicadas en la reparación de heridas podrían proceder de los lisosomas. La reparación de las heridas es un proceso esencial en aquellas células que, como las células musculares, están sometidas a estrés mecánico.

Las células polarizadas dirigen las proteínas desde la red del *trans* Golgi hasta el dominio apropiado de la membrana plasmática

La mayoría de las células de los tejidos están *polarizadas* y tienen dos (y a veces más) dominios de membrana que son las dianas de diferentes tipos de vesículas secretoras. Aparece, pues, el problema general de cómo se organiza la salida del complejo de Golgi para que se mantengan las diferencias entre un dominio de membrana y otro. Por ejemplo, una célula epitelial típica tiene un *dominio apical*, que da a una cavidad interna, o al mundo externo y que a menudo tiene estructuras especializadas como los cilios o los microvilli; también tiene un *dominio basolateral*, que comprende el resto de la célula. Los dos dominios están separados por un anillo de *uniones estrechas* (véase Figura 19–24) que impiden que las proteínas y los lípidos (en la monocapa exterior de la bicapa lipídica) se desplacen entre las regiones apical y basolateral, de manera que la composición de los dos dominios de membrana es diferente.

Una célula nerviosa es otro ejemplo de célula polarizada. La membrana plasmática de su axón y los terminales nerviosos están especializados en enviar señales a otras células, mientras que la membrana plasmática de su soma celular y de sus dendritas está especializada en recibir señales de otras células nerviosas. Los dos dominios tienen diferente composición proteica. Estudios del tráfico de proteínas en células nerviosas en cultivo sugieren que, en lo que respecta a transporte vesicular desde la red del *trans* Golgi a la superficie celular, la membrana plasmática del soma celular nervioso y de las dendritas se parece a la membrana basolateral de una célula epitelial polarizada, mientras que la membrana plasmática del axón y de los terminales nerviosos se parece a la membrana apical de esta célula epitelial polarizada (**Figura 13–71**). Así, proteínas que están destinadas a un dominio específico en una célula epitelial, también se encuentran dirigidas al dominio correspondiente en una célula nerviosa.

Diferentes estrategias direccionan selectivamente a las proteínas de membrana y a los lípidos hacia el dominio de membrana plasmática correcto

En principio las diferencias entre los dominios de la membrana plasmática no son por necesidad las consecuencia de una entrega dirigida de los componentes de membrana apropiados. Por el contrario, los componentes de membrana podrían ser entregados a todas las regiones de la superficie celular por un igual, para después ser estables en algunas regiones

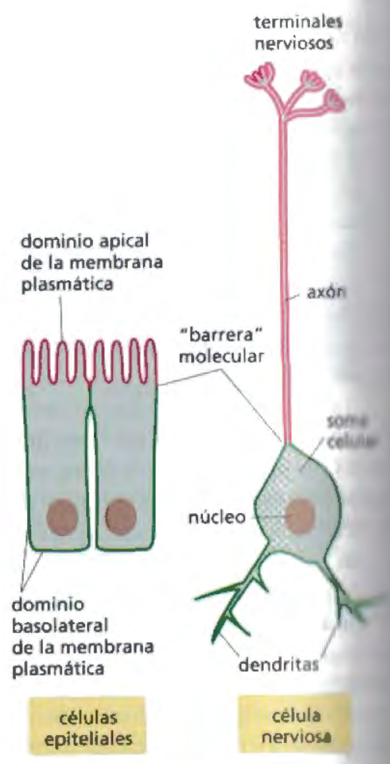
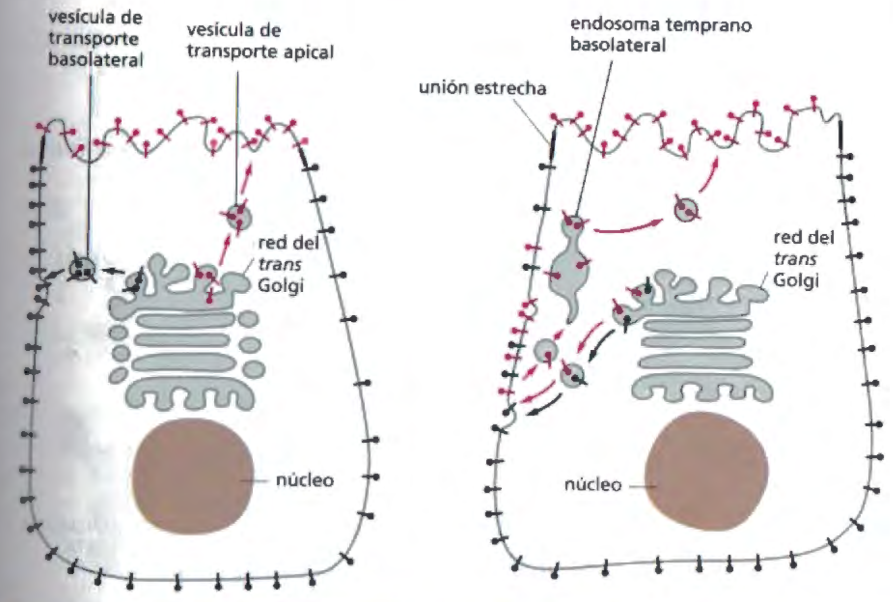


Figura 13–71 Comparación entre dos tipos de células polarizadas. Teniendo en cuenta sólo los mecanismos utilizados para dirigir las proteínas hacia los diferentes dominios de una célula, la membrana plasmática del soma celular nervioso y las dendritas se parecen al dominio basolateral de una célula epitelial polarizada, mientras que la membrana plasmática de un axón y los terminales nerviosos se parecen al dominio apical de una célula epitelial. Los diferentes dominios de membrana tanto de las células epiteliales como de las nerviosas se encuentran separados por una valla molecular formada por una red de proteínas de membrana estrechamente asociadas con el citoesqueleto de actina subyacente; esta barrera –denominada unión estrecha en las células epiteliales y cono axonal en neuronas– evita la difusión de las proteínas de membrana entre los dos dominios.



(A) CLASIFICACIÓN DIRECTA DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA EN LA RED DEL *TRANS* GOLGI

(B) CLASIFICACIÓN INDIRECTA VÍA ENDOSOMAS

Figura 13–72 Dos vías de clasificación de las proteínas de la membrana plasmática en una célula epitelial polarizada. Las proteínas que están recién sintetizadas alcanzan su dominio de la membrana plasmática apropiado mediante (A) una vía directa o (B) una vía indirecta. En la vía indirecta una proteína es recuperada del dominio inapropiado de la membrana plasmática por endocitosis y luego es transportada al dominio correcto vía endosomas tempranos, es decir, por transcitosis. Se sabe que la vía indirecta es la que se utiliza en los hepatocitos del hígado para entregar proteínas hacia el dominio apical, que delimita los conductos biliares. Sin embargo, en otros casos, como en las células epiteliales del intestino, se utiliza la vía directa, como se describe en el texto.

y eliminados selectivamente en otras. Aunque esta estrategia de entrega al azar seguida de retención selectiva o eliminación parece ser la utilizada en algunas situaciones, por lo general las entregas son dirigidas específicamente a los dominios apropiados de membrana. Por ejemplo, las células epiteliales secretan con frecuencia una serie de productos –como enzimas digestivas o mucus en el caso de las células del intestino– por su superficie apical, y otra serie de productos –como componentes de la lámina basal– por su superficie basolateral. Así pues, las células han de tener mecanismos para direccionar las vesículas que contienen determinadas moléculas hacia diferentes dominios de membrana.

Al examinar células epiteliales en cultivo se ha observado que las proteínas que salen del ER destinadas hacia diferentes dominios viajan juntas hasta que alcanzan al TGN. Allí se separan y son enviadas en vesículas de secreción o de transporte hacia el dominio de membrana apropiado (**Figura 13–72**).

La membrana plasmática apical de la mayoría de las células epiteliales está muy enriquecida en glucoesfingolípidos, que contribuyen a la protección frente a la agresión de esta superficie expuesta, por ejemplo, por las enzimas digestivas y el pH bajo en sitios como el intestino y el estómago, respectivamente. De manera similar, las proteínas de la membrana plasmática que están unidas a la bicapa lipídica mediante un anclaje glucosilfosfatidilinositol (GPI: *glucosylphosphatidylinositol*) (descritas en el Capítulo 12) también se encuentran sobre todo en la membrana plasmática apical. Si se utilizan técnicas de DNA recombinante para unir un anclaje GPI a una proteína que normalmente sería transportada a la superficie basolateral, por lo general la proteína es transportada a la superficie apical. Se cree que las proteínas unidas a GPI son dirigidas hacia la membrana apical porque están asociadas con los glucoesfingolípidos en balsas lipídicas de membrana que se forman en la membrana del TGN. Como se describe en el Capítulo 10, las balsas lipídicas se forman en el TGN y en la membrana plasmática cuando los glucoesfingolípidos y el colesterol se agrupan en microagregados (véase Figura 10–14). Una vez han seleccionado un solo tipo de moléculas a transportar (carga), las balsas lipídicas emergen de la red del *trans* Golgi en vesículas de transporte destinadas a la membrana plasmática apical. Las balsas lipídicas pueden participar en la clasificación de proteínas en el TGN, de una manera similar a como ocurre con la distribución selectiva de algunas proteínas de membrana en las balsas lipídicas especializadas en caveolas en la membrana plasmática.

Las proteínas de membrana destinadas a la membrana basolateral contienen señales en su cola citoplasmática. Cuando se encuentran en un contexto estructural adecuado, estas señales son reconocidas por proteínas adaptadoras de la cubierta que las empaquetan en vesículas de transporte adecuadas en el TGN. Las mismas señales basolaterales que son reconocidas en el TGN también funcionan en los endosomas reciclando las proteínas hacia la membrana basolateral después de haber sido endocitadas.

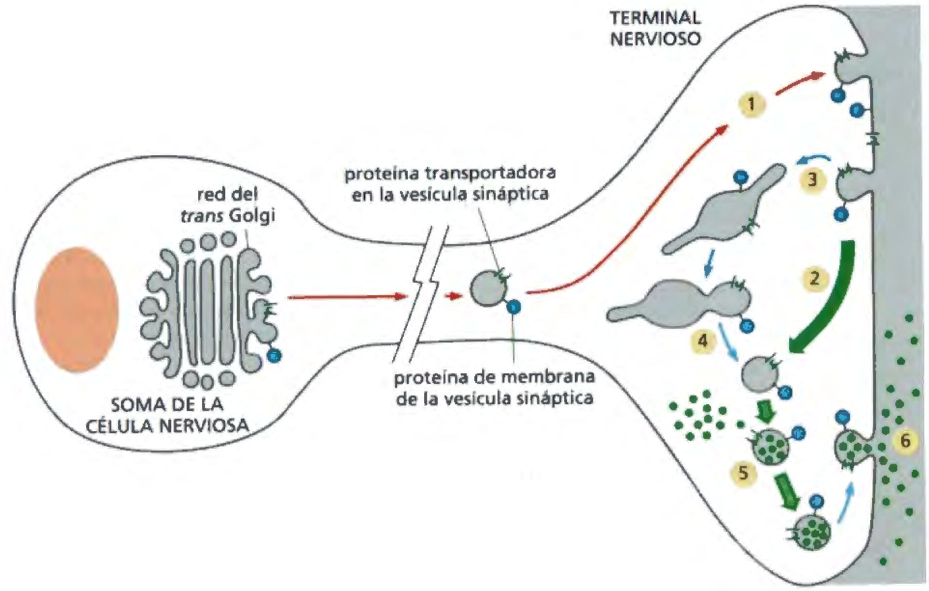


Figura 13–73 Formación de vesículas sinápticas. Estas vesículas, diminutas y uniformes, se encuentran sólo en células nerviosas y en algunas células endocrinas, donde almacenan y secretan pequeñas moléculas de neurotransmisor. La importación de neurotransmisores directamente en las pequeñas vesículas endocíticas que se forman a partir de la membrana plasmática está mediada por proteínas transportadoras de membrana que actúan como antiportadores, impulsadas por un gradiente de H^+ que mantienen las bombas de protones de la membrana de la vesícula.

Las vesículas sinápticas pueden formarse directamente a partir de vesículas endocíticas

Las células nerviosas (y también algunas células endocrinas) contienen dos tipos de vesículas de secreción. Como en todas las células secretoras, estas células empaquetan proteínas y péptidos en vesículas de secreción de contenido denso por la ruta que se utiliza habitualmente y son liberadas mediante la vía secretora regulada para el caso. No obstante, estas células utilizan además otra clase especializada de pequeñas vesículas de secreción (unos 50 nm de diámetro), denominadas **vesículas sinápticas**, y que se forman de manera diferente. En las células nerviosas, estas vesículas almacenan neurotransmisores pequeños, como la acetilcolina, el glutamato y el ácido γ-aminobutírico (GABA: *gamma-aminobutiric acid*), que participan en las sinapsis químicas comunicando rápidamente dos células entre sí. Como se ha descrito, cuando un potencial de acción alcanza un terminal nervioso, desencadena la liberación del contenido de las vesículas en una fracción de milisegundo. Algunas neuronas disparan más de 1000 veces por segundo y liberan neurotransmisores cada vez. Esta rápida liberación es posible porque algunas de las vesículas están ancladas y cebadas para la fusión, que sólo ocurrirá cuando el potencial de acción induzca el flujo de Ca^{2+} en la terminal.

Sólo una pequeña proporción de las vesículas sinápticas en el terminal nervioso se fusionan con la membrana plasmática en respuesta a cada potencial de acción. Pero para que el terminal nervioso responda con rapidez y de manera repetida, las vesículas han de ser rellenadas muy rápido después de su descarga. Así pues, muchas vesículas sinápticas no se generan a partir de la membrana del complejo de Golgi en el cuerpo celular sino a partir del reciclaje local desde la membrana plasmática en los terminales nerviosos. Se cree que los componentes de membrana de las vesículas sinápticas son transportados a la membrana plasmática por la vía secretora constitutiva y después son recuperados por endocitosis. Pero en lugar de fusionarse con los endosomas, la mayoría de las vesículas endocíticas se rellenan de inmediato con neurotransmisores convirtiéndose en vesículas sinápticas.

Los componentes de membrana de las vesículas sinápticas incluyen transportadores especializados en la captación de neurotransmisores desde el citosol, donde son sintetizadas las pequeñas moléculas de neurotransmisores que intervienen en la señalización sináptica rápida. Una vez llenas del neurotransmisor, las vesículas vuelven a la membrana plasmática, donde esperan hasta que la célula sea estimulada. Después de que hayan liberado su contenido, los componentes de membrana son recuperados de la misma manera y son reutilizados de nuevo (**Figura 13–73**).

Debido a que las vesículas sinápticas son abundantes y tienen un tamaño bastante uniforme, es posible purificarlas en gran número, lo que las ha convertido en el orgánulo mejor caracterizado de la célula. Mediante cuidadosos estudios de proteómica cuantitativa se han identificado todos los componentes de la vesícula sináptica (**Figura 13–74**).

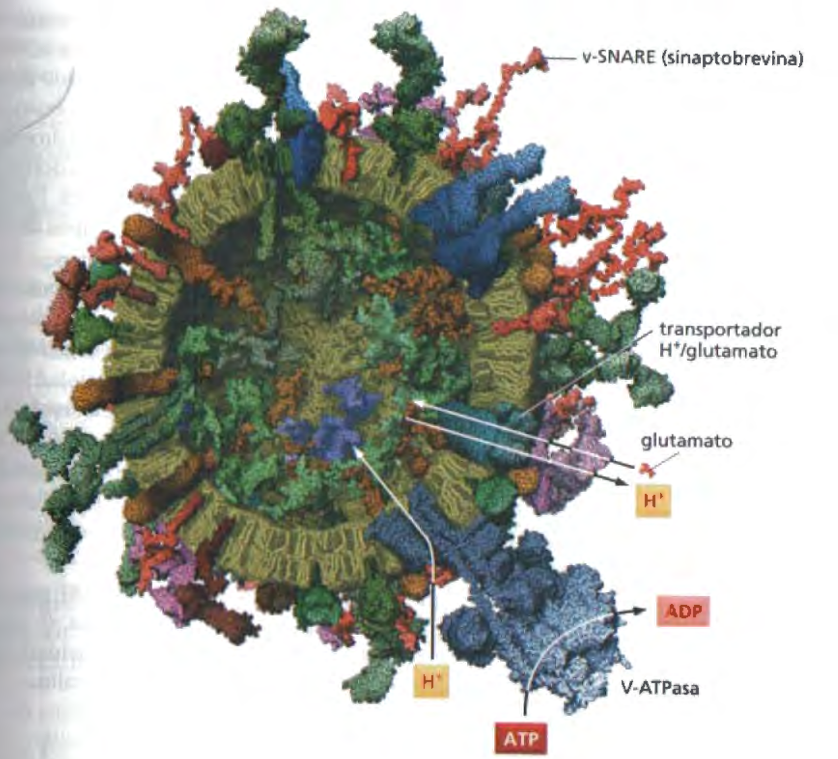


Figura 13–74 Modelo a escala de la vesícula sináptica. La ilustración muestra una sección a través de la vesícula sináptica en la que las proteínas y los lípidos han sido representados a escala en función de su estequiometría y de sus estructuras conocidas o aproximadas. Sólo se han representado alrededor del 70% de las proteínas presentes en la membrana; un modelo completo mostraría una membrana aún más densamente ocupada que el mostrado. Cada una de las membranas contiene 7000 moléculas de fosfolípido y 5700 moléculas de colesterol. En la membrana de cada vesícula sináptica se encuentran cerca de 50 tipos de proteínas integrales de membrana diferentes que varían mucho en su abundancia relativa y que en conjunto tienen aproximadamente 600 hélices-α transmembrana. La v-SNARE sinaptobrevina es la proteína más abundante en la vesícula (~70 copias/vesícula). Su naturaleza filamentosa le permite destacar y extenderse más allá de la densa capa que forman los dominios citosólicos de las proteínas. Por el contrario, la V-ATPasa que utiliza ATP para bombear H^+ hacia el lumen de la vesícula, sólo se encuentran en 1 o 2 copias por vesícula. El gradiente de H^+ aporta la energía para el transporte del neurotransmisor, mediante un transportador H^+/neurotransmisor, que permite cargar cada vesícula con 1800 moléculas de neurotransmisor como el glutamato, uno de los que se muestran a escala. (Adaptado de S. Takamori et al., *Cell*, 127:831-846, 2006. Con permiso de Elsevier.) <ACCA>

Resumen

Las células pueden secretar proteínas tanto de manera constitutiva como de manera regulada. Mientras que las rutas reguladas sólo actúan en células secretoras especializadas, en todas las células existe una ruta secretora constitutiva que se caracteriza por un transporte vesicular continuo desde el TGN a la membrana plasmática. En la vía regulada, las moléculas son almacenadas en vesículas de secreción o en vesículas sinápticas, que no se fusionan con la membrana plasmática para liberar su contenido hasta que reciben una señal apropiada. Las vesículas de secreción contienen proteínas para secreción que han sido transportadas desde el TGN. Las proteínas de secreción se concentran durante la formación y la maduración de las vesículas de secreción. Las vesículas sinápticas, que sólo se encuentran en los terminales nerviosos y en algunas células endocrinas, se forman tanto a partir de vesículas de endocitosis como de endosomas, y permiten la secreción de moléculas pequeñas de neurotransmisores.

Las proteínas son automáticamente transferidas desde el TGN hasta la membrana plasmática a través de la ruta constitutiva, a menos que sean captadas por otras rutas o sean retenidas en el complejo de Golgi. En las células polarizadas, las rutas de transporte desde el TGN hasta la membrana plasmática actúan selectivamente asegurando que sean transferidos diferentes tipos de proteínas de membrana y de lípidos a los diferentes dominios de la membrana plasmática.

PROBLEMAS

¿Qué afirmaciones son ciertas? Explicar por qué sí o por qué no

13–1 En todos los procesos que implican fusión de una vesícula a una membrana diana, siempre se fusionan entre sí las capas citosólicas de las bicapas de la vesícula y de la membrana, como lo hacen las capas que no están en contacto con el citosol.

13–2 Sólo existe un requisito indispensable para la salida de una proteína del ER: debe estar correctamente plegada.

13–3 Todas las glucoproteínas y glucolípidos de las membranas intracelulares tienen sus cadenas de oligosacáridos dirigidas hacia la cara luminal; aquellas que se encuentran en la membrana plasmática apuntan hacia el exterior celular.

13–4 Durante la transcitosis, las vesículas que se forman a partir de depresiones recubiertas en la superficie apical se fusionan con la membrana de la superficie basolateral y de este modo transportan moléculas a través del epitelio.

Resolver los siguientes problemas

13–5 En una célula que no se divide, como la célula hepática, ¿por qué el flujo de membrana entre compartimientos debe estar equilibrado de manera que el flujo de reciclaje equilibre el flujo de salida? ¿También se producirá esta situación de equilibrio en

una célula que, como la célula del epitelio intestinal, se encuentra en constante división?

13–6 Las levaduras y muchos otros organismos producen un único tipo de cadena pesada de clatrina y un único tipo de cadena ligera; así pues sólo producen un único tipo de cubierta de clatrina. ¿Cómo es posible que una única cubierta de clatrina pueda participar en tres rutas de transporte diferentes –de Golgi a endosomas tardíos, de membrana plasmática a endosomas tempranos y de vesículas de secreción inmaduras a Golgi– en las que se transportan de forma específica diferentes proteínas?

13–7 ¿Cómo es posible que sea cierto que las cadenas complementarias de SNARE específicas sólo marquen vesículas y sus correspondientes membranas diana? Después de la fusión de vesículas la membrana diana contiene una mezcla de t-SNARE y v-SNARE. Al principio, estas SNARE están íntimamente unidas, pero NSF puede separarlas, reactivándolas. ¿Qué evita que las membranas diana acumulen una población de v-SNARE igual o superior que la de sus propias t-SNARE?

13–8 Los virus son los últimos "carroñeros" –una consecuencia directa de sus pequeños genomas. Siempre que es posible utilizan la maquinaria celular para realizar las diferentes etapas necesarias para su reproducción. Muchos virus diferentes tienen cubiertas de membrana. Estos virus, denominados recubiertos, acceden al citosol fusionándose con una membrana celular. ¿Por qué cada uno de estos virus codifica su propia proteína de fusión en vez de aprovecharse de las SNARE celulares?

13–9 Para que se produzca la fusión de una vesícula con su membrana diana, las membranas tienen que aproximarse a menos de 1,5 nm de distancia, de manera que las bicapas puedan unirse (**Figura P13–1**). Asumiendo que las porciones significativas de las dos membranas en el sitio de fusión tienen 1,5 nm de diámetro, calcular el número de moléculas de agua que se encontrarían entre las dos membranas. (El agua es 55,5 M y el volumen de un cilindro es $\pi r^2 h$.) Dado que un fosfolípido ocupa una superficie de 0,2 nm^2, ¿cuántos fosfolípidos estarían presentes en cada una de las dos monocapas opuestas en el sitio de unión? ¿Hay suficientes moléculas de agua para unir las cabezas polares de ese número de fosfolípidos? (Se estima que hay de 10 a 12 moléculas de agua asociadas con la cabeza polar de cada fosfolípido de la superficie expuesta de la membrana.)

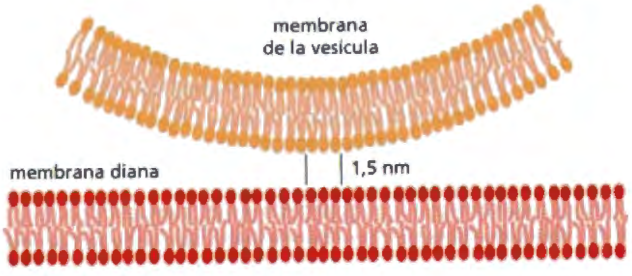


Figura P13–1 Aproximación íntima de una vesícula y su membrana diana en preparación para la fusión (Problema 13–9).

13–10 Las proteínas SNARE existen como parejas complementarias que realizan la fusión de membranas entre vesículas apropiadas y sus membranas diana. De esta forma una vesícula con una variedad particular de v-SNARE sólo se fusionará con la membrana que contenga la t-SNARE complementaria. Sin embargo, en algunas situaciones se producen fusiones de membranas idénticas (fusiones homotípicas). Por ejemplo, cuando una célula de levadura forma una yema, las vesículas que proceden de la vacuola de la célula madre se desplazan a la yema donde se fusionan unas con otras formando una nueva vacuola. Estas vesículas llevan tanto v- como t-SNARE. ¿Son ambos tipos de SNARE esenciales para estas fusiones homotípicas?

Para evaluar este punto se desarrolla un ingenioso ensayo para la fusión de las vesículas vacuolares. Se preparan vesículas de dos cepas mutantes de levadura: la cepa B contiene un gen defectuoso de la fosfatasa alcalina (Pase: *phosphatase*) vacuolar; la cepa A es defectuosa en la proteasa que transforma el precursor de la fosfatasa alcalina (pro-Pasa) en su forma activa (Pasa) (**Figura P13–2A**). Ninguna de las dos cepas tiene fosfatasa alcalina, pero cuando los extractos de las dos cepas se mezclan, la fusión vesicular produce fosfatasa alcalina activa que puede ser medida fácilmente (Figura P13–2)

Ahora se eliminan los genes de las v- o las t-SNARE vacuolares, o ambos en cada una de las dos cepas de levadura, se preparan vesículas vacuolares de ambas y se evalúa su capacidad para fusionarse mediante el ensayo de fosfatasa alcalina (Figura P13–2B).

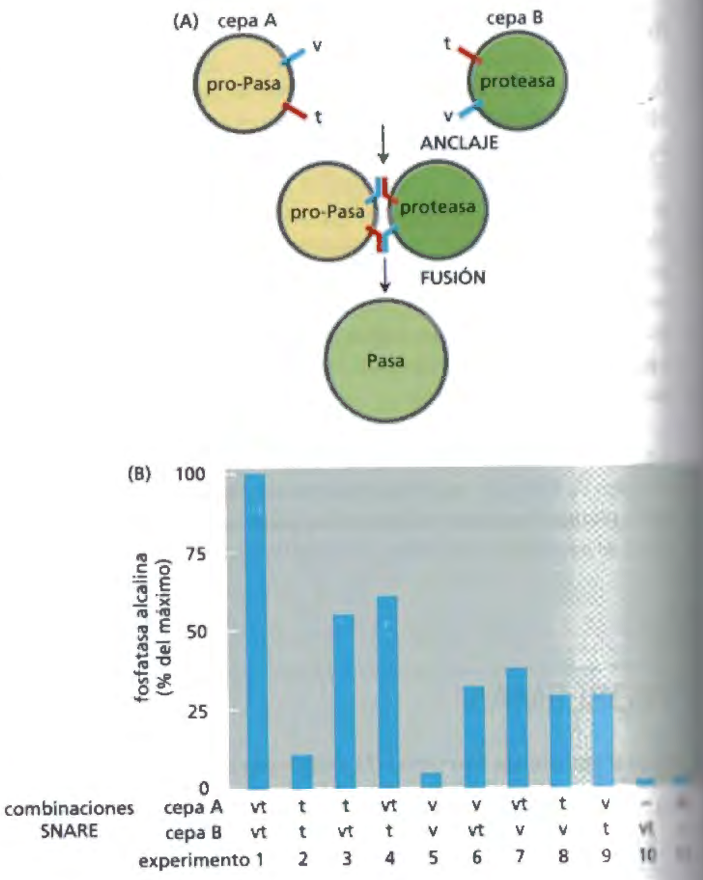


Figura P13–2 Requerimientos de SNARE para la fusión de las vesículas (Problema 13–10). (A) Esquema para medir la fusión de las vesículas vacuolares. (B) Resultado de la fusión de vesículas con diferentes combinaciones de v-SNARE y t-SNARE. Las SNARE presentes en las vesículas están marcadas como v (v-SNARE) y t (t-SNARE).

¿Qué se puede deducir del papel de las v- y t-SNARE vacuolares en el proceso de fusión de las vesículas vacuolares? ¿Tiene importancia el tipo de SNARE que se encuentre en cada vesícula?

13-11 Si se elimina la señal de recuperación al ER de la proteína disulfuro isomerasa (PDI: ***protein disulfide isomerase***), que habitualmente es una proteína soluble residente en el ER, ¿dónde estará la proteína PDI modificada?

13-12 El receptor KDEL, para realizar su función de asegurar la retención en el lumen del ER de las proteínas solubles residentes en el ER, tiene que desplazarse adelante y atrás entre el ER y el complejo de Golgi. ¿En qué compartimiento tiene que unir el receptor KDEL a su ligando con más intensidad? ¿En que compartimento lo hará más débilmente? ¿Cuál es la razón que podría explicar las diferencias de afinidad que se observan en los dos compartimientos? Si se diseñara el sistema ¿en qué compartimento situaríamos la máxima concentración de receptor KDEL? ¿Podríamos predecir que el propio receptor KDEL, que es una proteína transmembrana, presentaría una señal KDEL?

13-13 ¿De qué forma el pH bajo de los lisosomas puede suponer una protección para el resto de la célula frente a las enzimas lisosomales en caso de una rotura del orgánulo?

13-14 Los melanosomas son lisosomas especializados que almacenan pigmentos para su liberación ocasional mediante exocitosis. Varios tipos celulares como las células de la piel y las del cabello captan el pigmento, lo cual les da su coloración característica. A menudo, los ratones mutantes que tienen melanosomas defectuosos presentan colores suaves o inusuales. Uno de estos ratones mutantes, el raton *Mocha* (**Figura P13–3**), tiene un defecto en el gen de una de las subunidades del complejo de proteínas adaptadoras AP3 que está relacionado con la formación de vesículas recubiertas de clatrina en la red del *trans* Golgi. ¿De qué forma la pérdida de función AP3 puede provocar un defecto en los melanosomas?



Figura P13–3 Un ratón normal y el ratón *Mocha* (Problema 13-14). Además de su color claro, el ratón *Mocha* tiene disminuido su sentido del equilibrio. (Cortesía de Margit Burmeister.)

13-15 Pacientes con el síndrome de Hunter o con el síndrome de Hurler raramente superan la adolescencia. Estos pacientes acumulan glucosaminoglucanos en los lisosomas pues son incapaces de sintetizar las enzimas lisosómicas necesarias para su degradación. Cuando se fusionan las células de los pacientes de ambos síndromes los glucosaminoglucanos son correctamente degradados, lo que indica que las células carecen de enzimas degradativas diferentes. Si las células son cultivadas de forma conjunta son capaces de corregir sus defectos. Aún más sorprendente es el hecho de que el medio de cultivo procedente de un cultivo de células de Hurler es capaz de corregir el defecto en las células de Hunter (y viceversa). Los factores correctores presentes en el medio son inactivados por acción de proteasas, por tratamiento con periodato que destruye los carbohidratos y por tratamiento con fosfatasa alcalina que elimina los grupos fosfato.

A. ¿Cuáles son los factores correctores? Empezando por las células del paciente dador describir la ruta que siguen los factores hasta alcanzar el medio de cultivo y posteriormente entrar en las células diana para corregir los defectos lisosómicos.

B. ¿Cuál es la razón que explicaría que los tratamientos con proteasas, periodato y fosfatasa alcalina inactiven los factores correctores?

C. ¿Se producirá un tipo de efecto de corrección similar si se tratara de enzimas citosólicas mutantes?

13-16 Un macrófago ingiere mediante endocitosis cada media hora el equivalente al 100% de su membrana plasmática. ¿Cuál es la tasa de retorno de membrana por exocitosis?

13-17 Las células ingieren moléculas extracelulares mediante endocitosis mediada por receptor y endocitosis de fase fluida. Un trabajo clásico comparaba las eficiencias de las dos vías incubando células humanas durante varios periodos de tiempo con un factor de crecimiento epidérmico (EGF: ***epidermal growth factor***) marcado con ^{125}I, para medir la endocitosis mediada por receptor, o mediante peroxidasa de rábano (HRP: ***horseradish peroxidase***), para medir la endocitosis de fase fluida. Tanto el EGF como la HRP se localizan en pequeñas vesículas cuyo radio interno es de 20 nm. A concentraciones crecientes, la entrada de HRP en las células fue lineal (**Figura P13–4A**), mientras que la de EGF fue lineal al principio pero alcanzó un valor máximo que ya no fue superado a concentraciones superiores (Figura P13–4B).

A. Explicar por qué la forma de las curvas de la Figura P13–4 son diferentes para HRP y para EGF.

B. A partir de las curvas de la Figura P13–4 estimar la diferencia en las tasas de entrada entre HRP y EGF cuando ambas se encuentran a 40 nM. ¿Cuál sería la diferencia si ambas se encontraran a 40 μM?

C. Calcular el número medio de moléculas HRP que son incorporadas a cada una de las vesículas de endocitosis (radio 20 nm) cuando el medio contiene 40 μM HRP. [El volumen de una esfera es $(4/3)\pi r^3$.]

D. Los científicos que hicieron estos experimentos dijeron en su momento: "Estos cálculos demuestran claramente cómo las células internalizan EGF mediante endocitosis, excluyendo todo el medio extracelular, excepto quizás pequeñas cantidades". ¿Qué significa esta afirmación?

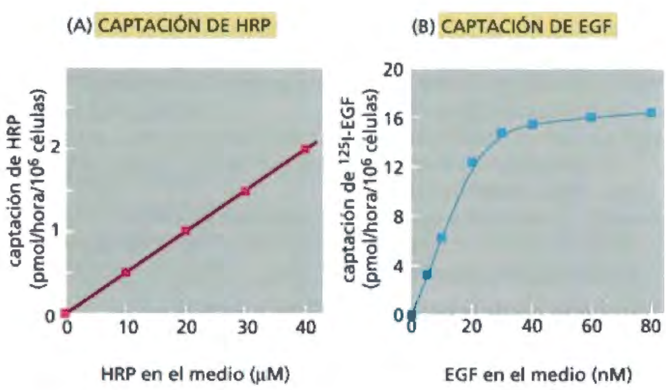


Figura P13–4 Ingesta de HRP y EGF en función de su concentración en el medio (Problema 13–17).

BIBLIOGRAFÍA

General

Bonifacino JS & Glick BS (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116:153–66.

Mellman I & Warren G (2000) The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* 100:99–112.

Pelham HR (1999) The Croonian Lecture 1999. Intracellular membrane traffic: getting proteins sorted. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:1471–1478.

Rothman JE & Wieland FT (1996) Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272:227–234.

Schekman RW (1994) Regulation of membrane traffic in the secretory pathway. *Harvey Lect* 90:41–57.

Mecanismos moleculares de transporte de membrana y de mantenimiento de la diversidad de los compartimientos

Di Paolo G & De Camilli P (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443:651–657.

Grosshans BL, Ortiz D & Novick P (2006) Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:11821–11827.

Gurkan C, Stagg SM & Balch WE (2006) The COPII cage: unifying principles of vesicle coat assembly. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:727–738.

Jahn R & Scheller RH (2006) SNAREs—engines for membrane fusion. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:631–643.

Kirchhausen T (2000) Three ways to make a vesicle. *Nature Rev Mol Cell Biol* 1:187–198.

McNew JA, Parlati F, Sollner T & Rothman JE (2000) Compartmental specificit y of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* 407:153–159.

Pfeffer SR (1999) Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nature Cell Biol* 1:E17–E22.

Robinson MS & Bonifacino JS (2001) Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol* 13:444–453.

Seaman MN (2005) Recycle your receptors with retromer. *Trends Cell Biol* 15:68–75.

Springer S, Spang A & Schekman RW (1999) A primer on vesicle budding. *Cell* 97:145–148.

Transporte desde el ER a través del complejo de Golgi

Bannykh SI, Nishimura N & Balch WE (1998) Getting into the Golgi. *Trends Cell Biol* 8:21–25.

Ellgaard L & Helenius A (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4:181–191.

Farquhar MG & Palade GE (1998) The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol* 8:2–10.

Glick BS (2000) Organization of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* 12:450–456.

Ladinsky MS, Mastronarde DN et al (1999) Golgi structure in three dimensions: functional insights from the normal rat kidney cell. *J Cell Biol* 144:1135–1149.

Lee MC, Miller EA, Goldberg J et al (2004) Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:87–123.

Pelham HR & Rothman JE (2000) The debate about transport in the Golgi–two sides of the same coin? *Cell* 102:713–719.

Warren G & Malhotra V (1998) The organisation of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* 10:493–498.

Wells L & Hart GW (2003) O-GlcNAc turns twenty: functional implications for post-translational modification of nuclear and cytosolic proteins with a sugar. *FEBS Lett* 546:154–158.

Zeuschner D, Geerts WJ & Klumperman J (2006) Immuno-electron tomography of ER exit sites reveals the existence of free COPII-coated transport carriers. *Nature Cell Biol* 8:377–383.

Transporte desde la red del *trans* Golgi a los lisosomas

Andrews NW (2000) Regulated secretion of conventional lysosomes. *Trends Cell Biol* 10:316–321.

de Duve C (2005) The lysosome turns fifty. *Nature Cell Biol* 7:847–849.

Kornfeld S & Mellman I (1989) The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* 5:483–525.

Levine B & Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6:463–477.

Noda T, Suzuki K & Ohsumi Y (2002) Yeast autophagosomes: *de novo* formation of a membrane structure. *Trends Cell Biol* 12:231–235.

Futerman AH & van Meer G (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5:554–565.

Peters C & von Figura K (1994) Biogenesis of lysosomal membranes. *FEBS Lett* 346:108–114.

Rouille Y, Rohn W & Hoflack B (2000) Targeting of lysosomal proteins. *Semin Cell Dev Biol* 11:165–171.

Transporte hacia el interior de la célula desde la membrana plasmática: endocitosis

Anderson RG (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67:199–225.

Bonifacino JS & Traub LM (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 72:395–447.

Brown MS & Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34–47.

Conner SD & Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422:37–44.

Gruenberg J & Stenmark H (2004) The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5:317–323.

Hicke L (2001) A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* 106:527–530.

Katzmann DJ, Odorizzi G & Emr S (2002) Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3:893–905.

Maxfield FR & McGraw TE (2004) Endocytic recycling. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5:121–132.

Mellman I (1996) Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:575–625.

Pelkmans L & Helenius A (2003) Insider information:what viruses tell us about endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 15:414–422.

Tjelle TE, Lovdal T et al (2000) Phagosome dynamics and function. *BioEssays* 22:255–263.

Yeung T, Ozdamar B & Grinstein S (2006) Lipid metabolism and dynamics during phagocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 18:429–437.

Transporte desde la red del *trans* Golgi hacia el exterior celular: exocitosis

Burgess TL & Kelly RB (1987) Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu Rev Cell Biol* 3:243–293.

Dietrich C, Volovyk ZN & Jacobson K (2001) Partitioning of Thy-1, GM1, and cross-linked phospholipid analogs into lipid rafts reconstituted in supported model membrane monolayers. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10642–10647.

Martin TF (1997) Stages of regulated exocytosis. *Trends Cell Biol* 7:271–276.

Mostov K, Su T et al (2003) Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nature Cell Biol* 5:287–293.

Murthy VN & De Camilli P (2003) Cell biology of the presynaptic terminal. *Annu Rev Neurosci* 26:701–728.

Schuck S & Simons K (2004) Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J Cell Sci* 117(Pt 25): 5955–5964.

Simons K & Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569–572.

Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27:509–547.

Tooze SA (1998) Biogenesis of secretory granules in the trans-Golgi network of neuroendocrine and endocrine cells. *Biochim Biophys Acta* 1404:231–244.

Traub LM & Kornfeld S (1997) The trans-Golgi network: a late secretory sorting station. *Curr Opin Cell Biol* 9:527–533.

Conversión energética: mitocondrias y cloroplastos

14

En este capítulo

LA MITOCONDRIA	815
LAS CADENAS DE TRANSPORTE DE ELECTRONES Y SUS BOMBAS DE PROTONES	827
CLOROPLASTOS Y FOTOSÍNTESIS	840
SISTEMAS GENÉTICOS DE MITOCONDRIAS Y PLASTIDIOS	855
LA EVOLUCIÓN DE LAS CADENAS DE TRANSPORTE DE ELECTRONES	870

La energía que se deriva de la oxidación parcial de moléculas de carbohidratos ricas en energía es utilizada para formar ATP, la principal moneda energética en las células (tratado en el Capítulo 2), a través de un conjunto de reacciones que tienen lugar en el citosol. Pero en la historia de la vida apareció muy pronto un proceso mucho más eficiente de producción energética. Este proceso requiere una membrana y permite a las células adquirir energía a partir de una amplia variedad de fuentes. Por ejemplo, tan importante es para la conversión de la energía de la luz en energía de enlace químico en la fotosíntesis, como para la respiración aeróbica que permite utilizar oxígeno para producir grandes cantidades de ATP a partir de las moléculas de los alimentos.

Los procariotas utilizan su membrana plasmática para producir ATP. Pero en las células eucariotas la membrana plasmática está reservada para los procesos de transporte descritos en el Capítulo 11. En su lugar, las células eucariotas utilizan las membranas especializadas situadas en el interior de unos *orgánulos transformadores de energía* para producir la mayor parte de todo el ATP celular. Entre los orgánulos envueltos por una membrana están las **mitocondrias**, que están presentes en las células de casi todos los organismos eucariotas (incluyendo hongos, animales, plantas, algas y protozoos) y los **plastos** –especialmente los **cloroplastos**– presentes sólo en las plantas y en las algas. Al observar electromicrografías, el rasgo morfológico más sorprendente tanto de mitocondrias como de cloroplastos es la gran cantidad de membrana interna que tienen. Esta membrana interna proporciona el marco para un elaborado conjunto de procesos de transporte de electrones que produce la mayor parte del ATP de las células.

La ruta común mediante la cual mitocondrias, cloroplastos y procariotas se proveen de energía necesaria para sus funciones biológicas actúa a través de un proceso conocido como **acoplamiento quimiosmótico**, nombre que indica la unión entre las reacciones que forman el enlace químico que genera ATP ("quimio") y el proceso de transporte de membrana ("osmótico"). El proceso de acoplamiento consiste en dos fases interrelacionadas llevadas a cabo por complejos proteicos embebidos en una membrana:

Fase 1. Los electrones de alta energía (derivados de la oxidación de las moléculas de los alimentos, de la acción de la luz del sol o de otras fuentes que veremos más adelante) son transferidos a través de una serie de transportadores de electrones embebidos en la membrana. Estas transferencias de electrones liberan energía que es utilizada para bombear protones (H^+, derivados del agua, que es ubicua en las células) a través de la membrana y así generar un *gradiente electroquímico de protones*. Como se describe en el Capítulo 11, un gradiente de iones a través de una membrana es una forma de almacenar energía; esta energía puede ser aprovechada para realizar un trabajo útil cuando los iones fluyen a través de la membrana a favor de su gradiente electroquímico.

Fase 2. Los H^+ fluyen a favor de su gradiente electroquímico, a través de una máquina proteica denominada *ATP sintasa*, la cual cataliza la síntesis (dependiente de energía) de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (P_i). Esta enzima ubicua actúa como una turbina y permite que el gradiente de protones impulse la producción de ATP (**Figura 14–1**).

El gradiente electroquímico de protones también hace funcionar otras máquinas proteicas embebidas en las membranas (**Figura 14–2**). En los eucariotas, algunas proteínas especiales acoplan el flujo a favor de gradiente de H^+ al transporte de determinados metabolitos hacia adentro o hacia afuera de los orgánulos. En las bacterias, el gradiente electroquímico de protones se utiliza, además de para la síntesis de ATP y los procesos de transporte, como

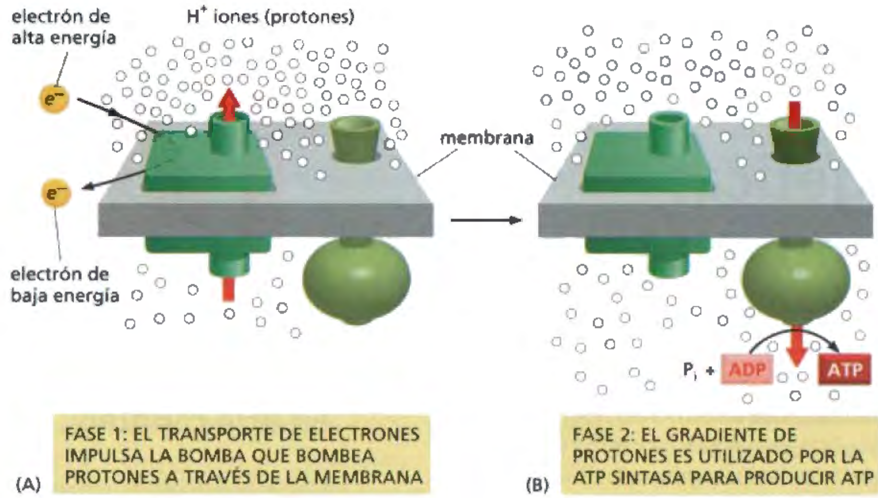


Figura 14–1 Utilización de la energía para la vida. (A) Los requerimientos esenciales para la quimiosmosis son una membrana –en la que estén embebidas una bomba proteica y una ATP sintasa– y una fuente de electrones de alta energía (e^-). Los protones que se muestran en la figura (H^+) se captan libremente a partir del agua. La bomba utiliza la energía de la transferencia de los electrones (aquí no se muestran detalles) para bombear protones procedentes del agua y generar un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana. (B) Este gradiente actúa como almacén de energía, que puede ser utilizada para impulsar la síntesis de ATP por la ATP sintasa. La *flecha roja* indica la dirección del desplazamiento de los protones en cada fase.

almacén de energía utilizable directamente y también para llevar a cabo la rápida rotación del flagelo bacteriano, lo que permite a la bacteria desplazarse.

El juego completo de proteínas de membrana, junto con las moléculas pequeñas que participan en la secuencia ordenada de transferencia de electrones, se denomina **cadena de transporte de electrones**. El mecanismo del transporte de electrones es análogo al de una central eléctrica que conduce una corriente a través de un conjunto de bombas eléctricas. Sin embargo, en los sistemas biológicos los electrones son transportados entre un lugar y otro no por cables eléctricos sino por moléculas que difunden, que pueden captar electrones en una localización y liberarlos en otra localización. En el caso de la mitocondria, el primero de estos transportadores de electrones es el NAD^+, que capta dos electrones (y un H^+) transformándose en NADH, una pequeña molécula soluble en agua que transporta electrones desde los lugares donde se degradan las moléculas alimenticias hasta la membrana mitocondrial interna.

En la **Figura 14–3** se compara el proceso de transporte de electrones de la mitocondria, que transforma la energía de compuestos químicos, con el proceso que tiene lugar en los cloroplastos, que transforma la energía de la luz solar. En la mitocondria, los electrones que han sido liberados en la degradación de las moléculas de carbohidratos a CO_2 son transferidos a través de la membrana por una cadena de transportadores de electrones, que finalmente reducirán al oxígeno gas (O_2) hasta agua. La energía libre liberada cuando los electrones fluyen desde un estado de alta energía a uno de baja energía, dirige una serie de tres bombas de H^+ de la membrana mitocondrial interna; el tercer H^+ bombeado de la serie es el que cataliza la transferencia de los electrones al O_2 (véase Figura 14–3A).

Aunque el cloroplasto se puede describir en unos términos similares y algunos de sus componentes principales son muy parecidos a los de la mitocondria, la membrana del cloroplasto tiene algunos componentes cruciales que no se encuentran en la membrana mitocondrial. Los más importantes de estos componentes son los *fotosistemas*, lugares en los que el pigmento verde denominado clorofila captura la energía de la luz y la aprovecha para dirigir la transferencia de electrones, tal como las fotocélulas de los paneles solares absorben la energía de la luz y dirigen una corriente eléctrica. La fuerza electromotriz generada por los fotosistemas del cloroplasto impulsan el transporte de electrones en dirección opuesta que en el caso de las mitocondrias: los electrones son recogidos *desde* la molécula del agua produciendo O_2 y son cedidos *al* CO_2 (vía NADPH, un compuesto estrechamente relacionado con el NADH) para sintetizar carbohidratos. De esta forma, el cloroplasto genera O_2 y carbohidratos, mientras que la mitocondria los consume (véase Figura 14–3B).

Se cree que los orgánulos transformadores de energía de las células eucariotas evolucionaron a partir de procariotas que fueron endocitados por células eucariotas primitivas y desarrollaron una relación simbiótica con ellos (se explica en el Capítulo 12). Esta hipótesis explica por qué las mitocondrias y los cloroplastos tienen su propio DNA, que codifica algunas de sus proteínas. Desde su captación inicial por una célula huésped estos orgánulos han perdido gran parte de su genoma y se han vuelto notablemente dependientes de proteínas que son codificadas por genes en el núcleo celular, sintetizadas en el citosol y entonces importadas al orgánulo. De forma recíproca, las células huésped han llegado a depender de

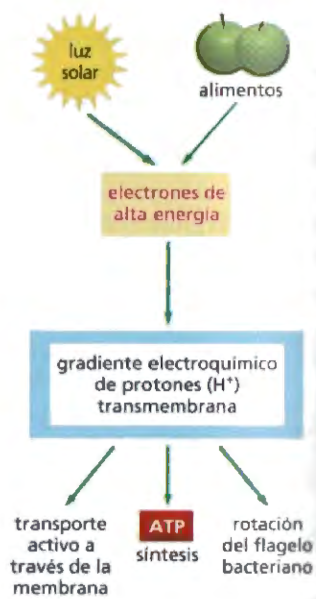


Figura 14–2 Acoplamiento quimiosmótico. La energía procedente de la luz solar o de la oxidación de los alimentos, se utiliza en primer lugar para generar un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana. Este gradiente constituye un almacén versátil de energía en la mitocondria, los cloroplastos y las bacterias que impulsan diversas reacciones que requieren energía.

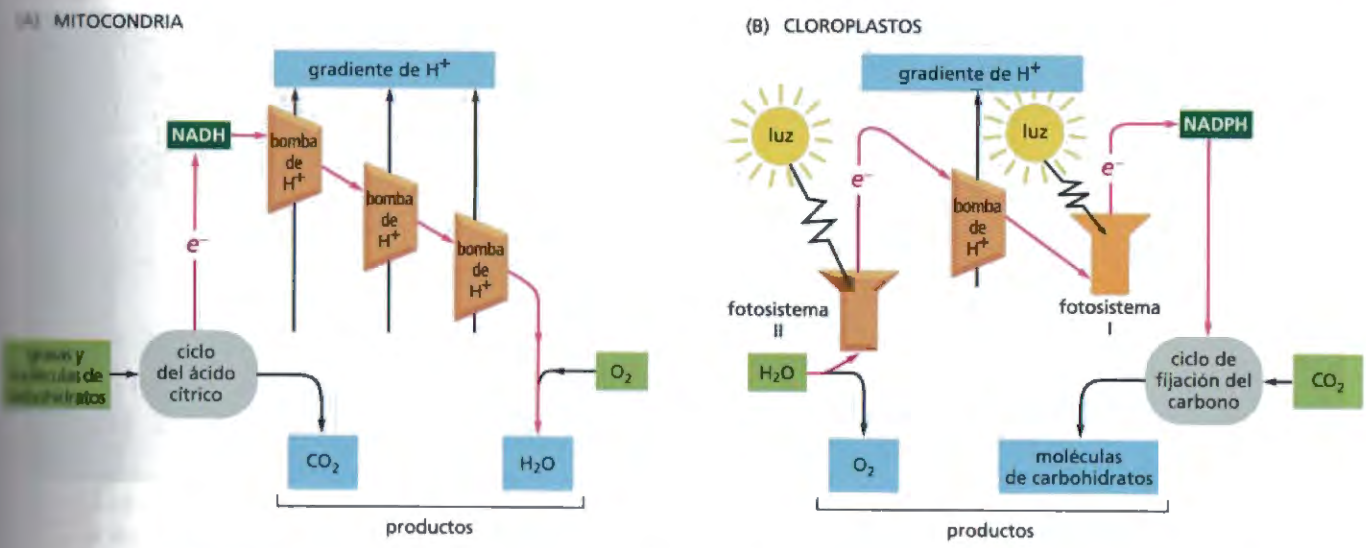


Figura 14–3 Procesos del transporte electrónico. (A) La mitocondria convierte energía a partir de compuestos químicos. (B) El cloroplasto transforma energía a partir de la luz solar. Las entradas se indican en *verde claro*, los productos en *azul* y el camino del flujo de electrones se indica con *flechas rojas*. Cada complejo proteico (*naranja*) está embebido en la membrana. Nótese que la fuerza protón-motriz generada por los dos fotosistemas del cloroplasto impulsa la transferencia de electrones desde el H_2O hasta los carbohidratos, es decir, en sentido *opuesto* a la dirección energéticamente favorable del transporte de electrones en la mitocondria. Así, mientras que en la mitocondria las moléculas de los carbohidratos y el O_2 figuran como entradas, en el cloroplasto representan los productos.

estos orgánulos no sólo de la gran cantidad de ATP que necesitan para llevar a cabo la biosíntesis, el bombeo de iones y la motilidad, sino también de determinadas reacciones biosintéticas que ocurren en su interior.

LA MITOCONDRIA

La **mitocondria** ocupa una parte sustancial del volumen citoplasmático de las células eucariotas y han sido esenciales para la evolución de los animales pluricelulares. Sin las mitocondrias las células animales actuales dependerían de la glucólisis anaeróbica para formar ATP. Cuando la glucólisis transforma la glucosa en piruvato, sólo se libera una pequeña fracción del total de la energía libre que es potencialmente disponible a partir de la oxidación de la glucosa. En las mitocondrias, el metabolismo de los azúcares es completo: el piruvato es importado a la mitocondria y oxidado por el O_2 hasta CO_2 y H_2O, lo que permite producir 15 veces más ATP que si se sólo se utilizara la glucólisis.

Las mitocondrias suelen describirse como cilindros alargados y rígidos, de un diámetro comprendido entre 0,5 y 1 μm y parecidos a bacterias. Sin embargo, la microcinematografía a intervalos de tiempo de las células vivas revela que las mitocondrias son orgánulos claramente móviles y plásticos, que cambian constantemente de forma (**Figura 14–4**) e incluso que se fusionan unas con otras y se vuelven a separar. Cuando se desplazan por el citoplasma, las mitocondrias aparecen a menudo asociadas a los microtúbulos (**Figura 14–5**), lo que quizás determina su orientación y distribución típica en los diferentes tipos celulares. Así, las mitocondrias de algunas células forman largos filamentos o cadenas móviles, mientras que otras se mantienen en una posición fija en la que pueden proporcionar ATP de forma directa a lugares de un consumo superior al normal de ATP –por ejemplo, existen un gran número de mitocondrias empaquetadas entre las miofibrillas adyacentes en las células del músculo cardíaco o mitocondrias densamente agrupadas alrededor del flagelo en los espermatozoides (**Figura 14–6**).

Las mitocondrias son lo bastante grandes como para poder observarse al microscopio óptico y fueron identificadas por primera vez durante el siglo XIX. Sin embargo, el progreso real en el conocimiento de su función dependió de procedimientos para aislar mitocondrias intactas, desarrollados en 1948. Por cuestiones técnicas, la mayoría de los estudios bioquímicos se realizaron en mitocondrias purificadas de hígado; cada célula hepática contiene entre 1000 y 2000 de estos orgánulos, los cuales ocupan alrededor de una quinta parte del volumen celular.



Figura 14–4 Plasticidad mitocondrial. Cuando se observa una mitocondria en una célula viva, con frecuencia se aprecian en ella rápidos cambios de forma.

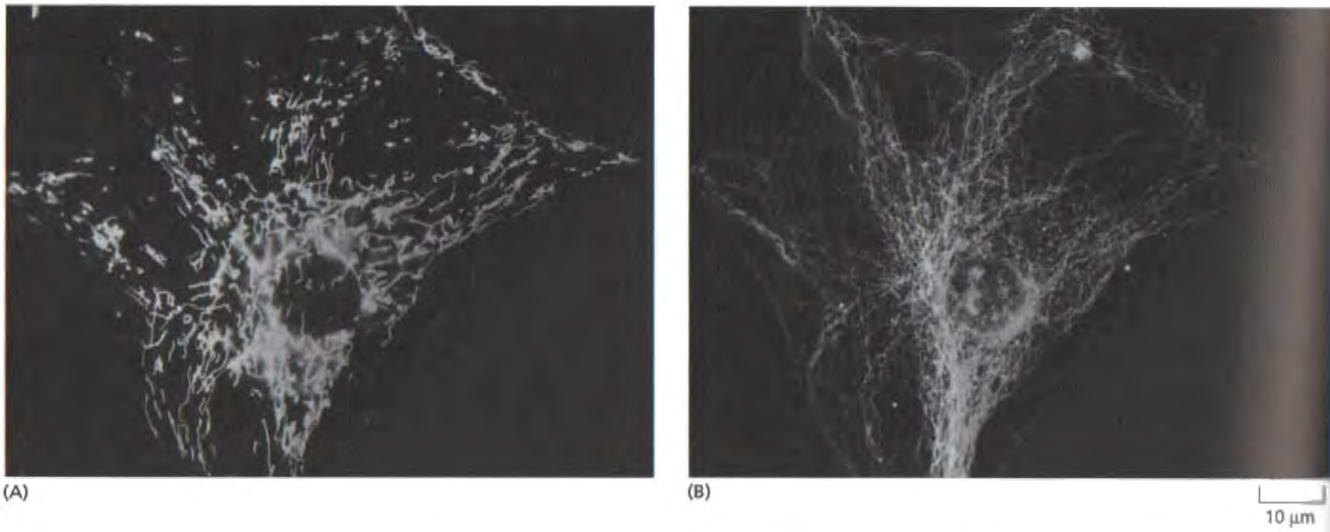


Figura 14–5 Relaciones entre las mitocondrias y los microtúbulos. (A) Micrografía de cadenas de mitocondrias alargadas observadas en una célula viva de mamífero mantenida en cultivo. La célula fue contrastada con un colorante vital fluorescente (la rodamina 123) que marca de forma específica las mitocondrias. (B) Micrografía de inmunofluorescencia de la misma célula anterior pero fijada y contrastada con anticuerpos fluorescentes que se unen a los microtúbulos. Nótese que las mitocondrias tienden a alinearse a lo largo de los microtúbulos. (Por cortesía de Lan Bo Chen.)

La mitocondria presenta una membrana externa, una interna y dos compartimientos internos

Cada mitocondria está rodeada por dos membranas altamente especializadas y con funciones muy diferentes. Ambas membranas definen dos compartimientos mitocondriales diferentes: la **matriz** interna y un **espacio intermembrana** más estrecho que el anterior. Si las mitocondrias purificadas se rompen suavemente y luego se fraccionan sus distintos componentes (**Figura 14–7**), se puede determinar la composición bioquímica de cada una de las dos membranas y del espacio que delimitan. Cada una de ellas contiene una colección característica de proteínas. La mayoría de las alrededor de 1000 proteínas mitocondriales están codificadas en el núcleo y son importadas a la mitocondria desde el citoplasma por proteínas translocasa especializadas de las membranas mitocondriales externa (TOM: *translocase of the **o**uter **m**embrane*; translocasa de la membrana externa) e interna (TIM: *translocase of the **i**nner **m**embrane*; translocasa de la membrana interna) (se describe en el Capítulo 12)

La **membrana externa** contiene muchas moléculas de *porina*, un tipo de proteína transportadora que forma anchos canales acuosos a través de la bicapa lipídica (se trata en el Capítulo 11). Así, esta membrana se parece a un tamiz permeable a todas las moléculas de menos de 5000 daltons, incluidas pequeñas proteínas. Estas moléculas pueden penetrar en el espacio intermembranoso, pero la mayoría de ellas no pueden atravesar la membrana interna, que es impermeable. Esto significa que, mientras que el espacio intermembranoso es químicamente equivalente al citosol respecto a las pequeñas moléculas que contiene, el espacio de la matriz contiene un grupo de estas moléculas muy seleccionado.

Como explicaremos con detalle más adelante, el principal compartimiento de la mitocondria desde el punto de vista funcional es la matriz y la **membrana interna** que lo delimita. La membrana mitocondrial interna está altamente especializada. En su bicapa lipídica contiene una elevada proporción del fosfolípido "doble" *cardiolipina*, que tiene cuatro ácidos

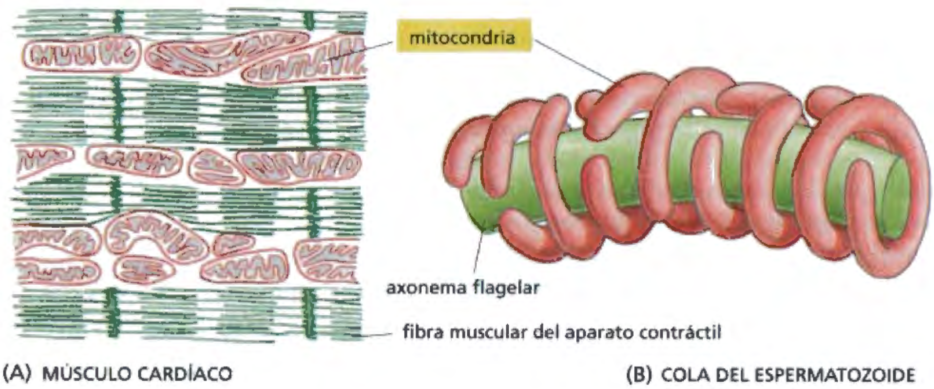
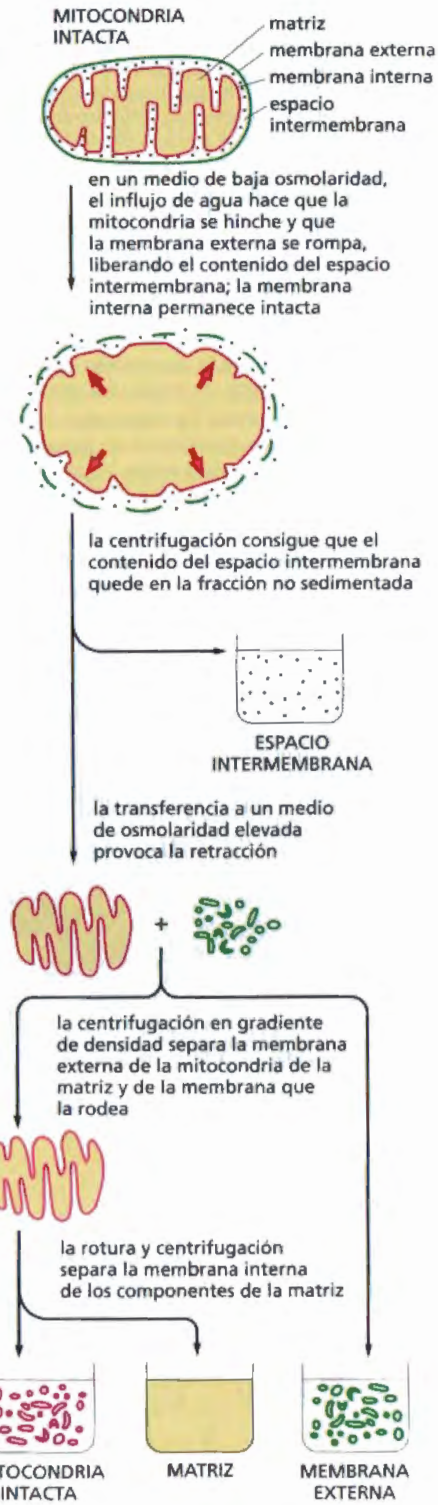


Figura 14–6 Localización de las mitocondrias en el músculo cardíaco y en la cola del espermatozoide, cerca de los lugares en los que se utilizan grandes cantidades de ATP. El músculo cardíaco (A) de la pared del corazón es el músculo más utilizado en el cuerpo, y sus continuas contracciones requieren un suministro seguro de energía. Tiene una reserva de energía limitada y depende del suministro constante de ATP de las numerosas mitocondrias alineadas cerca de las fibras musculares contráctiles (véase p. 1031). Durante el desarrollo del flagelo de la cola del espermatozoide (B), unos microtúbulos se enroscan de forma helicoidal alrededor del axonema, donde al parecer condicionan la localización de las mitocondrias en la cola; después, estos microtúbulos desaparecen y las mitocondrias se fusionan unas con otras dando lugar a la estructura que se muestra en la ilustración.

Figura 14–7 **Fraccionamiento bioquímico de mitocondrias purificadas en sus componentes.** Estas técnicas han hecho posible estudiar las diferentes proteínas de cada compartimiento mitocondrial. El método mostrado, que permite el procesamiento de un gran número de mitocondrias al mismo tiempo, aprovecha el hecho de que en un medio con una fuerza osmótica baja, el agua fluye hacia dentro de la mitocondria y dilata el espacio matricial (*amarillo*). Las crestas de la membrana mitocondrial interna le permiten desplegarse acomodándose a la expansión, pero la membrana externa –que no tiene pliegues– se rompe, liberando una estructura compuesta sólo por la membrana interna y la matriz.



grasos que al parecer colaboran haciendo que la membrana sea especialmente impermeable a los iones (véase Figura 14–65). Esta membrana también presenta diversas proteínas de transporte que hacen que la membrana sea permeable de forma selectiva a las pequeñas moléculas metabolizadas o que son necesarias por las numerosas enzimas mitocondriales que se hallan concentradas en la matriz. Entre estas enzimas se encuentran las que metabolizan el piruvato y los ácidos grasos hasta acetil CoA y las que oxidan el acetil CoA en el *ciclo del ácido cítrico*. Los principales productos finales de esta oxidación son el CO_2, que es eliminado de la célula, y el NADH, que constituye la principal fuente de electrones que serán transportados a través de la **cadena respiratoria**, es decir, la cadena de transporte de electrones de la mitocondria. Las enzimas de la cadena respiratoria están situadas en la membrana mitocondrial interna y son esenciales para todo el proceso de la *fosforilación oxidativa*, que genera la mayoría del ATP de la célula animal.

Como se ilustra en la **Figura 14–8**, la membrana mitocondrial interna suele estar muy replegada, formando una serie de dobleces dirigidos hacia la matriz, denominados **crestas**. Estas invaginaciones aumentan notablemente el área de la membrana interna, de forma que en las células de hígado, por ejemplo, constituyen alrededor de una tercera parte del total de la membrana de la célula. El número de crestas de las mitocondrias de las células del músculo cardíaco es tres veces mayor que el de las mitocondrias de una célula hepática, debido probablemente a la mayor demanda de ATP de las células del corazón. Además de las diferencias morfológicas, existen también diferencias sustanciales en las enzimas mitocondriales de diferentes tipos celulares. Sin embargo, en este capítulo prescindiremos de estas diferencias y se centrará la atención en las enzimas y en las propiedades que son comunes a todas las mitocondrias.

El ciclo del ácido cítrico genera electrones de alta energía

Las mitocondrias pueden utilizar como combustible tanto el piruvato como los ácidos grasos. El piruvato procede de la glucosa y de otros azúcares; los ácidos grasos proceden de las grasas. Ambos tipos de moléculas combustibles son transportados a través de la membrana mitocondrial interna y son transformados por enzimas localizadas en la matriz mitocondrial en un intermediario metabólico crucial, el *acetil CoA*. Después, los grupos acetilo del acetil CoA son oxidados en la matriz a través del **ciclo del ácido cítrico**, descrito en el Capítulo 2. El ciclo convierte los átomos de carbono del acetilo del acetil-CoA, en CO_2, el cual es eliminado de la célula como producto de desecho. Sin embargo, lo más importante es que esta oxidación genera electrones de alta energía, que son transportados por las moléculas transportadoras activadas NADH y $FADH_2$ (**Figura 14–9**). Estos electrones de alta energía son transferidos a la membrana mitocondrial interna, donde entran en la cadena de transporte de electrones; la cesión de estos electrones regenera el NAD^+ y el FAD necesarios para que el metabolismo oxidativo continúe. En la **Figura 14–10** se presenta de forma esquemática la secuencia completa de reacciones.

Un proceso quimiosmótico transforma la energía de oxidación en ATP

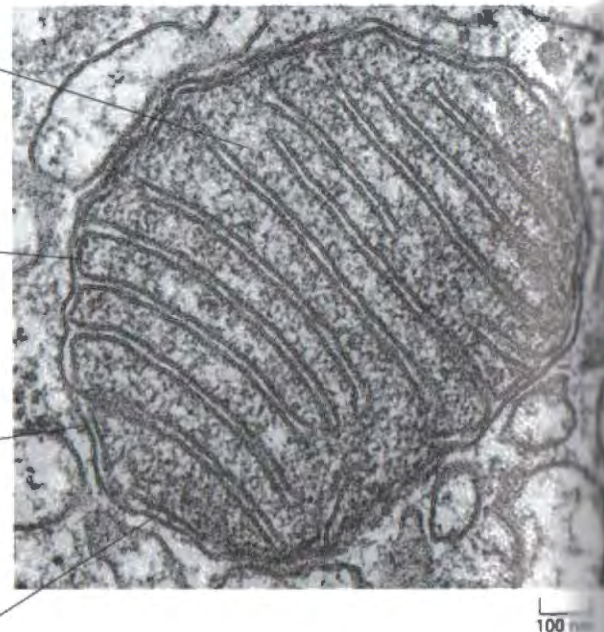
A pesar de que el ciclo del ácido cítrico es considerado como parte del metabolismo aeróbico, en este proceso no se utiliza oxígeno. Sólo se consume directamente oxígeno molecular (O_2) al final, en las reacciones catabólicas que tienen lugar en la membrana mitocondrial interna. Casi toda la energía disponible a partir de la combustión de los carbohidratos, grasas y otros nutrientes, obtenidos de los sustratos por el NAD^+ y el FAD, se almacena al inicio en forma

Matriz. Este gran espacio interior contiene una mezcla muy concentrada de centenares de enzimas, incluyendo las necesarias para la oxidación del piruvato, la oxidación de los ácidos grasos y el ciclo del ácido cítrico. La matriz también contiene algunas copias idénticas del genoma mitocondrial, ribosomas mitocondriales especiales, tRNA y varias enzimas necesarias para la expresión de genes mitocondriales.

Membrana interna. La membrana interna está replegada en numerosas crestas, que incrementan considerablemente su superficie total. Contiene proteínas de tres tipos de funciones: (1) las que llevan a cabo las reacciones de oxidación de la cadena de transporte de electrones; (2) la ATP sintasa que produce ATP en la matriz, y (3) proteínas transportadoras que permiten el paso de metabolitos hacia la matriz y hacia el exterior. A través de esta membrana se establece un gradiente electroquímico de H^+ que impulsa a la ATP sintasa, por lo que la membrana debe ser impermeable a los iones y a la mayor parte de moléculas pequeñas cargadas.

Membrana externa. La membrana externa contiene una gran cantidad de una proteína formadora de canales (denominada porina, VDAC), por lo que es permeable a todas las moléculas de menos de 5000 daltons. Otras proteínas de esta membrana son las enzimas implicadas en la síntesis mitocondrial de lípidos y las que transforman sustratos lipídicos en compuestos que posteriormente serán metabolizadas en la matriz, receptores de importación de proteínas mitocondriales y la maquinaria enzimática para la división y la fusión del orgánulo.

Espacio intermembrana. Este espacio contiene varias enzimas que utilizan el ATP que sale de la matriz, para fosforilar otros nucleótidos.



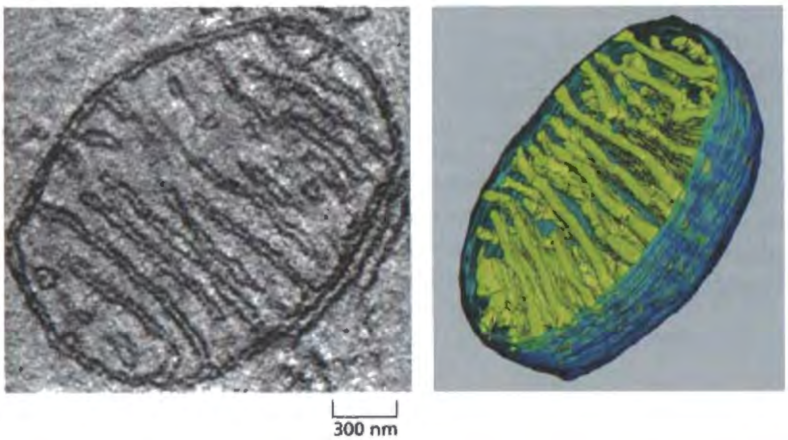


Figura 14–8 Estructura de una mitocondria. <CGAT> Se estima que un 67% del total de la proteína mitocondrial del hígado está localizado en la matriz de las mitocondrias, un 21% está localizado en la membrana interna, un 6% en la membrana externa y un 6% en el espacio intermembrana. Como se indica, cada una de las cuatro regiones de una mitocondria tiene un conjunto de proteínas característico que permite a cada compartimiento llevar a cabo funciones diferentes. (Electromicrografía grande por cortesía de Daniel S. Friend; electromicrografía pequeña y reconstrucción tridimensional de T.G. Frey, C.W. Renken y G.A. Perkins, *Biochim. Biophys. Acta* 1555:196-203, 2002. Con la autorización de Elsevier.)

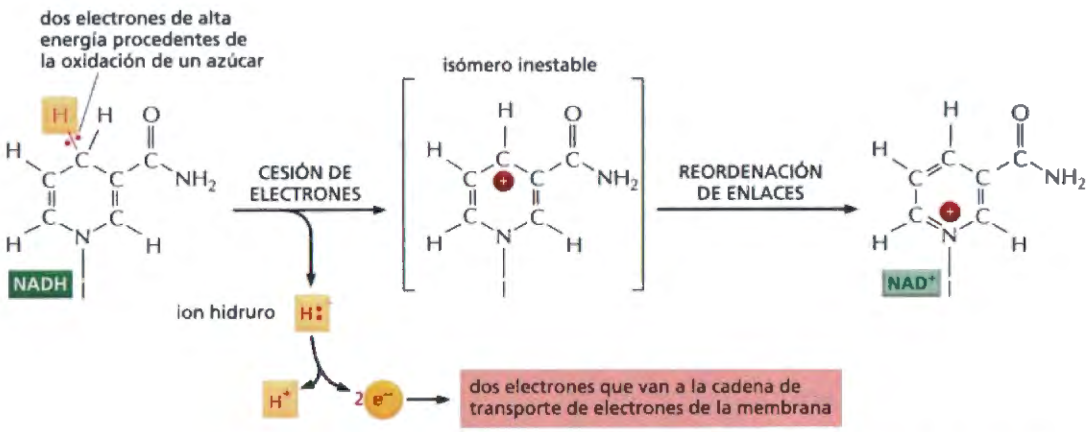


Figura 14–9 De qué forma el NADH cede electrones. En este esquema, los electrones de alta energía están representados por dos *puntos rojos* sobre el átomo de hidrógeno, en *amarillo*. El NADH cede un ion hidruro (H^-, un átomo de hidrógeno con un electrón extra) que es transformado en un protón y dos electrones de alta energía: $H^- \rightarrow H^+ + 2e^-$. En la figura sólo se muestra el anillo que transporta los electrones en un enlace de alta energía; para observar la estructura completa y la conversión de NAD^+ en NADH, véase en la Figura 2–60, la estructura del NADPH, compuesto muy relacionado con el NADH. Los electrones también son transportados, de forma similar, por el $FADH_2$, cuya estructura se muestra en la Figura 2–83.

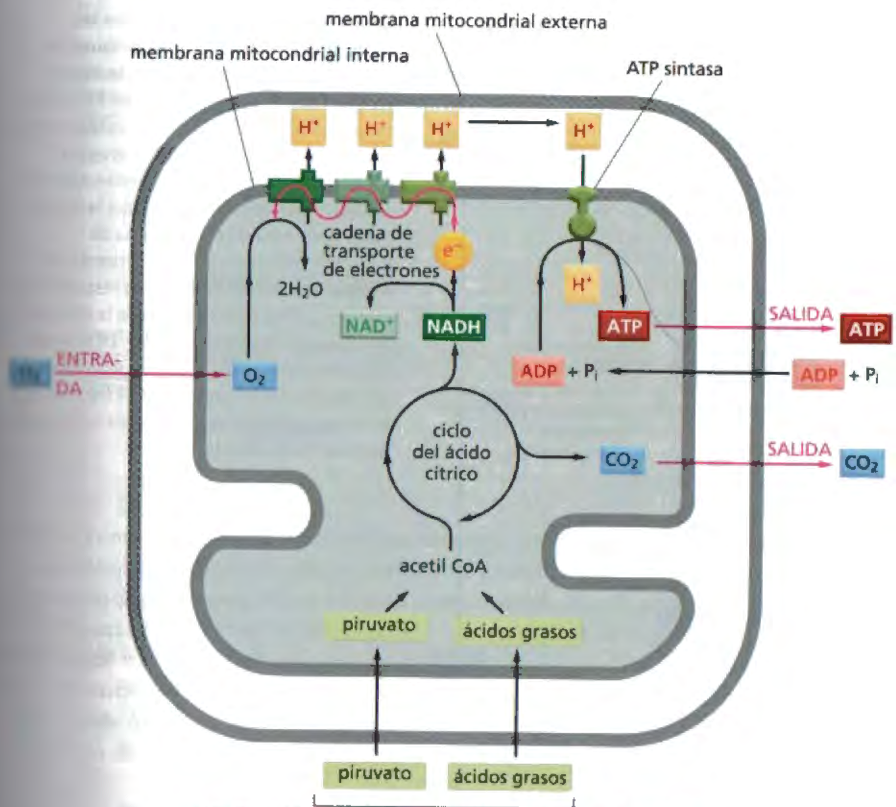


Figura 14–10 Resumen del metabolismo productor de energía de las mitocondrias. El piruvato y los ácidos grasos entran en la mitocondria (*parte inferior*) dando lugar a acetil CoA, que será metabolizado por el ciclo del ácido cítrico, el cual reduce el NAD^+ a NADH (y el FAD a $FADH_2$, aunque aquí no se muestran). En el proceso de la fosforilación oxidativa, los electrones de alta energía procedentes del NADH (y del $FADH_2$) pasan a lo largo de la cadena de transporte de electrones hasta el oxígeno (O_2). Este transporte de electrones genera un gradiente de protones a través de la membrana interna que impulsa la producción de ATP por la ATP sintasa (véase Figura 14–1). El NADH generado en el citosol por la glucólisis también transfiere electrones a la cadena respiratoria (no se muestra en la figura). Dado que el NADH no puede pasar a través de la membrana mitocondrial interna, la transferencia electrónica desde el NADH citosólico se tiene que efectuar de manera indirecta por medio de un (de entre varios) sistema de "lanzadera", que transporta otros compuestos reducidos al interior de la mitocondria; después de ser oxidado, este compuesto vuelve al citosol, donde es reducido de nuevo por el NADH (véase también la Figura 14–32).

los electrones de alta energía. Estos electrones, transportados por el NADH y el $FADH_2$, reaccionan con el O_2 en la cadena respiratoria embebida en la membrana mitocondrial interna. La membrana mitocondrial interna aprovecha la gran cantidad de energía liberada para impulsar la transformación de ADP + P_i en ATP. Por esta razón, para describir esta serie de reacciones se utiliza el término **fosforilación oxidativa** (**Figura 14–11**).

Como ya hemos mencionado, la producción de ATP por la fosforilación oxidativa en la cadena respiratoria depende de un proceso quimiosmótico. Cuando fue propuesto por primera vez en 1961, este mecanismo resolvió un antiguo rompecabezas de la biología celular. No obstante, la idea resultaba tan original que fueron necesarios varios años para acumular las pruebas suficientes para que fuera aceptada de forma general.

En el resto de la sección, se describirá brevemente el tipo de reacciones que hacen posible la fosforilación oxidativa, dejando los detalles para más adelante.

El NADH transfiere sus electrones al oxígeno a través de tres grandes complejos enzimáticos respiratorios

Aunque la cadena respiratoria recolecta energía mediante un mecanismo diferente al que utilizan otras reacciones metabólicas, el principio es el mismo. Se consigue que la reacción energéticamente favorable $H_2 + \frac{1}{2} O_2 \rightarrow H_2O$ se produzca a través de muchos pequeños pasos, de forma que la mayor parte de la energía de esta reacción pueda ser transformada en una forma de almacenamiento en vez de ser liberada al medio en forma de calor. En primer lugar, los átomos de hidrógeno son escindidos en protones y electrones. Los electrones pasan a través de una serie de transportadores de electrones de la membrana mitocondrial interna. En algunos pasos a lo largo de esta cadena, los protones y los electrones se recombinan temporalmente. Pero sólo al final de esta cadena de transporte electrónico se vuelven a combinar con los protones de forma permanente, cuando son utilizados para neutralizar las cargas negativas generadas por la adición final de electrones a la molécula de oxígeno (**Figura 14–12**).

El proceso del transporte de electrones empieza cuando el ion hidruro se libera del NADH (regenerándose NAD^+) y se transforma en un protón y dos electrones ($H^- \rightarrow H^+ + 2e^-$). Estos dos electrones son transferidos al primero de una serie de más de 15 transportadores diferentes de electrones que se hallan en la cadena respiratoria. Los electrones empiezan

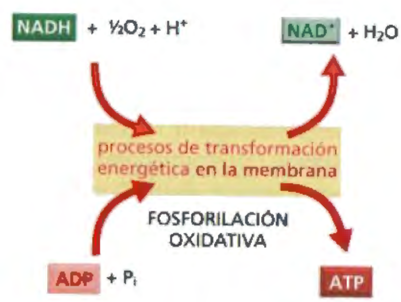


Figura 14–11 Principal red de transformación energética catalizada por la mitocondria. En este proceso de fosforilación oxidativa, la membrana mitocondrial interna actúa como una máquina de interconversión energética, transformando parte de la energía de oxidación del NADH (y del $FADH_2$) en energía de enlace fosfato del ATP.

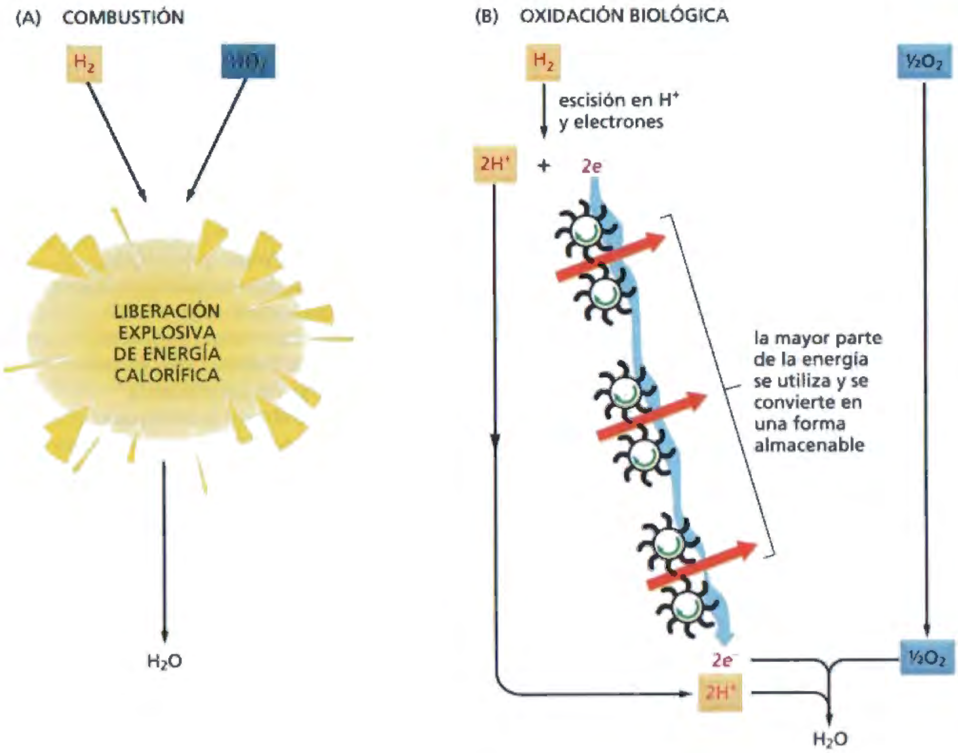


Figura 14–12 Comparación entre las oxidaciones biológicas y la combustión. (A) Si el hidrógeno se quemara, la mayor parte de la energía se liberaría en forma de calor. (B) Por el contrario, en las oxidaciones biológicas la mayor parte de la energía liberada se aprovecha transformándose en alguna forma de energía útil para la célula, sobre todo a través de la cadena de transporte de electrones de la membrana mitocondrial interna (la cadena respiratoria). La mitocondria libera el resto de la energía de oxidación en forma de calor. En realidad, los protones y los electrones que se muestran se obtienen de los átomos de hidrógeno que se hallan unidos covalentemente a moléculas de NADH o de $FADH_2$.

con una energía muy alta, que van perdiendo a medida que pasan a lo largo de la cadena. La mayoría de las veces, los electrones pasan de un ion metálico a otro, cada uno de los cuales está estrechamente unido a una molécula de proteína que altera la afinidad electrónica del ion metálico (descrito más adelante). La mayor parte de estas proteínas se encuentran agrupadas en tres grandes *complejos enzimáticos respiratorios* cada uno de los cuales contiene, a su vez, proteínas transmembrana que unen con firmeza el complejo a la membrana mitocondrial interna. Cada complejo de la cadena tiene mayor afinidad por los electrones que su predecesor, de forma que los electrones pasan de forma secuencial de un complejo al otro hasta que son transferidos al oxígeno, el cual tiene una afinidad por los electrones mayor que la de cualquier otro complejo de la cadena.

A medida que los electrones se desplazan a lo largo de la cadena respiratoria, se almacena energía en forma de gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna

La íntima asociación que existe entre los transportadores de electrones y las moléculas de proteína posibilita la fosforilación oxidativa. Las proteínas guían a los electrones a lo largo de la cadena respiratoria, de tal manera que los electrones se desplazan secuencialmente de un complejo enzimático al otro. La transferencia de electrones está acoplada a la captación y liberación orientadas de H^+, como ocurre en los cambios alostéricos que presentan las bombas proteicas transformadoras de energía. El resultado es que el bombeo de H^+ a través de la membrana interna, desde la matriz hacia el espacio intermembrana, se produce debido al flujo energéticamente favorable de electrones. Este desplazamiento de H^+ tiene dos consecuencias principales:

1. Genera un gradiente de pH a través de la membrana mitocondrial interna, con un valor de pH mayor en la matriz que en el citosol, donde suele ser cercano a 7 (el pH del espacio intermembrana es equivalente al del citosol, ya que las moléculas pequeñas se equilibran libremente a través de la membrana externa de la mitocondria).
2. Genera un gradiente de voltaje (un *potencial de membrana*) a través de la membrana mitocondrial interna, negativo en el interior y positivo en el exterior (que es el resultado del flujo neto de salida de iones positivos).

El gradiente de pH (ΔpH) conduce a los H^+ de nuevo hacia adentro, reforzando así el efecto del potencial de membrana (ΔV) que actúa atrayendo hacia la matriz a cualquier ion

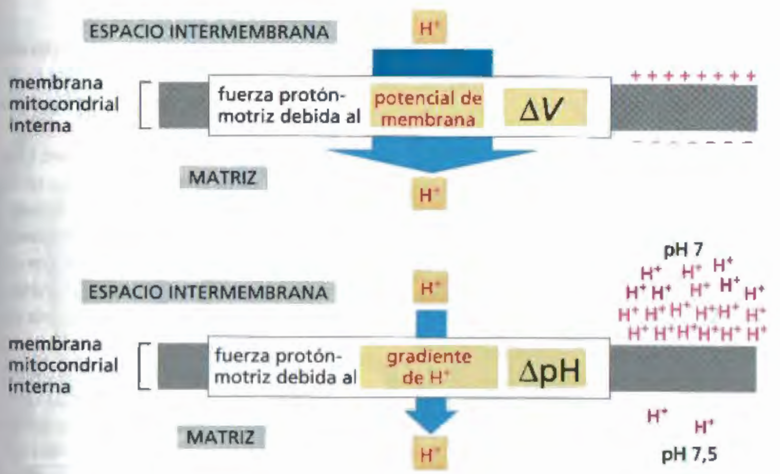


Figura 14–13 Los dos componentes del gradiente electroquímico de protones. La fuerza protón-motriz total a través de la membrana mitocondrial interna está compuesta por una gran fuerza debida al potencial de membrana (designada tradicionalmente como $\Delta\psi$ por los expertos, pero que en este libro se indica como ΔV) y por una pequeña fuerza debida al gradiente de H^+ (ΔpH). Ambas fuerzas actúan en el sentido de impulsar protones hacia el espacio de la matriz mitocondrial.

positivo y empujando hacia el exterior a cualquier ion negativo. En conjunto, estas dos fuerzas constituyen un **gradiente electroquímico de protones** (**Figura 14–13**). El gradiente electroquímico de protones ejerce una **fuerza protón-motriz**, que se puede medir en milivoltios (mV). En una célula típica, la fuerza protón-motriz de la membrana interna de una mitocondria que esté respirando oscila entre 180 y 190 mV, lo que genera un potencial de membrana de entre 160 y 170 mV para un gradiente de pH de alrededor de entre 0,3 y 0,5 unidad de pH (cada ΔpH de una unidad de pH tiene un efecto equivalente al de un potencial de membrana de unos 60 mV).

El gradiente de protones impulsa la síntesis de ATP

El gradiente electroquímico de protones, a través de la membrana mitocondrial interna, impulsa la síntesis de ATP en el proceso de la fosforilación oxidativa (**Figura 14–14**). El proceso que lo hace posible es una enzima unida a la membrana denominada **ATP sintasa**, que ya hemos mencionado. Esta enzima genera una vía hidrofílica a través de la membrana mitocondrial interna que permite fluir a los protones a favor de su gradiente electroquímico. Los iones se abren paso a través de la ATP sintasa y son utilizados para impulsar la reacción, energéticamente desfavorable, entre el ADP y el P_i produciendo ATP (véase Figura 2–27). La ATP sintasa tiene un origen antiguo; esta misma enzima se encuentra en las mitocondria de las células animales, en los cloroplastos de las plantas y de las algas y en las membranas plasmáticas de las bacterias y las arqueas.

En la **Figura 14–15** se muestra la estructura de la ATP sintasa, también denominada F_0F_1 ATPasa. Es una proteína de gran tamaño, formada por muchas subunidades, con una masa de más de 500.000 daltons y que trabaja por catálisis rotatoria. Una gran porción de la enzima, que tiene una forma parecida a la cabeza de un chupa-chup, está formada por un anillo de 6 subunidades proyectadas hacia la cara de la matriz de la membrana mitocondrial interna. Un largo brazo mantiene esta cabeza en su posición uniéndola a un grupo de proteínas transmembrana que constituyen una especie de estativo en la membrana. Este estativo está en contacto con un "rotor" compuesto por un anillo de entre 10 y 14 subunidades

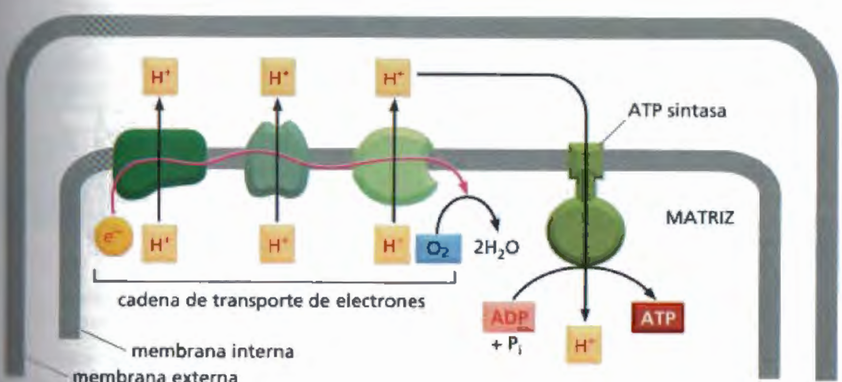


Figura 14–14 Mecanismo general de la fosforilación oxidativa. Cuando un electrón de alta energía es transferido a través de la cadena de transporte electrónico, parte de la energía liberada impulsa la acción de tres complejos enzimáticos respiratorios que bombean H^+ hacia el exterior de la matriz. Estos protones generan un gradiente electroquímico de H^+ a través de la membrana mitocondrial interna que impulsa a los protones a volver hacia la matriz a través de la ATP sintasa, un complejo proteico transmembrana que utiliza la energía del flujo de H^+ para sintetizar ATP a partir de ADP y P_i en la matriz.

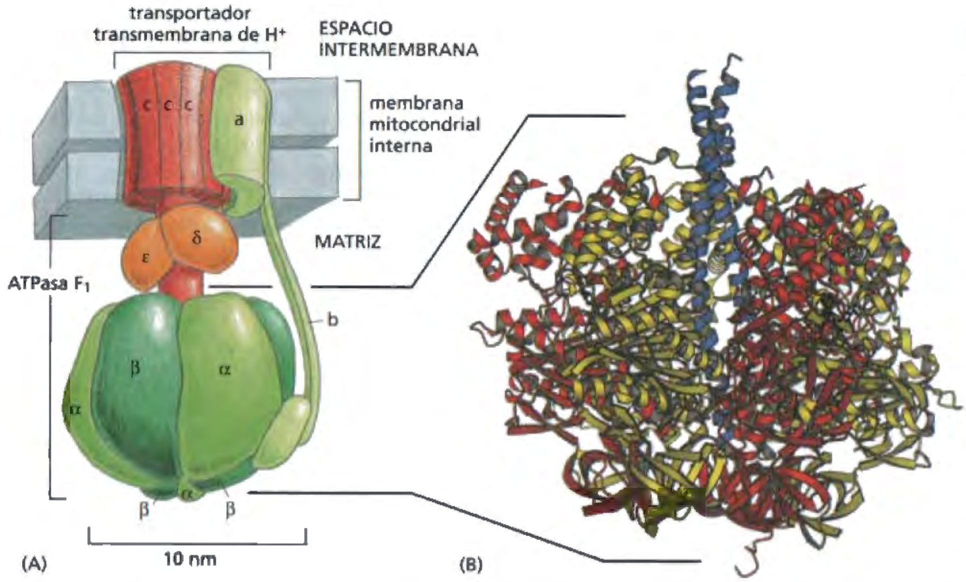


Figura 14–15 ATP sintasa. <ATCG> <GAGA> (A) La enzima está compuesta por una cabeza, denominada ATPasa F_1, y un transportador de H^+ transmembrana, denominada F_0. Ambas partes están formadas por varias subunidades. Una especie de tallo rotatorio se fija a un rotor (*rojo*) formado por un anillo que tiene 10-14 subunidades c en la membrana. El estativo (*verde*) está formado por una subunidad transmembrana (a) unida a otras subunidades que forman una especie de brazo alargado. Este brazo fija el estativo al anillo de subunidades 3α y 3β, que forman la cabeza, que tampoco pueden rotar. (B) Estructura tridimensional de la ATPasa F_1 determinada por cristalografía de rayos X. Esta parte de la ATP sintasa recibe este nombre debido a su capacidad para llevar a cabo la reacción inversa de la síntesis de ATP, denominada hidrólisis de ATP, dando lugar a ADP y P_i, cuando se separa de su porción transmembrana. (B, por cortesía de John Walter, a partir de J.P. Abrahams et al., *Nature* 370:621-628, 1994. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

proteicas transmembrana iguales. Cuando los protones pasan a través del estrecho canal formado por el conjunto estativo-rotor su desplazamiento hace que el anillo del rotor gire. Este giro hace que también gire la proyección unida al rotor (*azul* en la Figura 14–15B) el cual, por lo tanto, produce un rápido giro en la cabeza del chupa-chup. Como resultado de ello, la energía del flujo de protones a favor de su gradiente electroquímico se transforma en energía mecánica en este doble conjunto de proteínas que rozan una contra otra: la rotación del brazo proteico empuja el anillo contra la cabeza proteica.

Tres de las seis subunidades de la cabeza tienen lugares de unión para ADP y para fosfato inorgánico, los cuales son empujados a formar ATP a medida que la energía mecánica es transformada en energía de enlace químico a través de cambios repetidos de la conformación que genera el brazo de rotación. De esta forma la ATP sintasa es capaz de producir más de 100 moléculas de ATP por segundo, generando 3 moléculas de ATP por vuelta. El número de subunidades translocadoras de protones del rotor es diferente en distintas ATP sintasas, y es este número el que determina el número de protones que deben pasar a través de esta maravillosa maquinaria para fabricar cada molécula de ATP (su "coeficiente de multiplicación", que generalmente es un número no entero entre 3 y 5).

El gradiente de protones está acoplado con el transporte a través de la membrana mitocondrial interna

El transporte electroquímico de protones impulsa otros procesos, además de la síntesis de ATP. En la mitocondria, una gran cantidad de pequeñas moléculas cargadas, tales como piruvato, ADP y P_i, son bombeadas desde el citosol hasta la matriz, mientras que otras, tales como el ATP, deben ser transportadas en la dirección opuesta. Existen transportadores que se unen a estas moléculas y acoplan su transporte con el flujo de H^+, energéticamente favorable, hacia la matriz mitocondrial. Así, por ejemplo, el piruvato y el fosfato inorgánico (P_i) son cotransportados hacia la matriz mitocondrial junto con H^+.

El ADP y el ATP son cotransportados en sentidos opuestos, por una sola proteína transportadora. Dado que la molécula de ATP tiene una carga negativa más que la de ADP, cada intercambio entre ambos nucleótidos genera el transporte de una carga negativa hacia el exterior de la mitocondria. Por lo tanto, la diferencia de voltaje a través de la membrana mitocondrial interna impulsa el cotransporte ADP-ATP (**Figura 14–16**).

Se ha indicado que en las células eucariotas el gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna se utiliza para impulsar tanto la formación de ATP como el transporte de ciertos metabolitos a través de la membrana. En las bacterias, el gradiente similar de protones a través de la membrana plasmática bacteriana es utilizado para impulsar estos dos tipos de procesos. En las bacterias móviles este gradiente también impulsa la rápida rotación del flagelo bacteriano que sirve de propulsión a la bacteria (**Figura 14–17**).

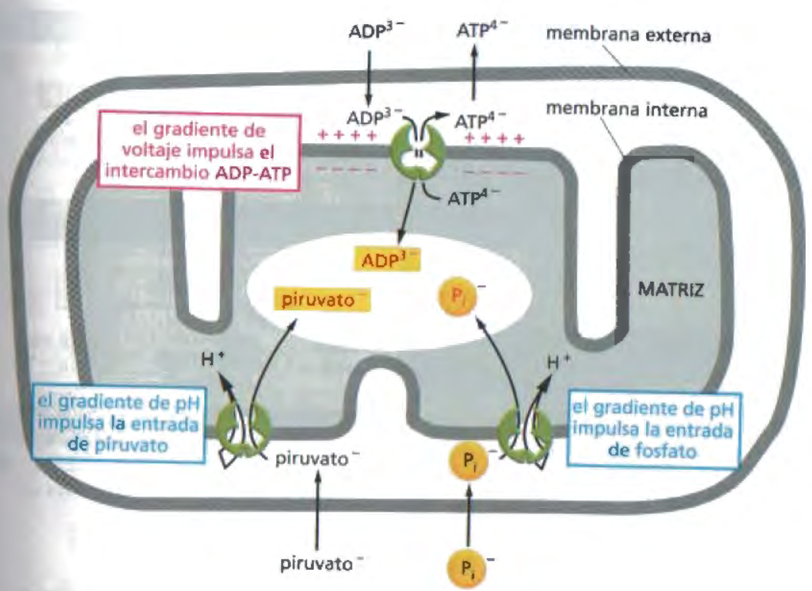


Figura 14–16 Algunos procesos de transporte activo impulsados mediante el gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna. El piruvato, el fosfato inorgánico (P_i) y el ADP entran a la matriz mitocondrial, mientras que el ATP es bombeado hacia el exterior. La carga de cada una de las moléculas transportadas se indica con respecto al potencial de membrana, que es negativo en el interior. La membrana mitocondrial externa es permeable a todos estos compuestos. Para un análisis del transporte activo de moléculas a través de la membrana realizado por proteínas transportadoras, véase el Capítulo 11.

El gradiente de protones produce la mayor parte del ATP de las células

Como hemos señalado previamente, la glucólisis produce una cantidad neta de 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa que es metabolizada. Este es el balance energético del proceso de fermentación que tiene lugar en ausencia de O_2 (descrito en el Capítulo 2). Durante la fosforilación oxidativa parece ser que cada par de electrones cedidos por el NADH producido en la mitocondria proporcionan energía suficiente para la formación de 2,5 moléculas de ATP, una vez descontada la energía utilizada para transportar este ATP hasta el citosol. La fosforilación oxidativa también produce 1,5 moléculas de ATP por cada par de electrones procedentes del $FADH_2$, o desde las moléculas de NADH producidas por la glucólisis en el citosol. A partir de los productos de la glucólisis y del ciclo del ácido cítrico, que se resumen en la **Tabla 14–1A**, podemos calcular que la oxidación completa de una molécula de glucosa, comenzando con la glucólisis y acabando con la fosforilación oxidativa, genera una cantidad neta de unos 30 ATP.

En conclusión, la mayor parte del ATP que se genera en la célula animal por la oxidación de glucosa es producida por mecanismos quimiosmóticos en la membrana mitocondrial. La fosforilación oxidativa en las mitocondrias también produce grandes cantidades de ATP a partir de NADH y de $FADH_2$ que procede de la oxidación de las grasas (Tabla 14–1B; véase también Figura 2–81).

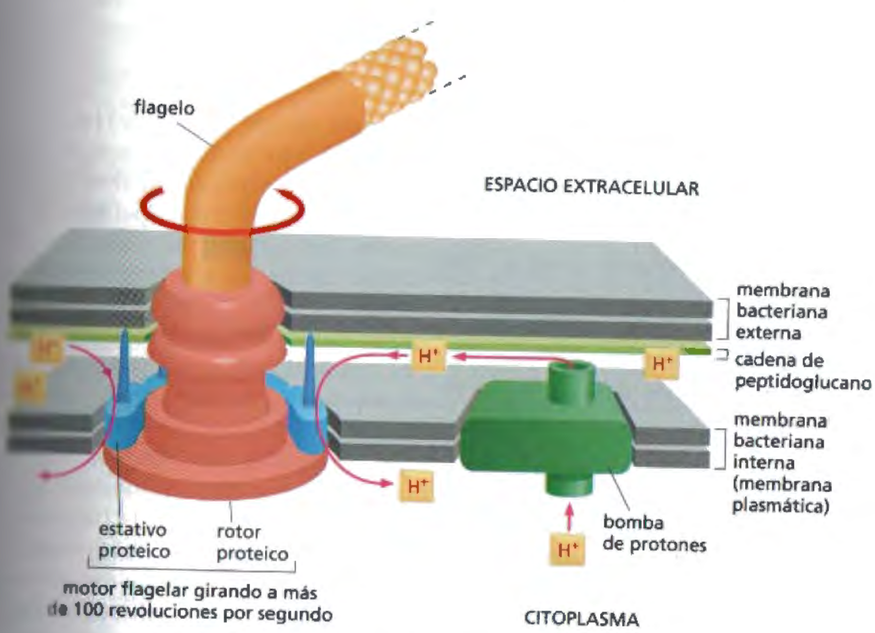


Figura 14–17 La rotación del flagelo bacteriano es impulsada por el flujo de H$^+$. El flagelo está unido a una serie de anillos proteicos (*naranja*), embebidos en las membranas externa e interna, que giran con el flagelo. La rotación está impulsada por un flujo de protones a través de un anillo externo de proteínas (el estativo) mediante mecanismos que recuerdan a los de la ATP sintasa.

Tabla 14–1 Productos resultantes de la oxidación de azúcares y de grasas

A. PRODUCCIÓN NETA A PARTIR DE LA OXIDACIÓN DE UNA MOLÉCULA DE GLUCOSA
En el citosol (glucólisis)
1 glucosa → 2 piruvato + 2 NADH + 2 ATP
En la mitocondria (piruvato deshidrogenasa y ciclo del ácido cítrico)
2 piruvato → 2 acetil CoA + 2 NADH
2 acetil CoA → 6 NADH + 2 $FADH_2$ + 2 GTP
Resultado neto en la mitocondria
2 piruvato → 8 NADH + 2 $FADH_2$ + 2 GTP
B. PRODUCCIÓN NETA DE LA OXIDACIÓN DE UNA MOLÉCULA DE PALMITOIL COA (ACTIVADA A PARTIR DE PALMITATO, UN ÁCIDO GRASO)
En la mitocondria (oxidación del ácido graso y ciclo del ácido cítrico)
1 palmitoil CoA → 8 acetil CoA + 7 NADH + 7 $FADH_2$
8 acetil CoA → 24 NADH + 8 $FADH_2$ + 8 GTP
Resultado neto en la mitocondria
1 palmitoil CoA → 31 NADH + 15 $FADH_2$ + 8 GTP

La mitocondria mantiene una elevada relación ATP:ADP en las células

Debido a las proteínas transportadoras de la membrana mitocondrial interna que intercambian ATP por ADP, las moléculas de ADP producidas por la hidrólisis de ATP en el citosol entran rápidamente a la mitocondria donde serán recargadas, mientras que las moléculas de ATP formadas en la matriz mitocondrial por la fosforilación oxidativa son rápidamente bombeadas hacia el citosol, donde serán utilizadas. En el cuerpo humano, una molécula de ATP sale de las mitocondrias y vuelve a entrar (como ADP) para ser recargada, más de una vez por minuto, y la célula mantiene una concentración de ATP que es unas 10 veces superior a la concentración de ADP.

Como se expuso en el Capítulo 2, a menudo las enzimas biosintéticas impulsan reacciones energéticamente desfavorables acoplándolas con la hidrólisis del ATP, que es energéticamente favorable (véase Figura 2–59). Por tanto, el acervo de ATP es utilizado para impulsar los procesos celulares de la misma manera que una batería puede ser utilizada para accionar máquinas eléctricas. Si la actividad de las mitocondrias se bloquea, el nivel de ATP disminuye y la batería celular se descarga, de forma que ya no pueden producirse las reacciones energéticamente desfavorables y la célula muere. El cianuro, que es un veneno, bloquea el transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna y provoca la muerte por esta razón.

Podría parecer que los procesos celulares sólo se detendrán cuando la concentración de ATP sea cero. Sin embargo, la vida no es tan sencilla: depende de que las células mantengan una concentración de ATP superior a la de ADP y de P_i. Para explicar el porqué, es necesario considerar algunos principios elementales de termodinámica.

Como el valor de ΔG de la hidrólisis del ATP es muy negativo, el ATP es útil para la célula

El concepto de energía libre (G) fue analizado en el Capítulo 2. La variación de energía libre de una reacción, ΔG, determina si dicha reacción puede tener lugar o no en la célula. En la página 76 se muestra que el ΔG para una reacción dada se puede escribir como la suma de dos términos: el primero denominado *variación de energía libre estándar*, $\Delta G°$, depende de las características intrínsecas de las moléculas que reaccionan; el segundo depende de sus concentraciones. Por ejemplo para una reacción sencilla del tipo A → B,

$$\Delta G = \Delta G° + RT \ln \frac{[B]}{[A]}$$

donde [A] y [B] representan las concentraciones de A y B, y ln es el logaritmo neperiano. Por tanto, $\Delta G°$ sólo es un valor de referencia que es igual al valor de ΔG cuando las concentraciones de A y B son iguales entre sí (ln 1 = 0).

1

ATP —hidrólisis→ ADP + P_i

velocidad de hidrólisis = constante de velocidad de hidrólisis × concentración de ATP

2

ADP + P_i —síntesis→ ATP

velocidad de síntesis = constante de velocidad de síntesis × conc. de fosfato × conc. de ADP

3

EN EL EQUILIBRIO:

velocidad de síntesis = velocidad de hidrólisis

constante de velocidad de síntesis × conc. de fosfato × conc. de ADP = constante de velocidad de hidrólisis × conc. de ATP

así, $\dfrac{\text{conc. de ADP} \times \text{conc. de fosfato}}{\text{concentración de ATP}} = \dfrac{\text{constante de velocidad de hidrólisis}}{\text{constante de velocidad de síntesis}}$ = constante de equilibrio K

o abreviadamente, $\dfrac{[\text{ADP}][P_i]}{[\text{ATP}]} = K$

4

Para la reacción

ATP → ADP + P_i

se utiliza la siguiente ecuación:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[\text{ADP}][P_i]}{[\text{ATP}]}$$

donde ΔG y ΔG° están expresados en kilocalorías por mol, R es la constante de los gases (2×10^{-3} kcal/mol K), T es la temperatura absoluta (K), y todas las concentraciones están expresadas en moles por litro.

Cuando las concentraciones de todos los compuestos reaccionantes son iguales a 1 M, $\Delta G = \Delta G^\circ$ (ya que $RT \ln 1 = 0$). Por consiguiente, ΔG° es una constante definida como la variación de energía libre estándar para la reacción.

En el equilibrio la reacción no tiene ningún efecto neto sobre el grado de desorden del universo, por lo que $\Delta G = 0$. Por esta razón, en el equilibrio,

$$-RT \ln \frac{[\text{ADP}][P_i]}{[\text{ATP}]} = \Delta G^\circ$$

Pero en el equilibrio, las concentraciones de los compuestos reaccionantes deben cumplir la ecuación de equilibrio:

$$\frac{[\text{ADP}][P_i]}{[\text{ATP}]} = K$$

Por consiguiente en el equilibrio,

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K$$

Por lo tanto, vemos que, mientras que ΔG° indica el punto de equilibrio para una reacción, ΔG indica lo *alejada* que dicha reacción se halla del equilibrio. ΔG es una medida de la "fuerza impulsora" de cualquier reacción química, de la misma forma que la fuerza protón-motriz es la fuerza impulsora para la translocación de protones.

Figura 14–18 Relación básica entre las variaciones de energía libre y el equilibrio en la reacción de hidrólisis del ATP. Las constantes de velocidad en los recuadros 1 y 2 se determinan en experimentos en los que se mide la acumulación del producto en función del tiempo. La constante de equilibrio que se muestra, K, viene dada en moles por litro. (Para un análisis de la energía libre, véase el Panel 2–7, pp. 118-119, y para una descripción de la constante de equilibrio, véase la Figura 3–43)

En el Capítulo 2, el ATP se describió como la principal "molécula activada transporta-…ra de energía" de las células. La gran variación de energía libre favorable (gran ΔG negati-… de su hidrólisis es utilizada, a través de *reacciones acopladas*, para impulsar otras …ciones químicas, que de lo contrario no se producirían (véase pp. 79-87). La reacción de …lisis del ATP produce ADP y fosfato inorgánico (P_i); por tanto, es una reacción del tipo … B + C, como se describe en la **Figura 14–18**,

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[B][C]}{[A]}$$

En las condiciones que por lo general existen en las células, la variación de energía … del proceso de hidrólisis del ATP a ADP y P_i, es de entre –11 y –13 kcal/mol (–46 … kJ/mol). Este ΔG extremadamente favorable se debe a las elevadas concentraciones … ATP que hay en la célula respecto a las bajas concentraciones de ADP y de P_i. Cuando … ADP y P_i están presentes a la misma concentración, de 1 mol/litro (denominadas …diciones estándar), el ΔG para la hidrólisis del ATP es la variación de energía libre …ndar (ΔG°), que sólo es de –7,3 kcal/mol (–30,5 kJ/mol). Cuando la concentración de … es mucho menor que la de ADP y P_i, el ΔG disminuye casi hasta cero. En este punto, la …cidad a la que el ADP y el P_i formarán ATP será igual a la velocidad a la que el ATP se …lizará dando ADP y P_i. En otras palabras, cuando $\Delta G = 0$, la reacción está en *equilibrio* … Figura 14–18).

… el ΔG, y no el ΔG°, el valor que indica lo alejada que está una reacción del equilibrio y … determina si una determinada reacción puede ser utilizada o no para impulsar otras …ciones. Debido a que la eficiente conversión de ADP en ATP en la mitocondria mantie-… una concentración de ATP mucho más elevada que las de ADP y de P_i, en la célula la …ión de hidrólisis del ATP se mantiene muy alejada del equilibrio y, por tanto, el valor de … correspondiente es muy negativo. Si no existiera este gran desequilibrio, la hidrólisis

del ATP no podría ser utilizada en la célula para impulsar otras reacciones; por ejemplo, a bajas concentraciones de ATP muchas reacciones biosintéticas se producirían "hacia atrás" en lugar de "hacia delante".

La ATP sintasa puede actuar en sentido contrario, hidrolizando ATP y bombeando H^+

La ATP sintasa utiliza el flujo de H^+ a favor de gradiente electroquímico para sintetizar ATP, pero también funciona en sentido contrario: puede utilizar la energía de la hidrólisis de ATP para bombear H^+ a través de la membrana mitocondrial interna (**Figura 14–19**). De esta forma actúa como un *mecanismo reversible acoplado* que interconvierte la energía del gradiente electroquímico de protones en energía de enlace químico. En cualquier momento, la dirección en la que actúa depende del balance entre la magnitud del gradiente electroquímico de protones y del ΔG local para la hidrólisis del ATP, como explicaremos seguidamente.

El número exacto de protones que son necesarios para producir cada molécula de ATP depende del número de subunidades del anillo de proteínas transmembrana que forman la base del rotor (véase la Figura 14–15). Sin embargo, para ilustrar los principios que intervienen podemos asumir que por cada ATP que produzca la ATP sintasa es necesario que entren 3 protones a la mitocondria. El que la ATP sintasa trabaje en la dirección de la síntesis o en la de la hidrólisis de ATP dependerá, en cada momento, del balance exacto entre la variación de energía libre favorable para desplazar los tres protones a través de la membrana hacia la matriz ΔG_{3H^+} (que es menor que cero) y la variación de energía libre desfavorable para la *síntesis* de ATP en la matriz $\Delta G_{\text{síntesis de ATP}}$ (que es mayor que cero). Como acabamos de explicar, el valor de $\Delta G_{\text{síntesis de ATP}}$ depende de las concentraciones exactas de los tres compuestos que reaccionan ATP, ADP y P_i en la matriz mitocondrial (véase Figura 14–18). Por el contrario, el valor de ΔG_{3H^+} es directamente proporcional al valor de la fuerza protón-motriz a través de la membrana mitocondrial interna. El siguiente ejemplo ayudará a explicar de qué forma afecta a la ATP sintasa el equilibrio entre estas dos variaciones de energía libre.

Como se explica en el pie de la Figura 14–19, cada H^+ que entra en la matriz a favor de un gradiente electroquímico de 200 mV, libera una cantidad de energía libre de 4,6 kcal/mol (19,2 kJ/mol); por lo que, el desplazamiento de tres protones liberará tres veces más cantidad de energía libre (ΔG_{3H^+} = −13,8 kcal/mol; 57,7 kJ/mol). Así, si la fuerza protón-motriz se mantiene constante a 200 mV, la ATP sintasa sintetizará ATP hasta que se alcance una relación de ATP respecto a ADP y P_i tal que el $\Delta G_{\text{síntesis de ATP}}$ sea justamente igual a +13,8 kcal/mol (57,7 kJ/mol; aquí $\Delta G_{\text{síntesis de ATP}} + \Delta G_{3H^+} = 0$). En este punto, la ATP sintasa no producirá ni síntesis ni hidrólisis neta de ATP.

Supongamos que de repente en el citosol se hidroliza una gran cantidad de ATP a través de reacciones que requieren energía, lo cual hace disminuir la relación ATP/ADP en la matriz. En esta situación, el valor de $\Delta G_{\text{síntesis de ATP}}$ disminuirá (véase la Figura 14–18) y la ATP sintasa comenzará de nuevo a sintetizar ATP, restableciendo la relación original entre ATP y ADP. Alternativamente, si la fuerza protón-motriz cae de repente y se mantiene constante a

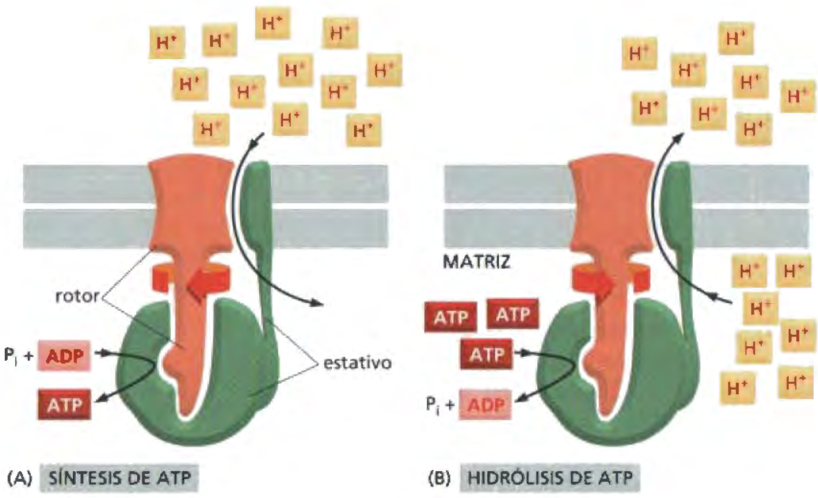


Figura 14–19 La ATP sintasa es un elemento acoplador reversible, que puede transformar la energía del gradiente electroquímico de protones en energía de enlace químico, o viceversa. <ATCG> La ATP sintasa puede (A) sintetizar ATP mediante la utilización de la fuerza protón-motriz o (B) bombear protones en contra de gradiente electroquímico mediante la hidrólisis de ATP. En cada momento, la dirección de su actuación depende de la variación de energía libre (ΔG) neta para los procesos acoplados de translocación de H^+ a través de la membrana y de síntesis de ATP a partir de ADP y P_i. La medida de la fuerza de torsión que realiza la ATP sintasa cuando hidroliza ATP revela que la sintasa puede bombear con una potencia 60 veces mayor que un motor diesel del mismo peso.

La variación de la energía libre (ΔG) para la hidrólisis de ATP depende de las concentraciones de los tres reactivos ATP, ADP y P_i (véase la Figura 14-18); el ΔG para la síntesis de ATP tendrá el mismo valor, pero con signo contrario. El ΔG para la translocación de los protones a través de la membrana es proporcional a la fuerza protón-motriz. El factor de conversión entre ellos es el faraday. Así, ΔG_{H^+} = −0,023 (fuerza protón-motriz), donde ΔG_{H^+} se expresa en kcal/mol y la fuerza protón-motriz en mV. Para un gradiente electroquímico de protones (fuerza protón-motriz) de 200 mV tendremos un ΔG_{H^+} = −4,6 kcal/mol (−19,2 kJ/mol).

160 mV, ΔG_{3H^+} cambiará a −11,0 kcal/mol (−46 kJ/mol). Como resultado de este proceso, la ATP sintasa comenzará a hidrolizar parte del ATP en la matriz hasta que se alcance un nuevo equilibrio entre ATP, ADP y P_i (en el que $\Delta G_{\text{síntesis de ATP}}$ = +11,0 kcal/mol o +46 kJ/mol), y así sucesivamente.

Como veremos más adelante, en muchas bacterias la ATP sintasa revierte el sentido de su acción de forma normal, según que su metabolismo sea aeróbico o anaeróbico. Además, las ATPasas de tipo V que acidifican orgánulos, cuya arquitectura es similar a la de la ATP sintasa, actúan por lo general en sentido inverso (véase Figura 13–36). Otras proteínas de transporte a través de membrana, que acoplan el desplazamiento de un ion a la síntesis o la hidrólisis de ATP, comparten este mismo tipo de reversibilidad. Por ejemplo, normalmente tanto la bomba de Na^+/K^+ como la de Ca^{2+}, descritas en el Capítulo 11, hidrolizan ATP y utilizan la energía liberada para desplazar determinados iones a través de la membrana. Si cualquiera de estas bombas se expone a un gradiente demasiado elevado de los iones que transporta, entonces actuará en sentido inverso, es decir, sintetizando ATP a partir de ADP y P_i en lugar de hidrolizarlo. Así, del mismo modo que la ATP sintasa, estas bombas también son capaces de transformar la energía electroquímica almacenada en un gradiente de iones transmembrana en energía del enlace fosfato del ATP.

Resumen

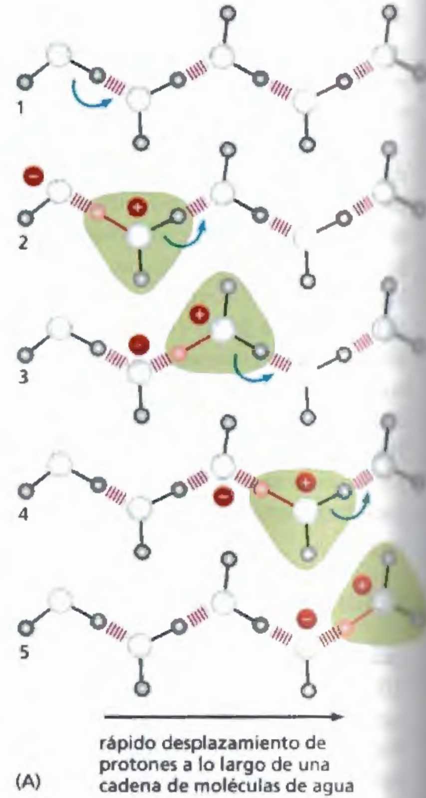
La mitocondria lleva a cabo la mayor parte de las oxidaciones celulares y produce la mayor parte del ATP de las células animales. Una mitocondria está envuelta por dos membranas concéntricas y su región más importante desde el punto de vista del trabajo que realiza es el espacio interno (la matriz) y la membrana interna que lo envuelve. La matriz contiene una gran variedad de enzimas, que incluyen las que transforman el piruvato y los ácidos grasos en acetil CoA, y las que oxidan este acetil CoA hasta CO_2 *a través del ciclo del ácido cítrico. Estas reacciones de oxidación producen grandes cantidades de NADH (y* $FADH_2$*). La energía útil derivada de la combinación del oxígeno molecular con los electrones reactivos transportados por el NADH y el* $FADH_2$ *es extraída por una cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna llamada cadena respiratoria.*

La cadena respiratoria utiliza energía derivada del transporte de electrones para bombear H^+ *hacia el exterior de la matriz generando un gradiente electroquímico de protones (*H^+*) transmembrana, al que contribuye tanto el potencial de membrana como la diferencia de pH. La gran cantidad de energía libre liberada cuando los* H^+ *vuelven a la matriz (a través de la membrana mitocondrial interna) proporciona la base de la producción de ATP en la matriz a través de una destacable máquina proteica: la ATP sintasa, un acoplador reversible del flujo de protones con la síntesis o la hidrólisis de ATP. El gradiente electroquímico transmembrana también impulsa el transporte activo de determinados metabolitos a través de la membrana mitocondrial interna, incluyendo un eficiente intercambio ATP-ADP entre la mitocondria y el citosol que permite mantener altamente cargado el acervo de ATP de la célula. La elevada relación entre el ATP y los productos de su hidrólisis hace que la variación de energía libre de la hidrólisis del ATP sea muy favorable, permitiendo así que impulse una gran cantidad de procesos celulares que requieren energía en la célula.*

LAS CADENAS DE TRANSPORTE DE ELECTRONES Y SUS BOMBAS DE PROTONES

Hasta este momento se ha considerado, en términos generales, de qué forma utilizan las mitocondrias el transporte de electrones para generar un gradiente electroquímico de protones. Ahora se examinará el mecanismo que sirve de base a estos procesos de transformación energética en la membrana; al hacerlo, también conseguiremos otro propósito. Como destacamos al inicio de este capítulo, las mitocondrias, los cloroplastos, las arqueas y las bacterias utilizan mecanismos quimiosmóticos muy similares; de hecho, estos mecanismos son la base del funcionamiento de casi todos los seres vivos –incluyendo organismos anaeróbicos, en los que toda su energía procede de la transferencia de electrones entre dos moléculas inorgánicas.

Esta sección tiene por objetivo explicar de qué forma el proceso de transporte de electrones puede bombear protones a través de la membrana. Empezaremos con algunos de los principios básicos de los que depende este proceso.



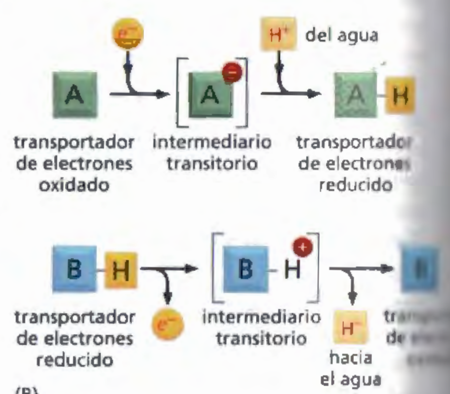


Figura 14–20 Comportamiento de los protones en el agua. (A) Los protones se desplazan muy rápidamente a lo largo de una cadena de moléculas de agua unidas por enlaces de hidrógeno. En este diagrama, los protones que saltan están indicados por *flechas azules*; los iones hidronio están indicados por *zonas sombreadas en verde*. Como se explicó en el Capítulo 2, raramente existen protones como tales, sino que por lo general están asociados a moléculas de agua formando iones hidronio, H_3O^+. A pH neutro (pH 7,0), los iones hidronio están presentes a una concentración de 10^{-7} M; sin embargo, para simplificar, decimos que son los H^+ los que están a concentración 10^{-7} M (véase Panel 2–2, pp. 108–109). (B) La transferencia de electrones puede provocar la transferencia de átomos completos de hidrógeno, ya que en el interior de las células los protones son captados o cedidos al agua con facilidad. Aquí, cuando la molécula A capta un electrón, un protón se reduce; cuando B pierde un electrón, un protón se oxida.

Los protones tienen una gran facilidad para desplazarse

A pesar de que los protones se parecen a otros iones positivos como el Na^+ y el K^+ en lo que respecta a que normalmente necesitan proteínas para desplazarse a través de las membranas, en algunos aspectos son muy especiales. Los átomos de hidrógeno son, con diferencia, el tipo más abundante de átomos de los organismos vivos y son muy abundantes no sólo en todas las moléculas biológicas que tienen carbono sino también en las moléculas de agua que las rodean. En el agua los protones tienen una gran movilidad, oscilando a través de las redes de moléculas de agua, mantenidas por enlaces de hidrógeno, por rápida disociación de una molécula de agua y asociación con la molécula vecina, como se ilustra en la **Figura 14–20A**. Parece que los protones se desplazan a través de la bomba proteica embebida en la bicapa lipídica de una forma similar a ésta: son transferidos de una cadena lateral de aminoácidos hasta otra, siguiendo un canal especial a través de la proteína.

Los protones también son especiales respecto al transporte de electrones. Siempre que una molécula se reduce al captar un electrón, el electrón (e^-) transporta una carga negativa. En muchos casos esta carga es neutralizada rápidamente por la adición de un protón (H^+) del agua, por tanto el efecto neto de la reducción es la transferencia de un átomo de hidrógeno completo, $H^+ + e^-$ (Figura 14–20B). De forma similar, cuando una molécula se oxida, el átomo de hidrógeno puede disociarse fácilmente en sus constituyentes, un electrón y un protón, permitiendo que el electrón sea transferido a una molécula que acepte electrones, mientras que el protón pasa al agua. Por lo tanto, en una membrana en la que los electrones están siendo transferidos a través de una cadena de transporte de electrones, resulta bastante sencillo bombear protones desde una cara de la membrana a la otra. El transportador de electrones necesita simplemente estar colocado en la membrana de tal forma que al captar un electrón, tome el protón de un lado de la membrana, y al transferir el electrón a la siguiente molécula transportadora de la cadena, libere el protón al otro lado de la membrana (**Figura 14–21**).

El potencial redox es una medida de la afinidad por los electrones

En las reacciones bioquímicas, los electrones liberados por una molécula siempre son transferidos a otra, por lo que si una molécula se oxida, siempre habrá otra que se reduce. Como en cualquier otra reacción química, la tendencia a que una reacción de oxidación-reducción de este tipo, o **reacción redox**, se produzca de forma espontánea depende de la variación de energía libre (ΔG) para la transferencia del electrón la cual, a su vez, depende de la afinidad relativa de las dos moléculas por los electrones.

Dado que la transferencia de electrones proporciona la mayor parte de la energía para los procesos de la vida, merece la pena dedicarle un momento para entenderla. Como se describe en el Capítulo 2, los ácidos y las bases dan y aceptan protones (véase Panel 2–2, pp. 108-109). Ácidos y bases existen en pares ácido-base conjugados, ya que el ácido es rápidamente convertido en la base por pérdida de un protón. Por ejemplo, el ácido acético (CH_3COOH) es transformado en su base conjugada (CH_3COO^-) en la reacción:

$$CH_3COOH \rightleftharpoons CH_3COO^- + H^+$$

Exactamente de la misma manera, a los pares de compuestos tales como el NADH y NAD^+ se les denomina **pares redox**, ya que el NADH es transformado en NAD^+ por la pérdida de electrones en la reacción:

$$NADH \rightleftharpoons NAD^+ + H^+ + 2e^-$$

El NADH es un dador fuerte de electrones: sus electrones están unidos con una alta energía de enlace, por lo que la variación de energía libre al pasar sus electrones a muchas otras moléculas resulta favorable (véase Figura 14–9). Es difícil formar un enlace de alta energía. Por lo tanto, su par redox, el NAD^+, no es necesariamente un aceptor débil de electrones.

Podemos medir de forma experimental la tendencia a transferir electrones de un par redox. Sólo se precisa formar un circuito eléctrico que establezca una unión entre una mezcla 1:1 (equimolar) del par redox, con un segundo par redox seleccionado arbitrariamente como referencia estándar, de manera que podamos medir la diferencia de voltaje que se establece entre ellos (**Panel 14–1**, p. 830). Esta diferencia de voltaje se denomina **potencial redox**; por definición, los electrones se desplazarán espontáneamente desde un par redox, como el $NADH/NAD^+$ de bajo potencial redox (una baja afinidad por los electrones), hacia un par redox como el O_2/H_2O, de alto potencial redox (una elevada afinidad por los electrones). Así, el NADH es una buena molécula para dar electrones a la cadena respiratoria, mientras que el O_2 es adecuado para actuar como "sumidero" de los electrones al final de la vía. Como se explica en el Panel 14–1, la diferencia de potencial redox, $\Delta E_0'$, es una medida directa de la energía libre estándar (ΔG^o) para la transferencia de un electrón desde una molécula a otra.

La transferencia de electrones libera grandes cantidades de energía

Los pares de compuestos que tienen un potencial redox más negativo tienen menor afinidad por los electrones y, por tanto, tendrán una fuerte tendencia a ceder electrones. Por el contrario, los pares que tienen un potencial redox más positivo tienen mayor afinidad por los electrones y, por tanto, tendrán una fuerte tendencia a aceptar electrones. Una mezcla 1:1 de NADH y NAD^+ tiene un potencial redox de –320 mV, lo cual indica que el NADH tiene una fuerte tendencia a ceder electrones; una mezcla 1:1 de H_2O y $\frac{1}{2}O_2$ tiene un potencial redox de +820 mV, lo cual indica que el O_2 tiene una fuerte tendencia a aceptar electrones. La diferencia de potencial redox es de 1,14 voltios (1140 mV), lo que significa que en estas condiciones estándar la transferencia de cada electrón desde el NADH hasta el O_2 es enormemente favorable, con un $\Delta G^0 = -26{,}2$ kcal/mol (110 kJ/mol) o el doble de esta cantidad por los dos electrones transferidos por molécula de NADH (véase Panel 14–1). Si comparamos esta variación de energía libre con la de formación del enlace fosfoanhidro del ATP en el que $\Delta G^0 = -7{,}3$ kcal/mol (–30,5 kJ/mol, véase Figura 2–75), veremos que la energía liberada por la oxidación de una molécula de NADH es más que suficiente para sintetizar varias moléculas de ATP a partir de ADP y P_i.

En los sistemas vivos podrían haber evolucionado enzimas que permitieran al NADH ceder los electrones directamente al O_2 dando agua, en la reacción:

$$2H^+ + 2e^- + \tfrac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O$$

Sin embargo, debido a su enorme disminución de energía libre, esta reacción procedería con una fuerza casi explosiva y casi toda la energía se liberaría en forma de calor. De hecho las células realizan esta misma reacción, pero de una forma mucho más gradual, pasando los electrones de alta energía del NADH hasta el O_2 pero a través de muchos transportadores de electrones de la cadena de transporte de electrones. Cada transportador sucesivo de la cadena tiene una mayor afinidad por los electrones, por lo que la reacción tan energéticamente favorable $2H^+ + 2e^- + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O$ tiene lugar en muchos pasos pequeños. Este proceso escalonado permite que la célula pueda almacenar cerca de la mitad de la energía liberada.

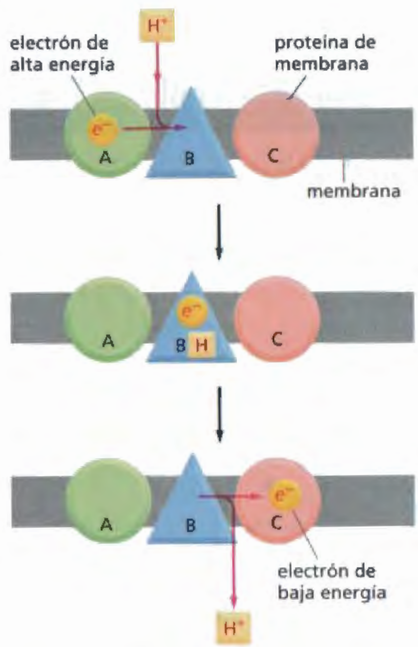
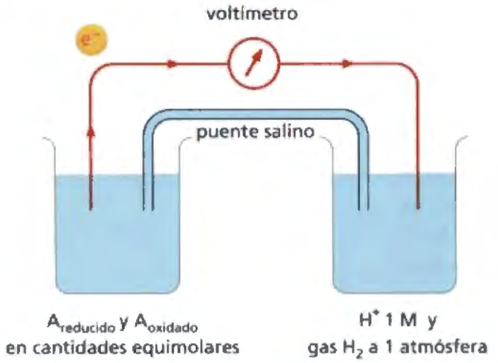


Figura 14–21 De qué forma son bombeados los protones a través de las membranas. Cuando un electrón pasa a través de la cadena de transporte de electrones embebida en la bicapa lipídica, en cada paso puede captar y liberar un protón. En el diagrama esquemático que se muestra, el transportador de electrones B capta un protón (H^+) de un lado de la membrana cuando acepta un electrón (e^-) del transportador A, y libera el protón al otro lado de la membrana cuando cede su electrón al transportador C.

Mediante métodos espectroscópicos se han identificado muchos de los transportadores de electrones de la cadena respiratoria

Muchos de los transportadores de electrones de la cadena respiratoria absorben luz visible y cambian de color cuando se oxidan o se reducen. En general, cada uno de ellos tiene un espectro de absorción y una reactividad que son suficientemente distintas como para permitir que su comportamiento sea trazado mediante espectroscopia, incluso en mezclas crudas. Este hecho hizo posible que estos componentes fueran purificados mucho antes de conocer su función exacta. De esta forma, los **citocromos** fueron descubiertos en 1925 como com-

FORMA DE MEDIR LOS POTENCIALES REDOX



Un vaso de precipitados (*izquierda*) contiene la sustancia A con una mezcla equimolar de un miembro de su par redox reducido ($A_{reducido}$) y otro oxidado ($A_{oxidado}$). El otro vaso de precipitados contiene el estándar de referencia, hidrógeno ($2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2$), cuyo potencial redox se ha definido arbitrariamente como cero, por acuerdo internacional. (Se requiere un puente salino, formado por una solución concentrada de KCl que permita que los iones K^+ y Cl^- se puedan desplazar entre los dos vasos de precipitados, para neutralizar las cargas en cada vaso cuando los electrones fluyen de uno a otro.) Un alambre metálico (*rojo*) permite el paso de electrones sin resistencia; entonces, el voltímetro medirá el potencial redox de la sustancia A. Si los electrones fluyen desde $A_{reducido}$ hasta H^+, como se indica aquí, se dice que el par redox formado por la sustancia A tiene un potencial redox negativo. Si fluyeran desde H_2 a $A_{oxidado}$, se diría que el par redox tiene un potencial redox positivo.

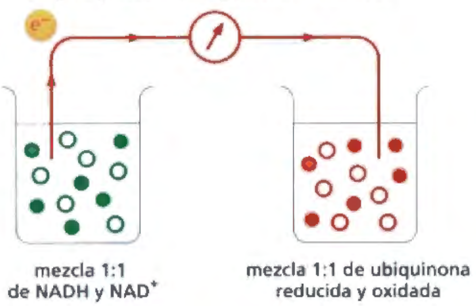
ALGUNOS POTENDIALES REDOX A pH7

Por convenio, el potencial redox de un par redox se designa como *E*. En situación estándar, con todos los reactivos a concentración 1M, incluyendo el H^+, se puede determinar un potencial redox estándar, designado como E_0. Las reacciones biológicas tienen lugar a pH 7, por lo que en biología se utiliza un estado estándar diferente en el que $A_{reducido} = A_{oxidado}$ y $H^+ = 10^{-7}$ M. Este potencial redox estándar se designa por E'_0. A continuación se exponen unos cuantos ejemplos de especial relevancia en la fosforilación oxidativa.

reacciones redox	potencial redox E'_0
$NADH \rightleftharpoons NAD^+ + H^+ + 2e^-$	−320 mV
ubiquinona reducida $\rightleftharpoons$ ubiquinona oxidada $+ 2H^+ + 2e^-$	+30 mV
citocromo *c* reducido $\rightleftharpoons$ citocromo *c* oxidado $+ e^-$	+230 mV
$H_2O \rightleftharpoons \frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^-$	+820 mV

CÁLCULO DE $\Delta G°$ A PARTIR DE LOS POTENCIALES REDOX

$$\Delta E'_0 = E'_0(\text{aceptor}) - E'_0(\text{dador}) = +350 \text{ mV}$$



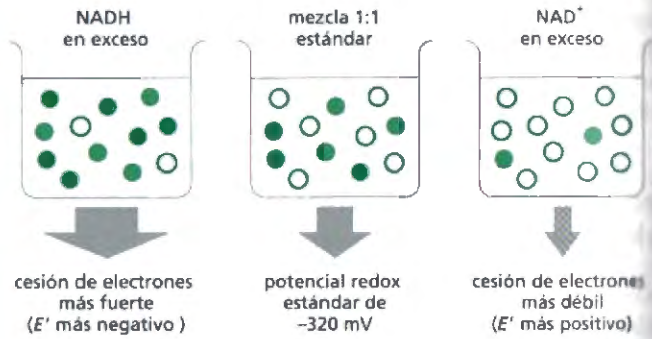
$\Delta G° = -8$ kcal/mol

$\Delta G° = -n(0{,}023)\ \Delta E'_0$, donde *n* es el número de electrones transferidos a través de una variación de potencial redox de $\Delta E'_0$ milivoltios (mV)

Ejemplo: La transferencia de un electrón desde el NADH hasta la ubiquinona tiene un $\Delta G°$ favorable de − 8 kcal/mol (−1,9 kJ/mol), mientras que la transferencia de un electrón desde la ubiquinona hasta el oxígeno tiene un $\Delta G°$ incluso más favorable, de −18,2 kcal/mol (−4,35 kJ/mol). El valor de $\Delta G°$ para la transferencia de un electrón desde el NADH hasta el oxígeno es la suma de estos dos valores, −26,2 kcal/mol.

EFECTO DE LOS CAMBIOS DE CONCENTRACIÓN

La variación real de energía libre para una reacción, ΔG, depende de la concentración a la que se encuentren los compuestos que reaccionan y, por lo general, será diferente de la variación de energía libre estándar, $\Delta G°$. Los potenciales redox estándar están definidos para una mezcla de par redox 1:1. Por ejemplo, el potencial redox estándar para una mezcla 1:1 de NADH y NAD^+ es de −320 mV. Pero cuando hay un exceso de NADH sobre NAD^+, la transferencia de electrones desde el NADH hasta un aceptor de electrones se hace más favorable. Esto se refleja en un potencial redox menos negativo y un ΔG más negativo para la transferencia de un electrón.



puestos que experimentan rápida oxidación y reducción en organismos vivos tan dispares como las bacterias, las levaduras y los insectos. La observación de células y tejidos con espectroscopios llevaron a los investigadores a identificar tres tipos de citocromos que se distinguen por sus espectros de absorción y fueron denominados citocromo *a*, *b* y *c*. Esta nomenclatura ha subsistido, incluso después de conocerse que las células contienen varios citocromos de cada tipo y que la clasificación en tipos no es funcionalmente importante.

Los citocromos constituyen una familia de proteínas coloreadas, relacionadas entre sí por la presencia de un *grupo hemo* cuyo átomo de hierro cambia, cada vez que acepta un electrón, del estado de oxidación férrico (Fe^{3+}) al estado de oxidación ferroso (Fe^{2+}). El grupo hemo está formado por un *anillo porfirínico* con un átomo de hierro fuertemente unido a cuatro átomos de nitrógeno situados en las esquinas de un cuadrado (**Figura 14–22**). Un anillo similar de porfirina es el responsable del color rojo de la sangre y del color verde de las hojas, siendo un átomo de hierro en la hemoglobina y uno de magnesio en la clorofila, respectivamente, los que están unidos al anillo porfirínico.

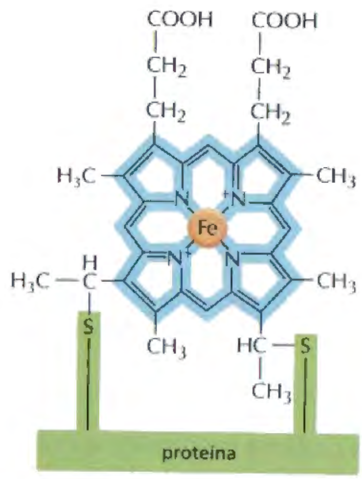


Figura 14–22 Estructura del grupo hemo unido covalentemente al citocromo *c*. El anillo de porfirina se muestra en *azul*. En la cadena respiratoria aparecen cinco citocromos diferentes. Dado que en los citocromos los diferentes grupos hemo presentan algunas diferencias estructurales y están unidos a sus respectivas proteínas de manera diferente, cada uno de los citocromos tiene diferente afinidad por los electrones.

Las *proteínas ferrosulfuradas*, la segunda familia de transportadores de electrones, presentan dos o cuatro átomos de hierro que están unidos a un número igual de átomos de azufre y a cadenas laterales de cisteína, formando en la proteína un **centro ferrosulfurado** (**Figura 14–23**). En la cadena respiratoria hay más centros ferrosulfurados que citocromos, pero su detección requiere la utilización de la espectroscopia de resonancia electrónica paramagnética (EPR: *electron paramagnetic resonance*), por lo que todavía no han sido completamente caracterizados. Al igual que los citocromos, esto centros sólo transportan un electrón a la vez.

El más sencillo de los transportadores de electrones de la cadena respiratoria –y el único que no forma parte de una proteína– es una quinona (denominada *ubiquinona* o *coenzima Q*). Una **quinona** (**Q**) es una pequeña molécula hidrofóbica que está libre y es móvil a través de la bicapa lipídica y puede captar o ceder uno o dos electrones; al reducirse, por cada electrón que transporta capta un protón del medio (**Figura 14–24**).

Además de los seis hemo diferentes unidos a citocromos, de más de siete centros ferrosulfurados y de la ubiquinona, también actúan como transportadores de electrones desde el NADH hasta el oxígeno dos átomos de cobre y una flavina, los cuales están fuertemente unidos a proteínas de la cadena respiratoria. En esta vía participan en total más de 60 proteínas diferentes.

Como podríamos esperar, estos transportadores de electrones tienen cada vez una afinidad más alta por los electrones (mayores potenciales redox) a medida que los electrones se desplazan a través de la cadena respiratoria. Los potenciales redox se han ido refinando a lo largo de la evolución por la unión de cada transportador de electrones a un contexto proteico particular, que puede modificar su afinidad normal por los electrones. Sin embargo, los centros ferrosulfurados tienen una afinidad relativamente baja por los electrones, por lo que se encuentran al principio de la cadena respiratoria; por el contrario, los citocromos predominan hacia el final de la cadena, donde es necesaria una mayor afinidad por los electrones.

El orden de los diferentes transportadores de electrones de la cadena se determinó mediante sofisticadas medidas espectroscópicas (**Figura 14–25**) y muchas de las proteínas fueron inicialmente aisladas y caracterizadas como polipéptidos individuales. Sin embargo, un avance capital en el conocimiento de la cadena respiratoria fue la determinación de que la mayor parte de las proteínas están organizadas en tres grandes complejos enzimáticos.

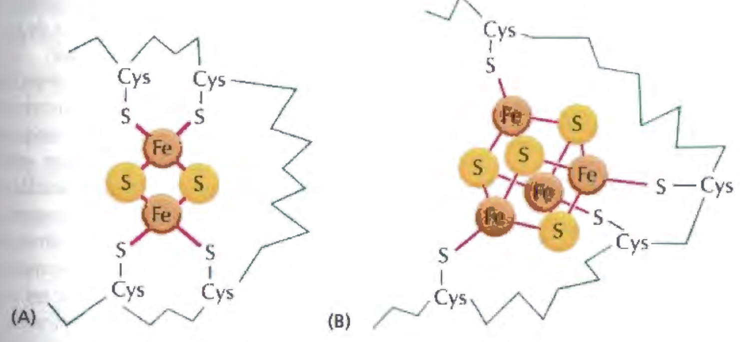


Figura 14–23 Estructura de dos tipos de centros ferrosulfurados. (A) Un centro del tipo 2Fe2S. (B) Un centro del tipo 4Fe4S. Aunque contienen muchos átomos de hierro, cada centro sólo puede transportar un electrón a la vez. En la cadena respiratoria existen un total de más de siete centros ferrosulfurados diferentes.

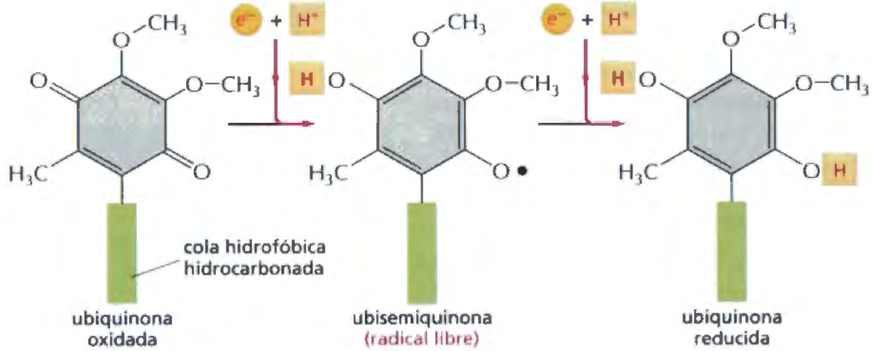


Figura 14–24 Las quinonas transportadoras de electrones. La ubiquinona de la cadena respiratoria capta un H^+ del ambiente acuoso por cada electrón que acepta y puede transportar uno o dos electrones como parte de un átomo de hidrógeno (*amarillo*). Cuando la ubiquinona reducida cede sus electrones al siguiente transportador de la cadena, estos protones se liberan. La larga cola hidrofóbica ancla la ubiquinona a la membrana y consta por lo general de entre 6 y 10 unidades de isopreno (de cinco carbonos cada una); el número depende de cada organismo. El transportador de electrones correspondiente de las membranas fotosintéticas de los cloroplastos es la plastoquinona, casi idéntica estructuralmente a la ubiquinona. Para simplificar, en este capítulo denominaremos *quinona* (abreviada como Q) tanto a la ubiquinona como a la plastoquinona.

La cadena respiratoria contiene tres grandes complejos enzimáticos embebidos en la membrana interna

Las proteínas de membrana son difíciles de purificar como complejos intactos puesto que son insolubles en soluciones acuosas y algunos de los detergentes necesarios para solubilizarlas pueden destruir la interacción normal proteína-proteína. Sin embargo, al principio de la década de 1960 los investigadores descubrieron que los detergentes iónicos relativamente suaves, como el deoxicolato, pueden solubilizar selectivamente, en su forma nativa, determinados componentes de la membrana mitocondrial interna. Esto permitió la identificación y purificación de los tres **complejos enzimáticos respiratorios** principales, unidos a membrana en la vía que va desde el NADH hasta el oxígeno. Cada uno de estos complejos purificados se puede insertar en vesículas formadas por bicapas lipídicas y bombean protones a través de la bicapa a medida que pasan electrones a su través. En la mitocondria, los tres complejos están orientados de forma asimétrica en la membrana interna y están unidos en series como bombas de transporte electrónico dirigidas por H^+ que extraen protones de la matriz (**Figura 14–26**):

1. El **complejo NADH deshidrogenasa** (generalmente conocido como complejo I) es el más grande de los complejos enzimáticos respiratorios con más de 40 cadenas polipeptídicas. Acepta electrones del NADH y los transfiere a través de una flavina y de al menos siete centros ferrosulfurados hasta la ubiquinona. La ubiquinona transferirá después estos electrones a un segundo complejo enzimático respiratorio, el complejo del citocromo b-c_1.
2. El **complejo citocromo b-c_1** contiene al menos 11 cadenas polipeptídicas diferentes y actúa como un dímero. Cada monómero tiene tres grupos hemo unidos a citocromos y una proteína ferrosulfurada. El complejo acepta los electrones de la ubiquinona y los transfiere al citocromo *c*, el cual transporta su electrón hasta el complejo de la citocromo oxidasa.
3. El **complejo citocromo oxidasa** también actúa como un dímero. Cada monómero está formado por 13 cadenas polipeptídicas diferentes incluyendo dos citocromos y dos átomos de cobre. El complejo acepta electrones, de uno en uno, del citocromo *c* y los transfiere, de cuatro en cuatro, al oxígeno.

Los citocromos, los centros ferrosulfurados y los átomos de cobre sólo pueden transportar un electrón a la vez. Sin embargo cada NADH cede dos electrones y cada molécula de O_2

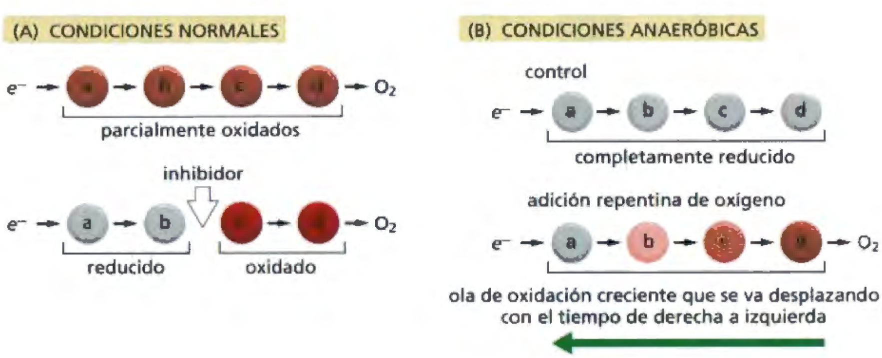


Figura 14–25 Métodos generales que se utilizan para determinar la trayectoria de los electrones a lo largo de la cadena de transporte electrónico. El grado de oxidación de los transportadores electrónicos a, b, c y d se puede seguir de forma continua estudiando su espectro, ya que el del estado oxidado es diferente del estado reducido. En este esquema se indica en *rojo oscuro* un aumento del grado de oxidación. (A) En condiciones normales, cuando hay abundante oxígeno, todos los transportadores se hallan en un estado oxidado parcial. La adición de un inhibidor específico hace que los transportadores situados a favor de la corriente de electrones estén más oxidados (*rojo*) y los transportadores situados en dirección contraria de la corriente de electrones estén reducidos. (B) En ausencia de oxígeno, todos los transportadores se hallan en estado por completo reducido (*gris*). La adición súbita de oxígeno hace que cada transportador se transforme en su forma parcialmente oxidada, con un retraso que es mayor para la mayoría de los transportadores situados a favor de la corriente de electrones.

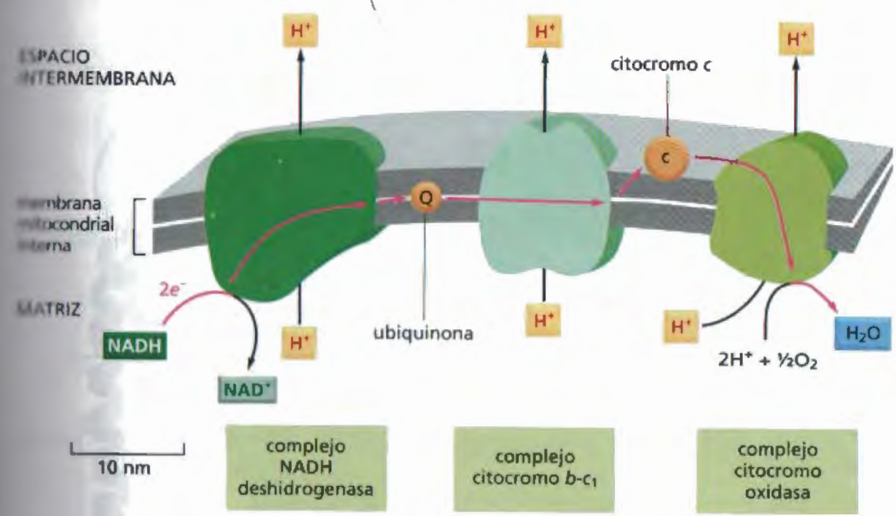


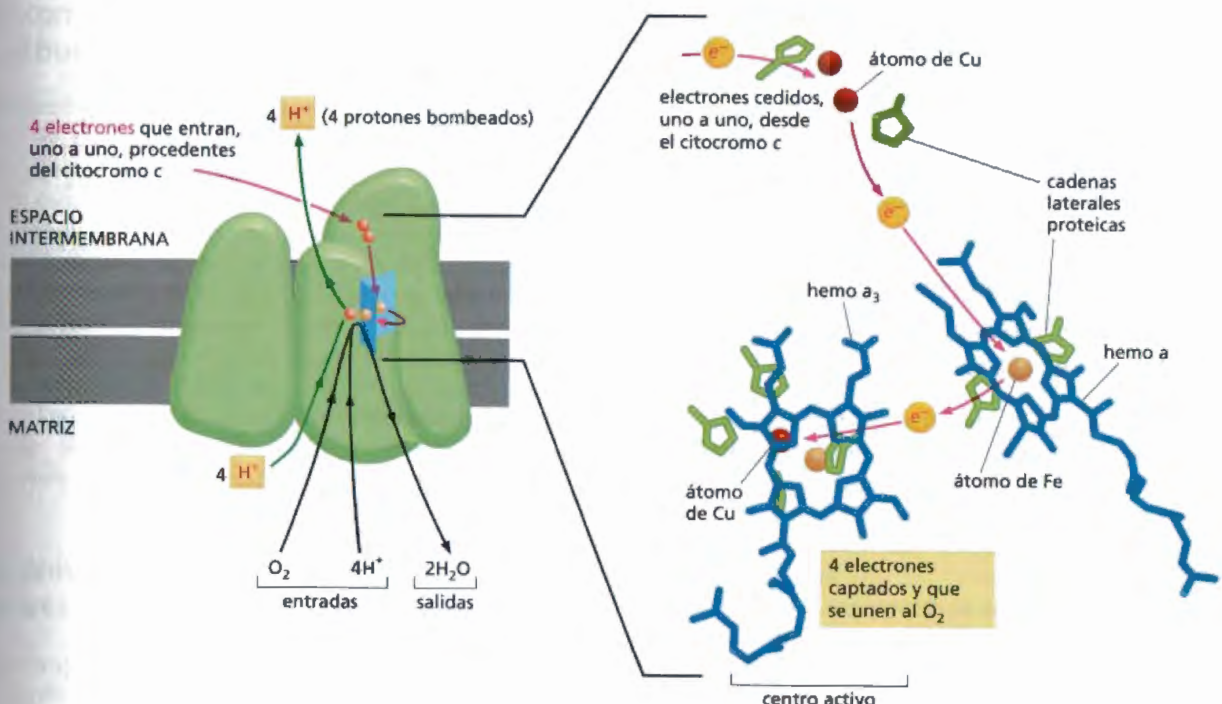
Figura 14–26 Paso de electrones a través de los tres complejos enzimáticos respiratorios. En la figura se observan las formas y tamaños aproximados de tres complejos enzimáticos respiratorios. Durante la transferencia de electrones desde el NADH hasta el oxígeno (*líneas rojas*), la ubiquinona y el citocromo *c* actúan como transportadores móviles llevando los electrones de un complejo al siguiente. Los protones son bombeados a través de la membrana por cada uno de los complejos enzimáticos respiratorios.

debe recibir cuatro para producir agua. A lo largo de la cadena de transporte de electrones existen algunos puntos en los que se recolectan electrones y otros en los que se dispersan, a fin de ajustar estas variaciones del número de electrones. El más obvio de todos ellos es la citocromo oxidasa.

En la citocromo oxidasa, un centro hierro-cobre cataliza de forma eficiente la reducción del O_2

Dado que el oxígeno tiene una gran afinidad por los electrones, libera una gran cantidad de energía libre cuando es reducido formando agua. De esta manera, la evolución de la respiración celular, en la que el O_2 es convertido en agua, capacitó a los organismos a obtener mucha mayor cantidad de energía de la que se puede obtener del metabolismo anaeróbico. Probablemente por esto todos los organismos superiores respiran. En cualquier caso, para poder utilizar el O_2 de este modo los sistemas biológicos requieren disponer de unos procesos químicos muy sofisticados. Podemos tolerar el O_2 en el aire que respiramos porque le cuesta captar el primer electrón. Este hecho ha permitido a las células controlar su reacción

Figura 14–27 Reacción del O_2 con los electrones en la citocromo oxidasa. El átomo de hierro en el hemo *a* actúa como un punto captador de electrones; este hemo suministra cuatro electrones a la molécula de O_2 alojada en un centro activo bimetálico formado por otro átomo de hierro (en hemo a_3) y por un átomo de cobre opuesto muy cercano. Nótese que por cada molécula de O_2 que participa en la reacción $4e^- + 4H^+ + O_2 \rightarrow 2H_2O$, se bombean cuatro protones fuera de la matriz.



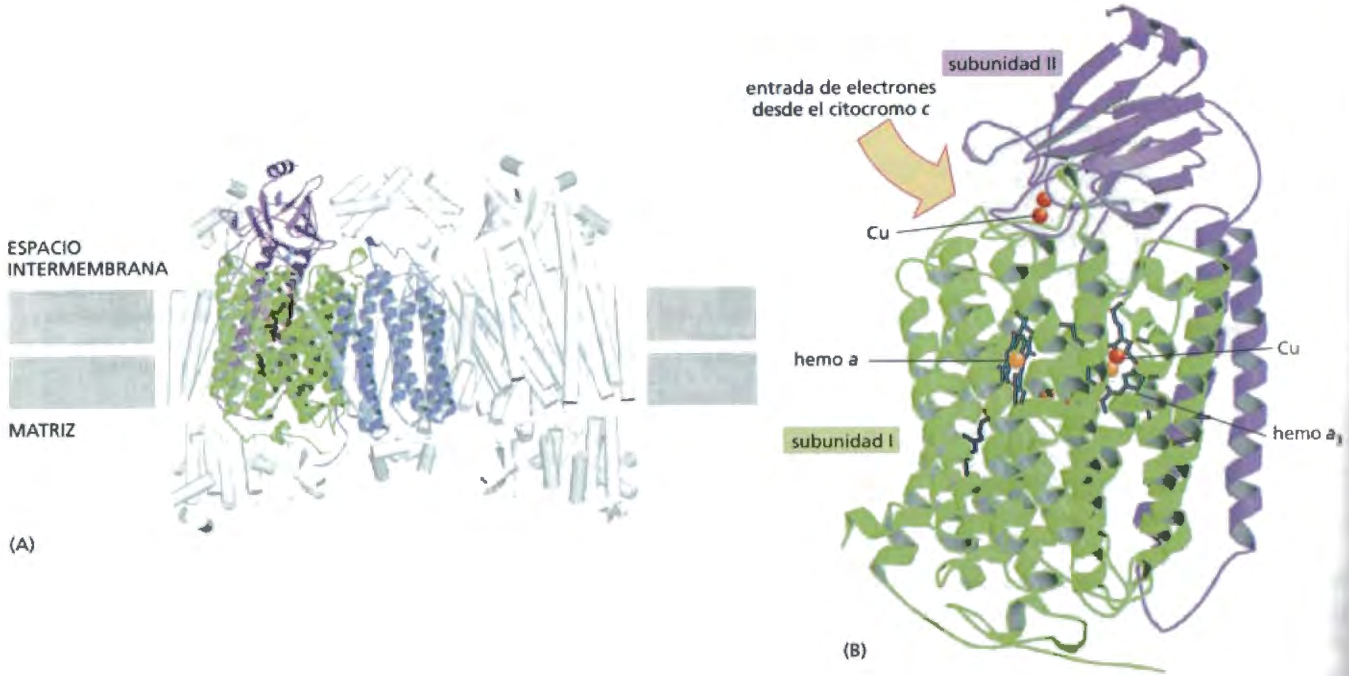


Figura 14–28 Estructura molecular de la citocromo oxidasa. Esta proteína es un dímero, cuyo monómero está formado por 13 subunidades distintas (masa del monómero 204.000 daltons). Las tres subunidades coloreadas están codificadas por el genoma mitocondrial y constituyen el centro funcional de la enzima. A medida que los electrones pasan a través de esta proteína en dirección a la molécula de O_2 se bombean protones a través de la membrana (véase Figura 14–27). (A) La proteína completa tal como está situada en la membrana mitocondrial interna. (B) Los transportadores de electrones están localizados en las subunidades I y II, como se indica.

inicial a través de catálisis enzimática. Pero una vez que una molécula de O_2 haya captado un electrón formando un radical superóxido (O_2^-), se convierte en peligrosamente reactiva y captará tres electrones adicionales. La célula puede utilizar el O_2 para la respiración sólo porque la citocromo oxidasa sitúa el O_2 en un centro bimetálico especial donde se mantiene unido entre un átomo de hierro ligado a un grupo hemo y a un átomo de cobre, hasta que se captan un total de cuatro electrones, sólo entonces los dos átomos de la molécula de oxígeno serán liberados como dos moléculas de agua, sin ningún peligro (**Figura 14–27**).

La reacción de la citocromo oxidasa es la responsable de alrededor del 90% del consumo total de oxígeno de la mayoría de las células. Por lo tanto, este complejo proteico es crucial para la vida aeróbica. La extrema toxicidad para las células de venenos como el cianuro y la azida se basa en su capacidad para unirse con fuerza al complejo de la citocromo oxidasa, bloqueando el transporte de electrones y, por tanto, reduciendo enormemente la producción de ATP.

Aunque la citocromo oxidasa de los mamíferos tiene 13 subunidades proteicas diferentes, la mayoría de ellas tienen papeles secundarios, ayudando a regular tanto la actividad como el ensamblaje de las tres subunidades que forman el núcleo de la enzima. La estructura completa de este gran complejo enzimático ha sido determinada por cristalografía de rayos X, como se ilustra en la **Figura 14–28**. La resolución atómica estructural combinada con estudios mecanísticos del efecto de mutaciones puntuales diseñadas con precisión e introducidas en la enzima por ingeniería genética en levaduras y proteínas bacterianas han revelado los detalles precisos de esta maquinaria proteica.

Las transferencias de electrones en la membrana mitocondrial interna están mediadas por el efecto túnel de electrones durante colisiones al azar

Los dos componentes que transportan los electrones entre los tres complejos enzimáticos principales de la cadena respiratoria –la ubiquinona y el citocromo *c*– difunden rápidamente en el plano de la membrana. Las colisiones que se pueden esperar entre estos dos transportadores móviles y la más lenta difusión de los complejos enzimáticos puede explicar las velocidades observadas de transferencia de electrones (cada complejo cede y recibe un electrón cada 5 a 20 milisegundos).

La transferencia ordenada de electrones a lo largo de la cadena respiratoria se debe a la especificidad de las interacciones funcionales entre los componentes de la cadena: cada transportador de electrones sólo puede interaccionar con el transportador adyacente a él en la secuencia, como se muestra en la Figura 14–26, sin cortocircuitos.

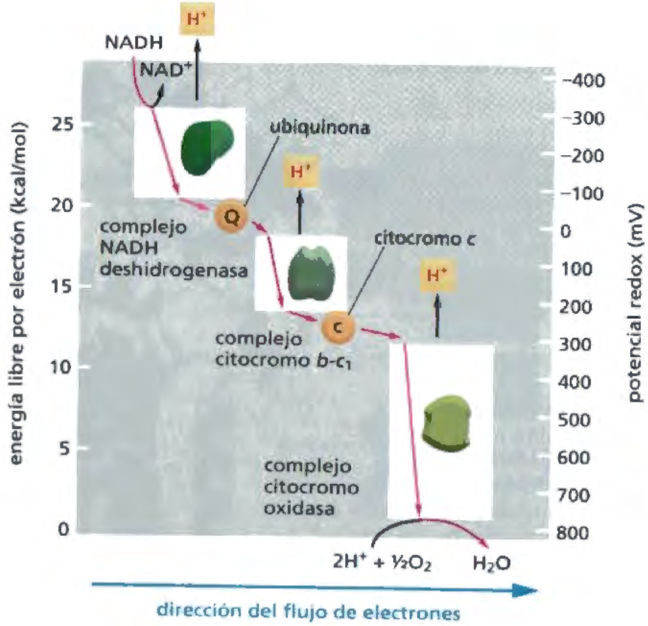


Figura 14–29 El potencial redox varía a lo largo de la cadena de transporte de electrones. El potencial redox (que se indica como E'_0) aumenta a medida que los electrones fluyen a través de la cadena respiratoria hacia el oxígeno. La variación de energía libre estándar, $\Delta G°$, para la transferencia de cada uno de los dos electrones cedidos por la molécula de NADH, puede obtenerse en la escala de ordenadas de la derecha ($\Delta G = -n$ (0,023) $\Delta E'_0$, donde n es el número de electrones transferidos a través de una variación de potencial redox de $\Delta E'_0$ mV). Los electrones fluyen a través de un complejo enzimático respiratorio pasando de manera secuencial a través de los múltiples transportadores de electrones de cada complejo. Como se indica, parte de la variación favorable de energía libre es utilizada por cada complejo enzimático para bombear H^+ a través de la membrana mitocondrial interna. Los complejos de la NADH deshidrogenasa y del citocromo b-c_1 bombean dos H^+ por cada electrón que pasa a su través, mientras que a través del complejo de la citocromo oxidasa sólo se bombea uno.

Obsérvese que el NADH no es la única fuente de electrones para la cadena respiratoria. La flavina $FADH_2$ también se genera por la oxidación de los ácidos grasos (véase la Figura 2–81) y del ciclo del ácido cítrico (véase la Figura 2–82). Sus dos electrones pasan directamente a la ubiquinona, sin pasar por la NADH deshidrogenasa, por esta razón se bombean menos H^+ que cuando se transportan dos electrones desde el NADH.

En los sistemas biológicos, los electrones se desplazan entre las moléculas que los transportan no sólo desplazándose entre enlaces covalentes dentro de las moléculas sino también saltando a través de huecos no mayores de 2 nm. Los saltos ocurren a través de un "túnel" de electrones con propiedades quantum-mecánicas de gran importancia para el proceso que estamos analizando. Parece que estas separaciones evitan cortocircuitos que podrían producirse cuando un transportador de electrones de bajo potencial redox chocara con un transportador de alto potencial redox. Este aislamiento parece que se ha podido demostrar transportando un electrón a suficiente profundidad en el interior de una proteína para evitar su interacción por este "efecto de túnel" con una pareja inadecuada.

Seguidamente estudiaremos de qué forma se utilizan las diferencias de potencial redox de un transportador de electrones al siguiente, para bombear protones hacia afuera de la matriz mitocondrial.

Una gran caída de potencial redox a través de cada uno de los complejos enzimáticos respiratorios aporta energía para el bombeo de H^+

Se ha indicado anteriormente como el potencial redox refleja la afinidad por los electrones (véase p. 76). En la **Figura 14–29** se presenta un esquema de los potenciales redox medidos a lo largo de la cadena respiratoria. Estos potenciales caen en tres grandes escalones, uno a través de cada complejo enzimático principal. La variación de potencial redox entre cada dos transportadores de electrones es directamente proporcional a la energía libre liberada por cada electrón transferido entre ellos. Cada complejo enzimático actúa como un elemento transformador de energía, utilizando parte de esta variación de energía libre para bombear protones a través de la membrana interna y crear de esta manera un gradiente electroquímico de protones a medida que los electrones pasan a través del complejo. Esta transformación se puede poner de manifiesto mediante la incorporación a liposomas de cada uno de los complejos purificados; cuando se añaden un dador y un aceptor de electrones apropiados de forma que los electrones atraviesen el complejo, se observa como se translocan protones a través de la membrana del liposoma.

El mecanismo del bombeo de H^+ ocurre por diferentes mecanismos en los tres complejos enzimáticos principales

Algunos complejos enzimáticos de la cadena respiratoria bombean un protón por cada electrón, a través de la membrana mitocondrial interna, mientras que otros bombean dos. El

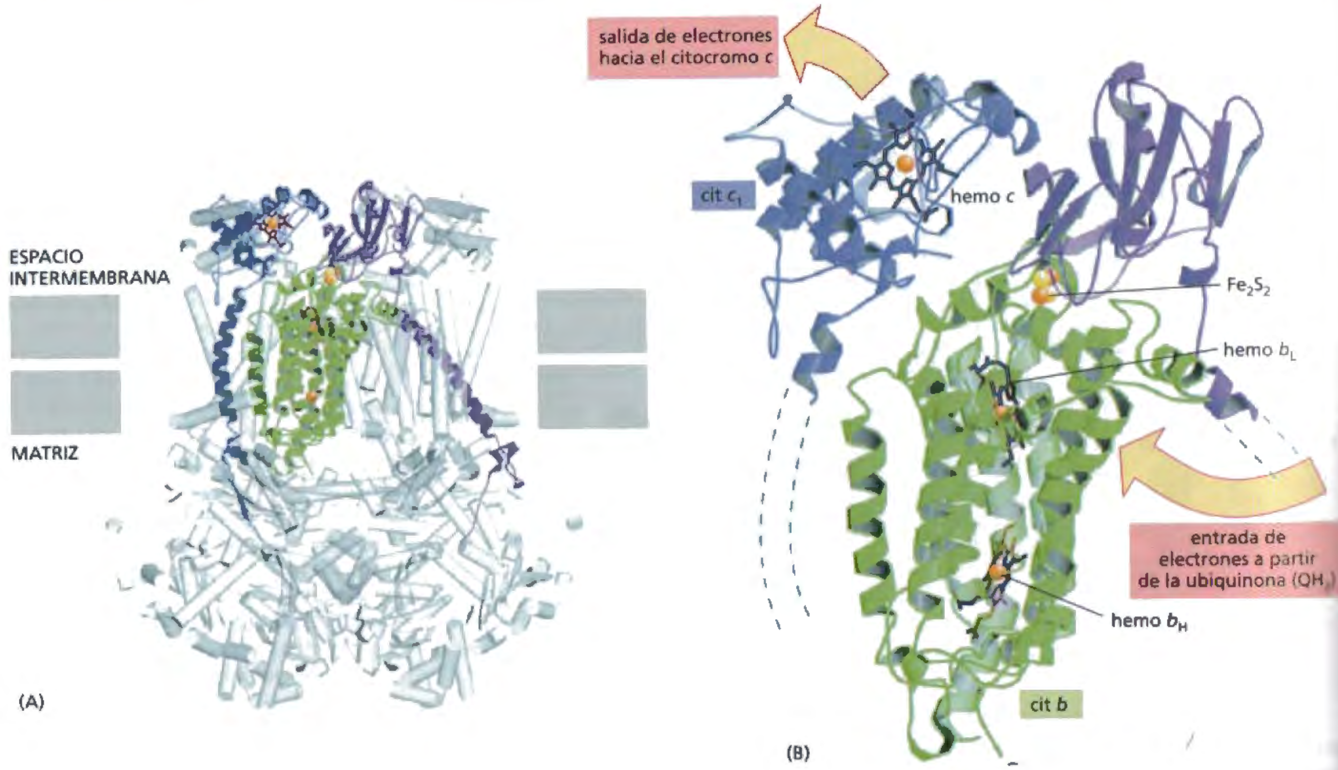


Figura 14–30 Estructura atómica del citocromo b-c_1. Esta proteína es un dímero. En mamíferos, el monómero que tiene 240.000 daltons está compuesto por 11 moléculas de proteína. Las tres proteínas coloreadas forman el centro activo de la enzima: citocromo *b* (*verde*), citocromo c_1 (*azul*) y la proteína de Rieske que tiene un centro ferrosulfurado (*púrpura*). (A) Interacción de las tres proteínas en los dos monómeros. (B) Transporte de electrones a través de este complejo con las entradas y salidas de electrones. Los electrones cedidos inicialmente por la ubiquinona siguen un complejo recorrido de reacciones de transferencia de electrones y protones a través del complejo proteico que aumenta el almacenamiento de energía redox. Este proceso, en el que algunos de los electrones son reciclados al acervo de la quinona, es conocido como el *ciclo Q*.

mecanismo detallado mediante el cual el transporte de electrones está acoplado con el bombeo de protones es diferente para cada uno de los tres complejos enzimáticos. En el caso del complejo citocromo b-c_1, las quinonas participan. Como se mencionó anteriormente, una quinona capta un protón del medio acuoso por cada electrón que transporta y lo libera cuando libera el electrón (Figura 14–24). Dado que la ubiquinona se desplaza libremente por la bicapa lipídica, puede aceptar electrones cerca de la superficie interna de la membrana y donarlos al complejo b-c_1 cerca de la superficie externa, transfiriéndose así un protón a través de la bicapa por cada electrón transportado. Sin embargo, por cada electrón se bombean dos protones a través del complejo b-c_1. Sin embargo, las complicadas series de transferencias de electrones que hacen esto posible todavía está siendo estudiadas a nivel atómico con la ayuda de la estructura completa del complejo citocromo b-c_1 determinada por cristalografía de rayos X (**Figura 14–30**).

La transferencia de electrones genera cambios alostéricos de las conformaciones proteicas, que también pueden bombear H^+, tal como hace la ATP sintasa trabajando en sentido inverso bombeando H^+ al hidrolizar ATP. Tanto para el complejo de la NADH deshidrogenasa como para el complejo de la citocromo oxidasa, parece probable que el transporte de electrones dirija los cambios alostéricos de conformación de las proteínas alterando el estado redox de los componentes. Estos cambios de conformación provocarían que una parte de la proteína bombeara H^+ a través de la membrana mitocondrial interna. Este tipo de mecanismo de bombeo de H^+ requiere que la bomba proteica adquiera al menos tres conformaciones diferentes. En la **Figura 14–31** se muestra un mecanismo general de este proceso.

Una vez descritas las bases mecanísticas del transporte de electrones y del bombeo de protones, podemos considerar cómo está regulada la cadena respiratoria para conseguir una utilidad óptima para la célula.

Los ionóforos de H^+ desacoplan el transporte de electrones de la síntesis de ATP

Desde la década de 1940, se conoce que varios ácidos débiles lipófilos –como el 2,4-dinitrofenol– actúan como *agentes desacoplantes*, desacoplando el transporte de electrones de la síntesis de ATP. La adición de estos compuestos orgánicos de bajo peso molecular a las células detiene la síntesis de ATP en las mitocondrias sin bloquear el consumo de oxígeno. En presencia de este agente desacoplante, el transporte de electrones continua a gran velocidad pero no

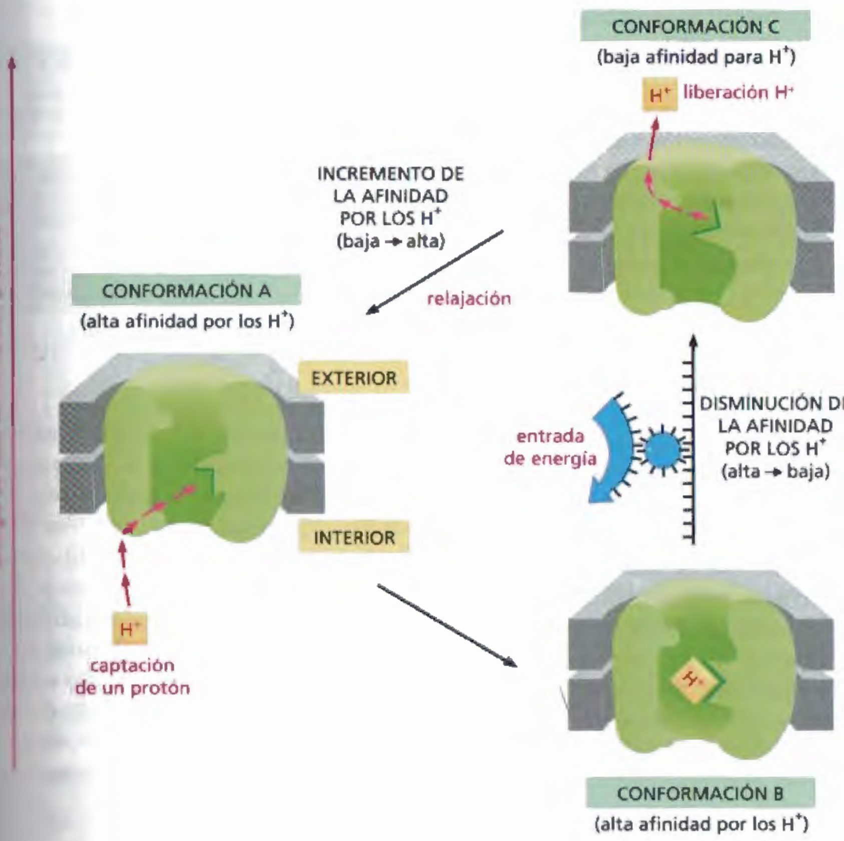


Figura 14–31 Modelo general de bombeo de H⁺. Este modelo de bombeo de H⁺ por proteínas de membrana está basado en los mecanismos que parece ser que utilizan tanto la NADH deshidrogenasa y la citocromo oxidasa como la bomba de protones impulsada por la luz en las bacterias como la bacteriorrodopsina. La proteína es impulsada a seguir un ciclo de tres conformaciones, señaladas como A, B y C. Estas conformaciones proteicas tienen diferentes energías, como se indica por su colocación vertical en este esquema (en ordenadas). En la conformación A, la proteína tiene una alta afinidad por los H⁺, lo que da lugar a que capte un H⁺ de la cara interna de la membrana. En la conformación C, la proteína tiene una baja afinidad por los H⁺, lo que provoca la liberación del protón a la cara externa de la membrana. La transición desde la conformación B a la C, que libera el H⁺, es energéticamente desfavorable y sólo se produce porque está siendo impulsada por una reacción energéticamente favorable acoplada de forma alostérica y que ocurre en el mismo momento en la proteína (*flecha azul*). Los otros dos cambios conformacionales, A → B y C → A, llevan a un estado de menor energía, por lo que se producen de forma espontánea. Por tanto, el ciclo A → B → C → A, libera energía libre, dando lugar al bombeo de protones desde el interior (el espacio de la matriz en la mitocondria) hacia el exterior (el espacio intermembrana en la mitocondria). En el caso de la citocromo oxidasa, la energía de la transición B → C la proporciona el transporte de electrones, mientras que en el caso de las bacteriorrodopsinas esta energía la proporciona la luz (véase la Figura 10–33). En otras bombas de protones, la energía procede de la hidrólisis de ATP. En todos los casos, son necesarias por lo menos tres conformaciones para generar un proceso de bombeo vectorial, por la misma razón que son necesarias al menos tres conformaciones para generar una proteína que vaya en una sola dirección en un filamento (véase la Figura 3–77).

se genera ningún tipo de gradiente de H⁺. La explicación de este efecto es tan elegante como sencilla: los agentes desacoplantes actúan como transportadores de H⁺ difusibles en la bicapa lipídica (ionóforos de H⁺) y constituyen una vía para el flujo de H⁺ a través de la membrana mitocondrial interna alternativa a la de la ATP sintasa. Como consecuencia de este "cortocircuito", la fuerza protón-motriz se disipa completamente por lo que ya no se puede sintetizar ATP.

Normalmente el control respiratorio modera el flujo de electrones a través de la cadena

La adición de un desacoplador, como el dinitrofenol, a unas células, hace que las mitocondrias aumenten sustancialmente su velocidad de transporte de electrones, provocando un aumento de la captación de oxígeno que refleja la existencia de un **control respiratorio**. Se cree que el control actúa a través del efecto inhibidor directo que tiene el gradiente electroquímico de protones sobre la velocidad de transporte de electrones. Cuando el gradiente se elimina por acción de un desacoplador, el transporte de electrones discurre a la máxima velocidad posible de una manera descontrolada. A medida que el gradiente aumenta, el transporte de electrones se vuelve más difícil y el proceso se vuelve más lento. Además, si de forma experimental se genera un fuerte gradiente electroquímico artificial de protones a través de la membrana interna, el transporte normal de electrones se para por completo y se detecta un *flujo reverso de electrones* en algunas secciones de la cadena respiratoria. Esta observación sugiere que el control respiratorio refleja un equilibrio simple entre la variación de energía libre del bombeo de protones ligado al transporte de electrones y la variación de energía libre del transporte de electrones, es decir, la magnitud del gradiente electroquímico de protones afecta tanto a la velocidad como a la dirección del transporte de electrones, así como afecta a la direccionalidad de la ATP sintasa (véase Figura 14–19).

El control respiratorio sólo es una parte de un elaborado sistema de controles por retroalimentación que coordina las velocidades de la glucólisis, la hidrólisis de los ácidos grasos, el ciclo del ácido cítrico y el transporte de electrones. Las velocidades de todos estos procesos se ajustan a la relación ATP:ADP y aumentan cuando se produce un aumento de la utilización de ATP que provoca una disminución de esta relación. Por ejemplo, la ATP sintasa de la membrana mitocondrial interna trabaja a mayor velocidad cuando aumenta la concen-

tración de sus dos sustratos ADP y P_i. Al aumentar la actividad de la enzima, aumenta el flujo de protones hacia el interior de la matriz, disipándose más rápidamente el gradiente electroquímico de protones. A su vez, el descenso de este gradiente activa la velocidad del transporte electrónico.

Sistemas de control similares a éste, incluida la retroinhibición negativa por ATP de varias enzimas clave, adaptan por ejemplo la velocidad de producción de NADH a la de utilización de NADH en la cadena respiratoria. Como resultado de todos estos mecanismos de control, durante un periodo de ejercicio intenso, el cuerpo oxida grasas y azúcares a una velocidad entre 5 y 10 veces superior a la que se produce durante un periodo de reposo.

Unos desacoplantes naturales convierten las mitocondrias del tejido adiposo marrón en máquinas productoras de calor

En algunos adipocitos, la respiración mitocondrial está desacoplada de la síntesis de AT, de forma natural. En estas células, conocidas como adipocitos marrones, la mayor parte de la energía de oxidación no se transforma en ATP sino que se disipa en forma de calor; la membrana mitocondrial interna de estas grandes mitocondrias contiene una proteína transportadora especial, conocida como proteína desacoplante, que permite que los protones se desplacen a favor de su gradiente electroquímico sin pasar por la ATP sintasa. Esta proteína desacoplante es activada cuando se requiere la producción de calor, y aumenta la velocidad de oxidación en las células de las grasas almacenadas y de modo que produzcan más calor que ATP. Los tejidos que contienen grasa marrón actúan como "mantas eléctricas" ayudando a sobrevivir a los animales que hibernan y a proteger del frío zonas sensibles en los recién nacidos humanos.

Las mitocondrias desempeñan muchos papeles críticos en el metabolismo celular

Las células están compuestas sobre todo por macromoléculas que, a medida que la célula va creciendo constantemente, tienen que ser reparadas o reemplazadas. Incluso en el caso de células o de organismos que no crecen, las moléculas que van desapareciendo deben ser reemplazadas mediante su biosíntesis. A lo largo de este capítulo destacamos el papel crítico de las mitocondrias en la producción del ATP que necesitan las células, para mantenerse como entidades altamente organizadas, en un universo que se dirige de forma inexorable hacia un incremento del desorden (descrito en el Capítulo 2). Sin embargo, la biosíntesis en el citosol requiere además de ATP un aporte constante de potencial reductor en forma de NADPH y esqueletos carbonados. La mayoría de las descripciones de este tipo de biosíntesis indica que los esqueletos de carbono necesarios proceden directamente de la degradación de azúcares, mientras que el NADPH se produce en el citosol a través de una vía accesoria de la degradación de azúcares (la vía de las pentosas fosfato, una alternativa a la glucólisis). Pero en condiciones en las que el alimento es abundante y la cantidad de ATP asequible es elevada, la mitocondria también genera tanto esqueletos de carbono como NADPH para el crecimiento celular. Con este fin, el exceso de citrato producido en la matriz mitocondrial por el ciclo del ácido cítrico es transportado a favor de su gradiente electroquímico hasta el citosol, donde es metabolizado produciendo NADPH y esqueletos de carbono para biosíntesis. Así, por ejemplo, como parte de una respuesta de la célula a señales de crecimiento, en el citosol se producen grandes cantidades de acetil CoA a partir del citrato exportado por la mitocondria; este hecho acelera la producción de ácidos grasos y de esteroles que forman nuevas membranas.

Las mitocondrias también son críticas para tamponar el potencial redox del citosol. Las células necesitan un aporte constante del aceptor de electrones NAD^+ para la reacción central de la glucólisis que transforma el gliceraldehído 3-fosfato en 1,3-bisfosfoglicerato (véase Figura 2–72). En el proceso, este NAD^+ es transformado en NADH y hace falta que se regenere NAD^+ transfiriendo en algún sitio los electrones de alta energía.

Finalmente, los electrones del NADH serán utilizados para ayudar a dirigir la fosforilación oxidativa en el interior de la mitocondria. Pero la membrana interna de la mitocondria es impermeable al NADH. Por lo tanto, los electrones deben pasar en el citosol desde el NADH a pequeñas moléculas que pueden desplazarse a través de la membrana mitocondrial interna. Una vez en la matriz, estas pequeñas moléculas transfieren sus electrones al

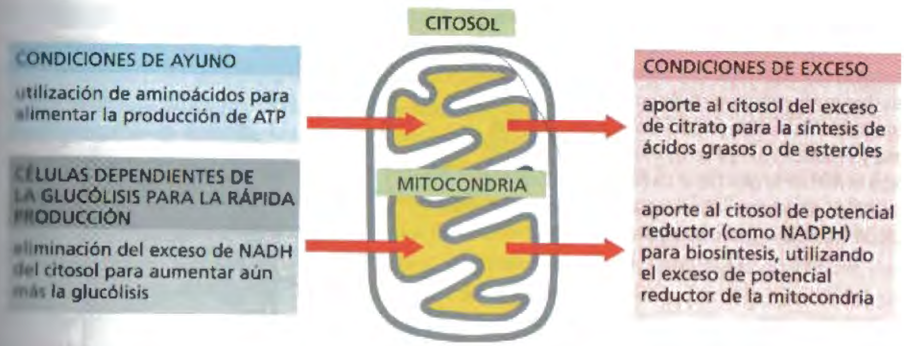


Figura 14–32 Papeles críticos de la mitocondria en el metabolismo celular, además de la producción de ATP. La gran cantidad de reacciones metabólicas esenciales que lleva a cabo la mitocondria, como las que se ilustran, enfatizan lo inadecuado que es considerar a la mitocondria únicamente como reactor que oxida piruvato y ácidos grasos para alimentar la fosforilación oxidativa.

NAD^+ formando NADH mitocondrial, tras lo cual vuelven a salir al citosol para volver a cargar más electrones. Este sistema de "lanzadera" está cortocircuitado en algunas células especializadas, como las células musculares de los insectos, que producen grandes cantidades de ATP mediante glucólisis aeróbica. En este caso, los electrones de alta energía derivados del gliceraldehído 3-fosfato pasan directamente a la superficie externa de la membrana mitocondrial interna, permitiendo que entren en la cadena de transporte de electrones de forma más rápida y más directa, pero con pérdida de parte de su energía aprovechable.

En condiciones de ayuno, las proteínas de nuestro cuerpo son degradadas en sus aminoácidos constituyentes y los aminoácidos son importados a la mitocondria y oxidados produciendo NADH para la producción de ATP. Así pues, mediante la realización de diferentes reacciones en condiciones diferentes, la mitocondria desempeña muchas funciones críticas en el mantenimiento del metabolismo celular (**Figura 14–32**).

Las bacterias también utilizan los mecanismos quimiosmóticos para aprovechar la energía

Las bacterias utilizan fuentes de energía muy diversas. Como las células eucariotas, algunas bacterias sintetizan ATP a partir de azúcares, oxidándolos hasta CO_2 y H_2O a través de la glucólisis y del ciclo del ácido cítrico; estas bacterias tienen en su membrana plasmática una cadena respiratoria muy similar a la de la membrana mitocondrial interna. Otras bacterias son anaeróbicas estrictas por lo que sólo obtienen la energía de la glucólisis (fermentación) o de una cadena electrónica que utiliza como aceptor final de electrones una molécula diferente al oxígeno. Estos aceptores alternativos pueden ser un compuesto nitrogenado (nitratos o nitritos), un compuesto de azufre (sulfatos o sulfitos) o un compuesto orgánico (fumarato o carbonato). Una serie de transportadores de electrones que se hallan en la membrana plasmática, comparables a los que se encuentran en las cadenas respiratorias mitocondriales, transfieren los electrones a estos aceptores.

A pesar de esta diversidad, la membrana plasmática de la mayoría de las bacterias presenta una ATP sintasa muy similar a la de las mitocondrias En las bacterias que tienen cadenas de transporte de electrones para producir energía, la cadena de transporte de electrones bombea H^+ fuera de la célula, estableciendo una fuerza protón-motriz a través de la membrana plasmática que impulsa la ATP sintasa a generar ATP. Existen otro tipo de bacterias en las que la ATP sintasa trabaja en sentido inverso: utiliza el ATP producido por la glucólisis para bombear H^+ y establece un gradiente de protones a través de la membrana plasmática; el ATP utilizado en este proceso se genera por un proceso de fermentación (descrito en el Capítulo 2).

Así, la mayoría de las bacterias, incluidas las anaeróbicas estrictas, mantienen un gradiente de protones a través de su membrana plasmática. El gradiente electroquímico de protones se utiliza para impulsar el motor flagelar, el Na^+ es bombeado fuera de las bacterias por un sistema de antiporte de Na^+-H^+ que desempeña la función de bomba de Na^+/K^+ de las células eucariotas. Este gradiente también es utilizado para transportar activamente nutrientes tales como aminoácidos y muchos azúcares, hacia el interior: cada nutriente es arrastrado hacia el interior de la célula junto con uno o más protones a través de simportadores específicos (**Figura 14–33**). En las células animales, por el contrario, la mayor parte del transporte hacia el interior a través de la membrana plasmática es impulsado por el gradiente de Na^+ (elevada concentración de Na^+ fuera y baja dentro) establecido por la bomba Na^+/K^+.

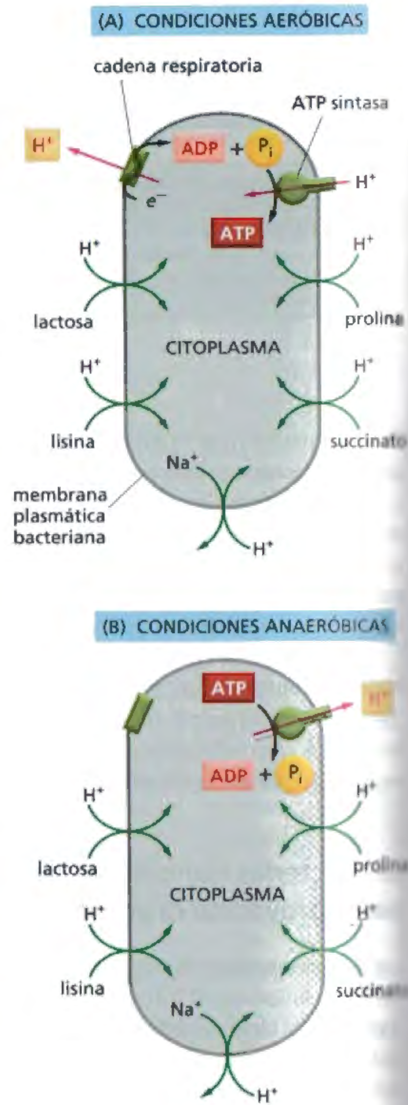


Figura 14-33 La importancia del transporte de H^+ en las bacterias. Una fuerza protón-motriz generada a través de la membrana plasmática bombea nutrientes hacia el interior de la célula y Na^+ hacia el exterior. (A) En una bacteria aeróbica, la cadena respiratoria genera un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana plasmática, este gradiente será utilizado para transportar algunos nutrientes al interior de la bacteria y producir ATP. (B) La misma bacteria, pero en condiciones anaeróbicas, obtendrá el ATP de la glucólisis. La ATP sintasa hidroliza parte de este ATP y genera un gradiente electroquímico de protones que impulsará los procesos de transporte que dependen de la cadena respiratoria en (A).

Entre los distintos tipos de bacterias, existen algunas que son capaces de adaptarse a vivir en ambientes muy alcalinos y deben mantener su citoplasma a un pH fisiológico. Para estas células, cualquier intento de generar un gradiente electroquímico de protones sería opuesto al elevado gradiente de concentración de protones en dirección contraria (más H^+ en el interior que en el exterior). Probablemente por esta razón, algunas de estas bacterias sustituyeron el Na^+ por H^+ en todos sus mecanismos quimiosmóticos. La cadena respiratoria bombea Na^+ hacia el exterior de la célula, los sistemas de transporte están acoplados a un simporte de Na^+ hacia adentro, el motor flagelar está impulsado por un flujo de Na^+ hacia adentro y la responsable de la mayor parte de su síntesis de ATP parece ser una ATP sintasa impulsada por Na^+. La existencia de estas bacterias demuestra que el principio de la quimiosmosis es más fundamental que el gradiente electroquímico de protones en el que se basa normalmente.

Resumen

La cadena respiratoria embebida en la membrana mitocondrial interna contiene tres complejos enzimáticos principales, implicados en la transferencia de electrones desde el NADH hasta el O_2. Cada complejo puede ser purificado e insertado en vesículas lipídicas sintéticas, demostrándose así que bombean H^+ cuando se transportan electrones a su través. En estos complejos, los electrones son transferidos a través de una serie de proteínas unidas a transportadores de electrones, incluyendo centros hemo y ferrosulfurados. La energía liberada, a medida que los electrones se desplazan a niveles cada vez más bajos de energía, es utilizada para dirigir cambios alostéricos en cada uno de los complejos enzimáticos respiratorios que colaboran con las bombas de protones. Los electrones son transportados entre los complejos enzimáticos por los transportadores móviles de electrones la ubiquinona y el citocromo c *que van y vienen de uno a otro complejo enzimático, completando la cadena de transporte electrónico. La vía del flujo de electrones es: NADH → complejo de la NADH deshidrogenasa → ubiquinona → complejo* b-c₁ *→ complejo* c *→ complejo de la citocromo oxidasa → oxígeno molecular (O_2).*

El acoplamiento del transporte energéticamente favorable de electrones con el bombeo de H^+ hacia el exterior de la matriz genera un gradiente electroquímico de protones. Este gradiente se utiliza para fabricar ATP por la ATP sintasa, a través del cual los protones fluyen de nuevo hacia la matriz. La presencia universal de la ATP sintasa en las mitocondrias, los cloroplastos y los procariotas testifica su importancia central en los mecanismos quimiosmóticos de las células.

CLOROPLASTOS Y FOTOSÍNTESIS

Todos los animales y la mayoría de los microorganismos confían en la continuada captación de grandes cantidades de compuestos orgánicos de su entorno. Estos compuestos aportan los esqueletos carbonados para la biosíntesis y la energía metabólica que impulsa todos los procesos celulares. Es probable que los primeros organismos de la Tierra primitiva tuvieran acceso a una abundancia de compuestos orgánicos de origen geoquímico, pero es evidente que la mayoría de estos compuestos originales se agotaron hace miles de millones de años. Desde ese periodo, casi todos los materiales orgánicos que han necesitado las células vivas han sido producidos por *organismos fotosintéticos*, incluyendo muchos tipos de bacterias fotosintéticas.

Las cianobacterias, que son las bacterias fotosintéticas más evolucionadas, tienen unos requerimientos nutricionales mínimos. Estas bacterias utilizan los electrones del agua y la energía de la luz solar para transformar el CO_2 atmosférico en compuestos orgánicos;

este proceso se denomina *fijación del carbono*. En el transcurso de la hidrólisis del agua [en la reacción global $nH_2O + nCO_2 \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O)_n + nO_2$], también liberan a la atmósfera el oxígeno necesario para la fosforilación oxidativa. Como veremos en esta sección, se cree que la evolución de las cianobacterias a partir de bacterias fotosintéticas más primitivas hizo posible por primera vez el desarrollo de las formas aeróbicas de vida.

En las plantas y en las algas, que se desarrollaron más tarde, la fotosíntesis se realiza en un orgánulo intracelular especializado: el **cloroplasto**. Los cloroplastos llevan a cabo la fotosíntesis durante las horas de luz. Los productos inmediatos de la fotosíntesis, NADH y ATP, son utilizados por las células fotosintéticas para producir muchas moléculas orgánicas. En las plantas, estos productos incluyen un azúcar de bajo peso molecular (normalmente sacarosa), que estas células exportan para cubrir las necesidades metabólicas de muchas células no fotosintéticas del organismo.

Las evidencias bioquímicas y genéticas sugieren que los cloroplastos son descendientes de bacterias fotosintéticas productoras de oxígeno que fueron endocitadas y vivieron en simbiosis con células primitivas eucariotas. También se cree que, en general, las mitocondrias son descendientes de bacterias endocitadas. Probablemente, la gran cantidad de diferencias que hay entre cloroplastos y mitocondrias refleja tanto el hecho de que proceden de antecesores bacterianos diferentes como su posterior divergencia evolutiva. Sin embargo, los mecanismos fundamentales implicados en la síntesis de ATP impulsada por la luz, en los cloroplastos, y los implicados en la síntesis de ATP impulsada por la respiración, en las mitocondrias, son parecidos.

El cloroplasto es un miembro de la familia de los plastidios

El cloroplasto es el miembro más destacado de la familia de los **plastidios**. Todas las células vivas de las plantas tienen plastidios. Cada tipo celular tiene su propio complemento característico. Todos los plastidios tienen unas características comunes. Hay que destacar que todos los plastidios de una especie de planta concreta contienen múltiples copias del mismo genoma, relativamente corto. Además, cada plastidio está rodeado por una envoltura compuesta por dos membranas concéntricas.

Como se explicó en el Capítulo 12 (véase Figura 12–3), todos los plastidios se desarrollan a partir de los *proplastidios*, pequeños orgánulos presentes en las células inmaduras de los meristemos de la planta (**Figura 14–34A**). Los proplastidios se desarrollan en función de los requerimientos de cada célula diferenciada; el tipo de proplastidio viene determinado en gran parte por el genoma nuclear. Si una hoja se hace crecer en la oscuridad, sus proplastidios aumentarán de tamaño y se transformarán en *etioplastos*, los cuales presentan una cadena semicristalina de membranas internas que en lugar de clorofila tienen una clorofila amarilla precursora. Cuando son expuestos a la luz, los etioplastos se transforman rápidamente en cloroplastos mediante la conversión de este precursor en clorofila, y sintetizan nuevas membranas, pigmentos, enzimas fotosintéticas y componentes de la cadena de transporte electrónico.

Los *leucoplastos* son plastidios que aparecen en muchos tejidos internos y epidérmicos que no se vuelven verdes y fotosintéticos. Son ligeramente más grandes que los proplastidios. El *amiloplasto* es una forma común de leucoplasto (Figura 14–34B) que acumula el

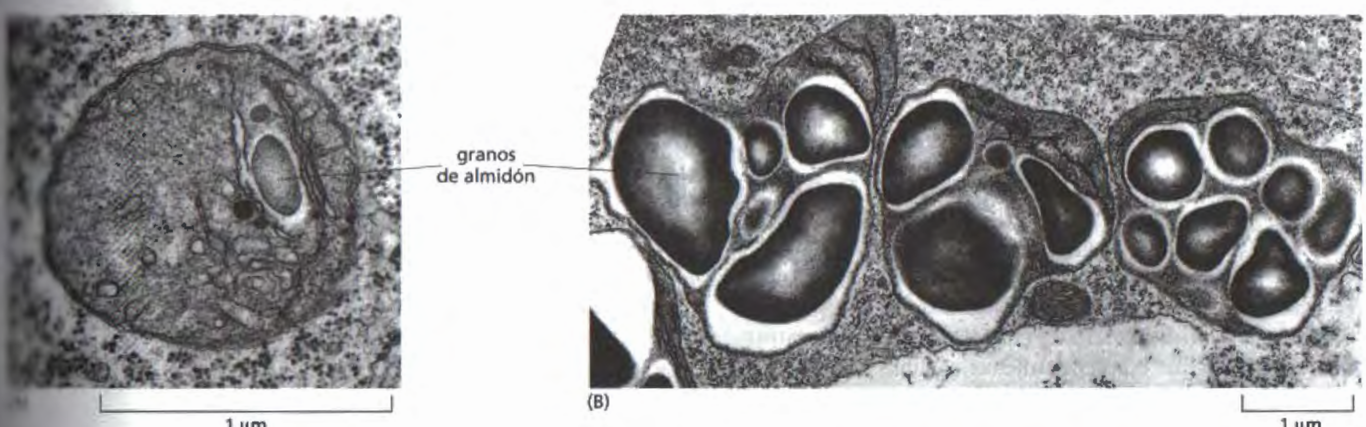
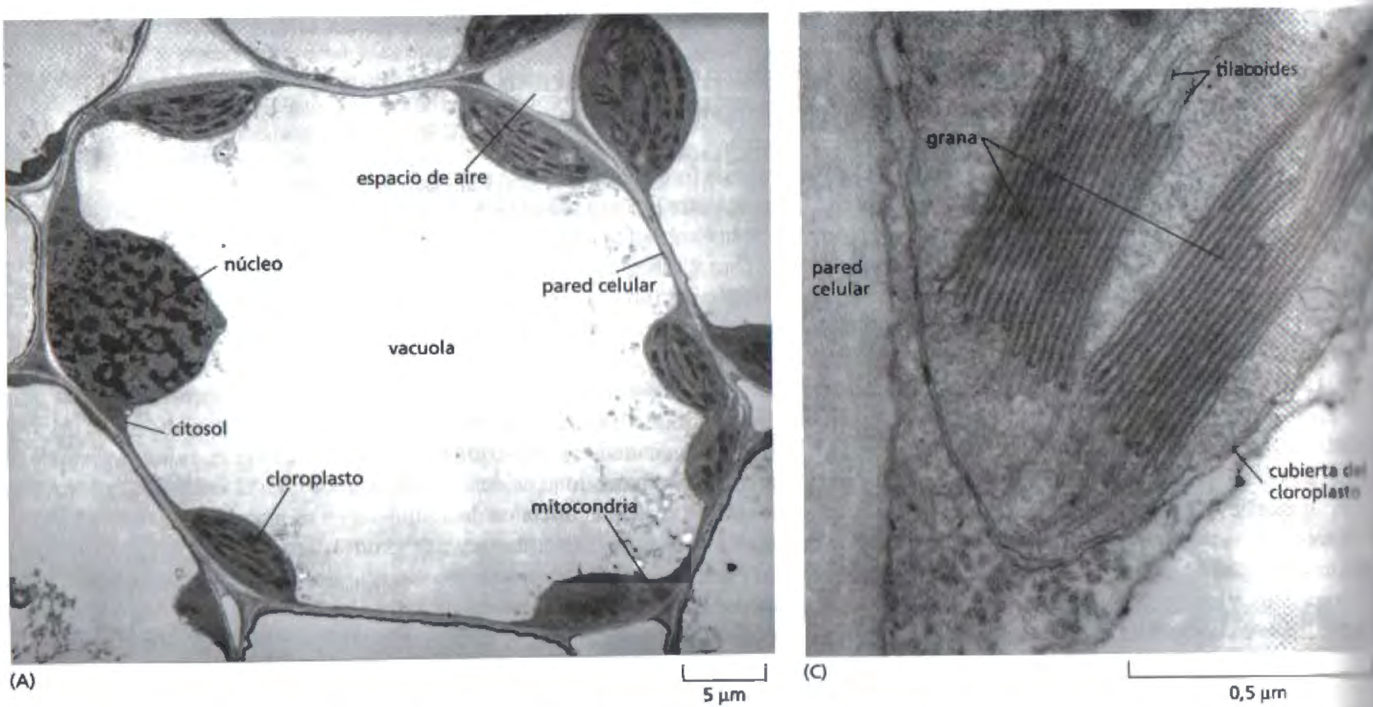


Figura 14–34 Diversidad de los plastidios. (A) Proplastidio de una célula del extremo de la raíz de una planta de judía. Obsérvese la doble membrana y la relativa escasez de membranas internas. (B) Tres amiloplastos (una forma de leucoplasto) o plastidios almacenadores de almidón en una célula del extremo de la raíz de una planta de soja. (A partir de B. Gunning y M. Steer, Plant Cell Biology: Structure and Function. Sundbury, MA: Jones & Bartlett, 1996.)



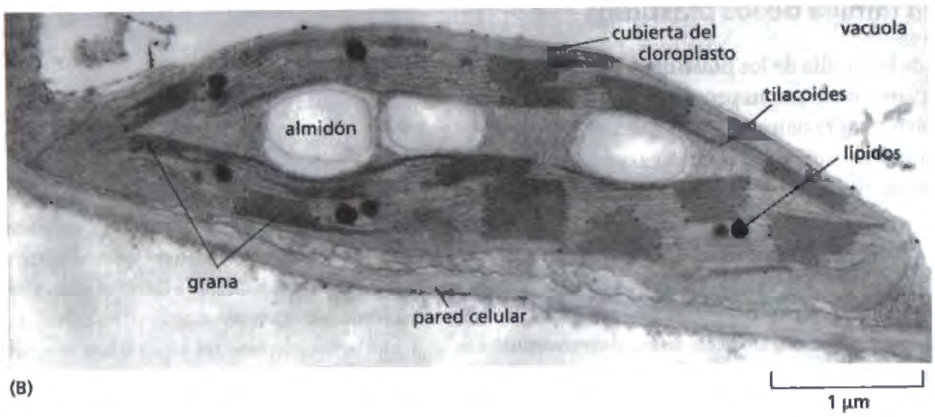


Figura 14–35 Electromicrografía de varios cloroplastos. (A) Célula de una hoja de trigo: una gran vacuola está rodeada por una fina franja de citoplasma que contiene el núcleo, los cloroplastos y las mitocondrias. (B) Sección ultrafina de un cloroplasto, mostrando sus membranas, gránulos de almidón y gotas lipídicas (grasa) que se han acumulado en el estroma como resultado de los procesos biosintéticos que se producen en este lugar. (C) Imagen a mayor aumento de dos grana, nombre dado a los apilamientos de tilacoides. (Por cortesía de K. Plaskitt.)

polisacárido almidón en tejidos de reserva como fuente de azúcar para su uso. En algunas plantas, como las patatas, los amiloplastos pueden llegar a ser tan grandes como una célula animal de tamaño mediano.

Los plastidios no sólo son lugares en los que tiene lugar la fotosíntesis y la deposición de materiales de reserva. Las plantas han utilizado sus plastidios para la compartimentación de su metabolismo intermediario. La síntesis de las purinas y pirimidinas, la mayoría de los aminoácidos y de todos los ácidos grasos de las plantas tiene lugar en los plastidios, mientras que en las células animales todos estos compuestos se sintetizan en el citosol.

Los cloroplastos se parecen a las mitocondrias, pero tienen un compartimiento adicional

Los cloroplastos realizan sus interconversiones energéticas mediante mecanismos quimiosmóticos de forma muy semejante a como lo hacen las mitocondrias. Aunque más grandes (**Figura 14–35**A), su organización se basa en los mismos principios Tienen una membrana externa altamente permeable, una membrana interna mucho menos permeable en la que están embebidas proteínas de transporte y un estrecho espacio intermembrana entre ellas. En su conjunto, estas membranas forman la envoltura del cloroplasto (Figura 14–35B, C). La membrana interna delimita un gran espacio llamado **estroma**, que es análogo a la matriz mitocondrial y que contiene muchas enzimas metabólicas. Al igual que la mitocondria, el cloroplasto tiene su propio genoma y su sistema genético. El estroma, por otra parte, también contiene un conjunto especial de ribosomas, moléculas de RNA y el DNA del cloroplasto.

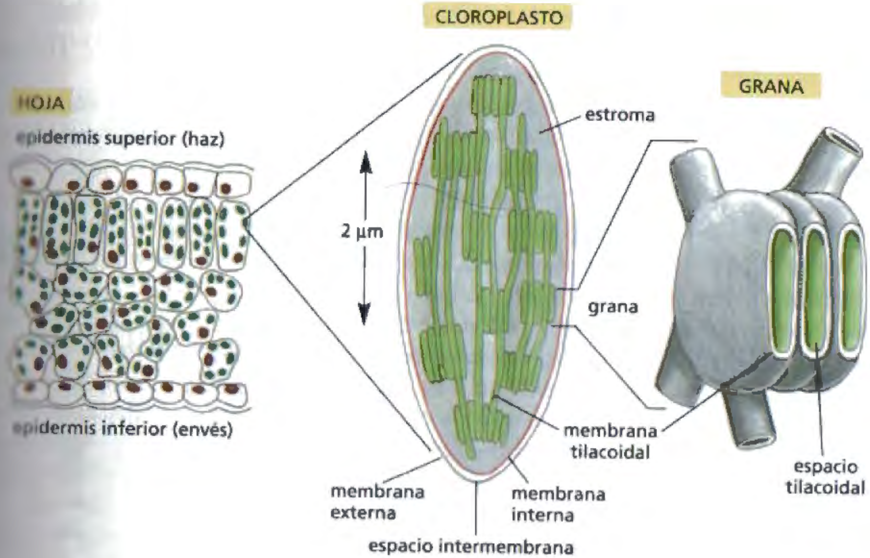


Figura 14–36 El cloroplasto. Este orgánulo fotosintético presenta tres membranas: la membrana externa, la interna y la tilacoidal, que delimitan tres compartimientos internos diferentes (el espacio intermembrana, el estroma y el espacio tilacoidal). La membrana tilacoidal tiene todos los sistemas que generan energía del cloroplasto, incluyendo la clorofila. En las electromicrografías, esta membrana parece estar formando unidades que delimitan vesículas aplanadas (véase la Figura 14–35). Sin embargo, probablemente estas vesículas están unidas entre sí, de forma que en cada cloroplasto existe una sola membrana muy plegada. Como se indica en la figura, los tilacoides están interconectados y tienden a agruparse apilándose formando los grana.

Sin embargo, existe una importante diferencia entre la organización de las mitocondrias y de los cloroplastos. Por lo general la membrana interna del cloroplasto no está plegada formando crestas y no contiene ninguna cadena transportadora de electrones. En lugar de ello, la cadena de transporte de electrones, el sistema fotosintético para la captación de la luz y una ATP sintasa están contenidos en la *membrana tilacoidal*, una tercera membrana distinta que forma un conjunto de sacos discoidales aplanados, los *tilacoides* (**Figura 14–36**). Se cree que el lumen de cada tilacoide está conectado con el lumen de los otros tilacoides, definiendo así un tercer compartimiento interno denominado el *espacio tilacoidal* que separa la membrana tilacoidal del estroma que le rodea. Las membranas del tilacoide interaccionan entre ellas formando numerosos sacos apilados, denominados *grana*.

En la **Figura 14–37** se ilustran las similitudes y diferencias ultraestructurales entre las mitocondrias y los cloroplastos. Una diferencia importante es que la cabeza de la ATP sintasa, donde se sintetiza el ATP, en el cloroplasto sobresale de la membrana tilacoidal hacia el estroma, mientras que en la mitocondria sobresale de la membrana interna de la mitocondria hacia la matriz.

Los cloroplastos captan la energía de la luz solar y la utilizan para fijar carbono

La gran cantidad de reacciones que se producen durante la fotosíntesis, se pueden agrupar en dos grandes categorías:

1. En las reacciones **fotosintéticas de transferencia de electrones** (llamadas también "reacciones de la fase lumínica") la energía derivada de la luz solar activa un electrón

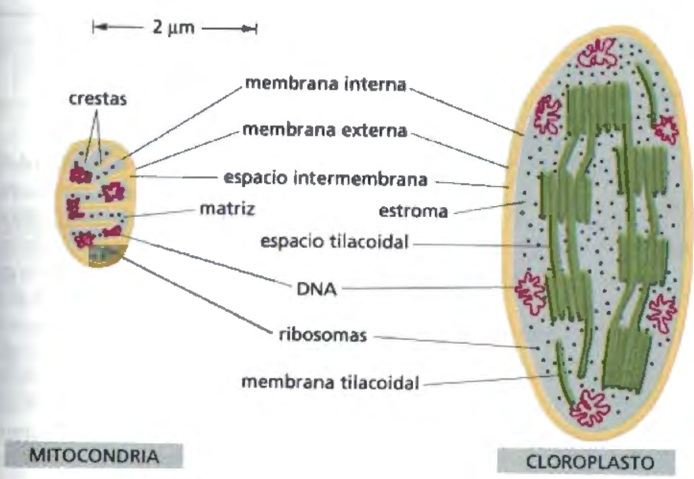


Figura 14–37 Comparación entre una mitocondria y un cloroplasto. Por lo general, el cloroplasto es mucho mayor que la mitocondria y además de una membrana interna y otra externa, se caracteriza por tener una membrana tilacoidal que define un espacio tilacoidal. A diferencia del cloroplasto, la membrana mitocondrial interna está plegada formando crestas, lo cual incrementa su superficie.

de la *clorofila*, pigmento verde orgánico, lo cual permite que este electrón se desplace a través de una cadena de oxidación de la membrana tilacoidal, de manera análoga a como se desplazan los electrones a través de la cadena respiratoria de las mitocondrias. La clorofila obtiene sus electrones del agua (H_2O), produciendo O_2 como producto final. Durante el proceso de transporte de electrones se bombean H^+ a través de la membrana tilacoidal y el gradiente electroquímico de protones resultante impulsa la síntesis de ATP en el estroma. Como último paso en la serie de reacciones, los electrones de alta energía son cedidos (junto con H^+) al $NADP^+$ transformándolo en NADPH. Todas estas reacciones se producen en el cloroplasto.

2. En las **reacciones de fijación del carbono** (llamadas también "reacciones de la fase oscura") el ATP y el NADPH producidos en las reacciones fotosintéticas de transferencia de electrones se utilizan como fuente de energía y de poder reductor respectivamente, para impulsar la transformación de CO_2 en carbohidratos. Las reacciones de fijación de carbono, que empiezan en el estroma del cloroplasto y continúan en el citosol celular, producen, en las hojas de las plantas, sacarosa y otras muchas otras moléculas orgánicas. La sacarosa es exportada a otros tejidos como fuente de moléculas orgánicas y de energía para el crecimiento.

Así, la formación de ATP, NADPH y O_2 (que necesita de forma directa la energía de la luz) y la conversión del CO_2 a carbohidrato (que necesita, tan sólo indirectamente, la energía de la luz), son dos procesos fotosintéticos separados el uno del otro (**Figura 14–38**), pero interconectados mediante elaborados mecanismos de retroalimentación. Por ejemplo, varias de las enzimas de los cloroplastos que son necesarias para la fijación del carbono, se inactivan en la oscuridad y se reactivan por los procesos de transporte electrónico estimulados por la luz.

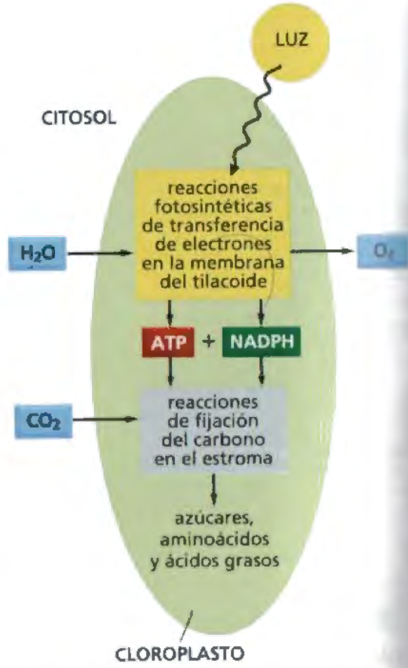
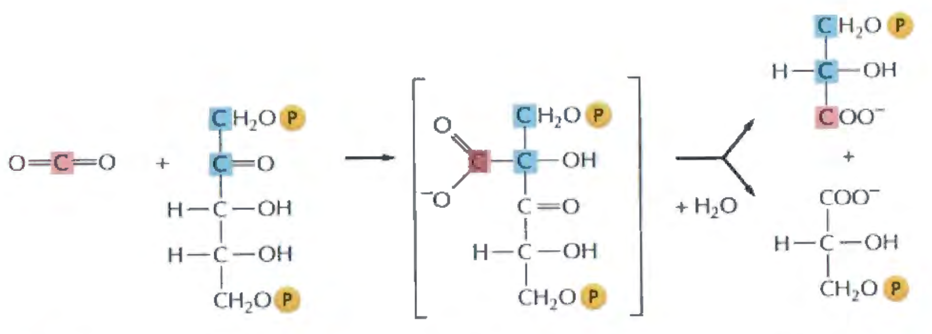


Figura 14–38 El proceso de la fotosíntesis en un cloroplasto. En las reacciones fotosintéticas de transferencia de electrones, el agua se oxida y se libera oxígeno, mientras que en las reacciones de fijación del carbono se asimila dióxido de carbono, esto es, se fija, y produce azúcares y una gran variedad de moléculas orgánicas.

La fijación del carbono está catalizada por la ribulosa bisfosfato carboxilasa

En este capítulo hemos visto que las células producen ATP aprovechando la gran cantidad de energía libre que se libera cuando los carbohidratos son oxidados hasta CO_2 y H_2O. Por consiguiente, es evidente que la reacción inversa en la que el CO_2 y el H_2O se combinan formando carbohidratos tiene que ser una reacción muy desfavorable, por lo que sólo se producirá si está acoplada con otra reacción energéticamente favorable que la impulse.

En la **Figura 14–39**, se ilustra la reacción central de **fijación del carbono**, en la que un átomo de carbono inorgánico se transforma en un carbono orgánico: el CO_2 de la atmósfera se combina con el compuesto de cinco carbonos, la ribulosa 1,5-bisfosfato y con agua produciendo dos moléculas de tres carbonos, el 3-fosfoglicerato. Esta reacción de "fijación del carbono", que fue descubierta en 1948, se produce en el estroma del cloroplasto y está catalizada por una gran enzima llamada *ribulosa bisfosfato carboxilasa*. Cada molécula de enzima trabaja con bastante lentitud (transforma unas 3 moléculas de sustrato por segundo, en comparación con las 1000 moléculas por segundo de una enzima típica), por lo que la reacción requiere un número extraordinariamente elevado de moléculas de enzima. A menudo la ribulosa bisfosfato carboxilasa constituye más del 50% del total de proteína del cloroplasto; se cree que es la proteína más abundante de la Tierra.



dióxido de carbono — ribulosa 1,5-bisfosfato — producto intermediario — dos moléculas de 3-fosfoglicerato

Figura 14–39 Reacción inicial del proceso de fijación del carbono. Esta reacción, en la que el dióxido de carbono se transforma en carbono orgánico, se desarrolla en el estroma del cloroplasto y está catalizada por la enzima ribulosa bisfosfato carboxilasa. El producto de la reacción, el 3-fosfoglicerato, también es un importante intermediario de la glucólisis. Cuando la enzima adiciona oxígeno en lugar de CO_2, los dos átomos de carbono, que se presentan en color *azul*, se utilizan para generar fosfoglicolato (véase el texto).

Por cada molécula de CO_2 fijada se consumen tres moléculas de ATP y dos de NADPH

La reacción real de fijación del CO_2 es energéticamente favorable gracias a la reactividad del compuesto rico en energía *ribulosa 1,5-bisfosfato* al que se añade cada molécula de CO_2 (véase Figura 14–39). La elaborada vía metabólica por la que se regenera ribulosa 1,5-bisfosfato requiere tanto NADPH como ATP; se descubrió gracias a un experimento que constituye uno de los mayores éxitos de la utilización de los radioisótopos como trazadores en bioquímica. En la **Figura 14–40** está esquematizado este **ciclo de fijación del carbono** (también denominado **ciclo de Calvin**). El ciclo comienza cuando 3 moléculas de CO_2 son fijadas, gracias a la ribulosa bisfosfato carboxilasa, produciéndose 6 moléculas de 3-fosfoglicerato (un total de 6 × 3 = 18 átomos de carbono: 3 procedentes del CO_2 y 15 de la ribulosa 1,5-bisfosfato). Los 18 átomos de carbono recorren entonces un ciclo de reacciones que regeneran las 3 moléculas de ribulosa 1,5-bisfosfato que fueron utilizadas en el primer paso de fijación del carbono (3 × 5 = 15 átomos de carbono). Así, el proceso genera como ganancia neta una molécula de *gliceraldehído 3-fosfato* (3 átomos de carbono).

Por cada molécula de CO_2 que es transformada en carbohidrato se consumen un total de 3 moléculas de ATP y 2 moléculas de NADPH. La ecuación neta es:

$$3CO_2 + 9ATP + 6NADPH + \text{agua} \rightarrow$$
$$\text{gliceraldehído 3-fosfato} + 8P_i + 9ADP + 6NADP^+$$

Así, para la formación de moléculas orgánicas a partir de CO_2 y H_2O se requiere *energía de enlace fosfato* (en forma de ATP) y *poder reductor* (en forma de NADPH). Más adelante se volverá a tratar este importante punto.

El gliceraldehído 3-fosfato producido en los cloroplastos a través del ciclo de fijación del carbono es un azúcar de tres carbonos que también se utiliza como intermediario central en la glucólisis. Una gran cantidad de este azúcar se exporta al citosol donde puede ser rápida-

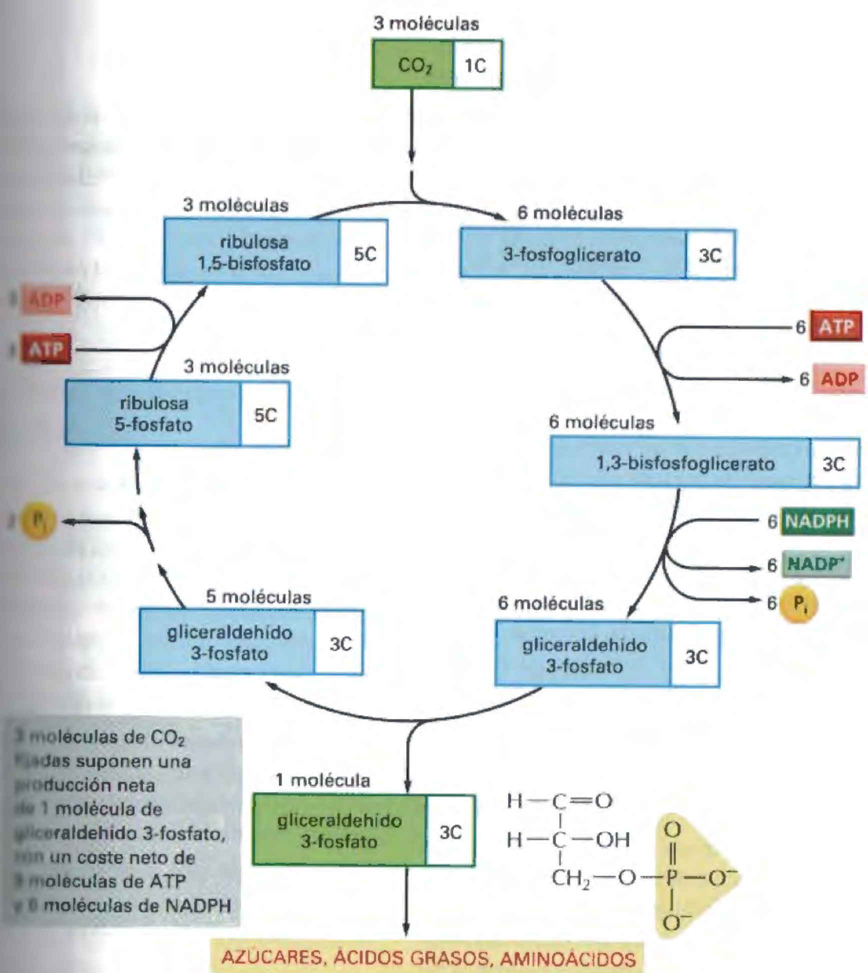


Figura 14–40 Ciclo de fijación del carbono, que forma moléculas orgánicas a partir de CO_2 y H_2O. El número de átomos de carbono de cada molécula se indica en *recuadros blancos*. Entre el gliceraldehído 3-fosfato y la ribulosa 5-fosfato hay una gran cantidad de intermediarios, que en este esquema se han omitido en aras de una mayor claridad. Tampoco se representa la entrada de agua en el ciclo.

mente transformado en fructosa 6-fosfato y glucosa 1-fosfato mediante la inversión de varias reacciones de la glucólisis (véase Panel 2–8, pp.120–121). Luego, la glucosa 1-fosfato es transformada en el azúcar nucleótido UDP-glucosa, que se combina con la fructosa 6-fosfato formando sacarosa fosfato, el intermediario precursor del disacárido sacarosa. La **sacarosa** es la forma principal de transporte de azúcares en las células vegetales, como en las células animales lo es la glucosa: al igual que la glucosa, que es transportada en la sangre de los animales, la sacarosa es exportada desde las hojas a través de los haces vasculares, proporcionando los carbohidratos que necesita el resto de la planta.

La mayor parte del gliceraldehído 3-fosfato que permanece en el cloroplasto es transformado en *almidón* en el estroma. Al igual que el glucógeno en las células animales, el **almidón** es un gran polímero de glucosa que se utiliza como reserva de carbohidratos (véase Figura 14–34B). La producción de almidón está regulada de tal manera que durante periodos de exceso de capacidad fotosintética se produce y almacena en grandes granos en el estroma del cloroplasto. Este fenómeno sucede a través de reacciones que se producen en el estroma, inversas de las que tienen lugar en la glucólisis: transforman el gliceraldehído 3-fosfato en glucosa 1-fosfato, que entonces se utiliza para producir el azúcar-nucleótido ADP-glucosa, el precursor inmediato del almidón. Durante la noche, la planta degrada el almidón y obtiene energía para las necesidades metabólicas de la planta. El almidón representa una parte importante de la dieta de todos los animales herbívoros.

En algunas plantas, la fijación del carbono está compartimentada, lo cual facilita el crecimiento a concentraciones bajas de CO_2

Aunque la ribulosa bisfosfato carboxilasa añade preferentemente una molécula de CO_2 a la ribulosa 1,5-bisfosfato, también puede utilizar O_2 como sustrato en lugar de CO_2; si la concentración de CO_2 es baja, añadirá O_2 a la ribulosa 1,5-bisfosfato (véase Figura 14–39). Este es el primer paso de una vía llamada **fotorrespiración**, cuyo efecto es consumir O_2 y liberar CO_2 sin producir energía útil. En muchas plantas, alrededor de una tercera parte del CO_2 fijado se pierde de nuevo como resultado de la fotorrespiración.

La fotorrespiración puede resultar un proceso clave en condiciones secas y calurosas en las que las plantas se ven forzadas a cerrar sus estomas (los poros de intercambio gaseoso de sus hojas, cada uno de los cuales se denomina un estoma) con el fin de evitar una pérdida excesiva de agua. Esto provoca una caída extraordinaria de los niveles de CO_2 en la hoja y favorece la fotorrespiración. No obstante, en las hojas de muchas plantas que crecen en ambientes cálidos y secos, como ocurre con los cereales y con la caña de azúcar, tiene lugar una adaptación especial. En estas plantas, el ciclo de fijación del carbono tiene lugar sólo en los cloroplastos de las *células túnico-vasculares*, que contienen toda la ribulosa bisfosfato carboxilasa de la planta. Estas células están protegidas del aire y rodeadas por una capa especializada de *células del mesófilo* que utilizan la energía aprovechada por sus cloroplastos para "bombear" CO_2 hacia las células túnico-vasculares. Esto abastece a la ribulosa bisfosfato carboxilasa con una alta concentración de CO_2, que disminuye en gran medida la fotorrespiración.

La bomba de CO_2 es un ciclo de reacciones que empieza con un paso especial de fijación del CO_2, catalizado en el citosol de las células del mesófilo por una enzima que une dióxido de carbono (en forma de bicarbonato) con alta afinidad y lo combina con una molécula activada de tres carbonos (el fosfoenol piruvato) formando una molécula de cuatro carbonos. La molécula de cuatro carbonos difunde en las células túnico-vasculares donde es escindida liberando CO_2 y generando una molécula de tres carbonos. La molécula de cuatro carbonos difunde a las células túnico-vasculares, donde es transformada, liberando el CO_2 y generando una molécula de tres carbonos. El ciclo de bombeo se completa cuando este compuesto de tres carbonos vuelve a las células del mesófilo y es transformado en su forma original activada. Las plantas que fijan CO_2 capturándolo mediante su conversión en un compuesto de cuatro carbonos, reciben el nombre de *plantas C_4*. Todas las demás plantas reciben el nombre de *plantas C_3* porque capturan el CO_2 directamente en un compuesto de tres carbonos, el 3-fosfoglicerato (**Figura 14–41**).

Como sucede en cualquier proceso que implique el transporte vectorial, el bombeo en las células túnico-vasculares de las plantas C_4 tiene un coste energético (se hidroliza ATP; véase la Figura 14–41B). Sin embargo, en los ambientes secos y calurosos este coste es por lo general muy inferior a la pérdida por fotorrespiración de las plantas C_3, por lo que las plantas C_4 tienen una ventaja potencial. Además, dado que las plantas C_4 pueden realizar la fo-

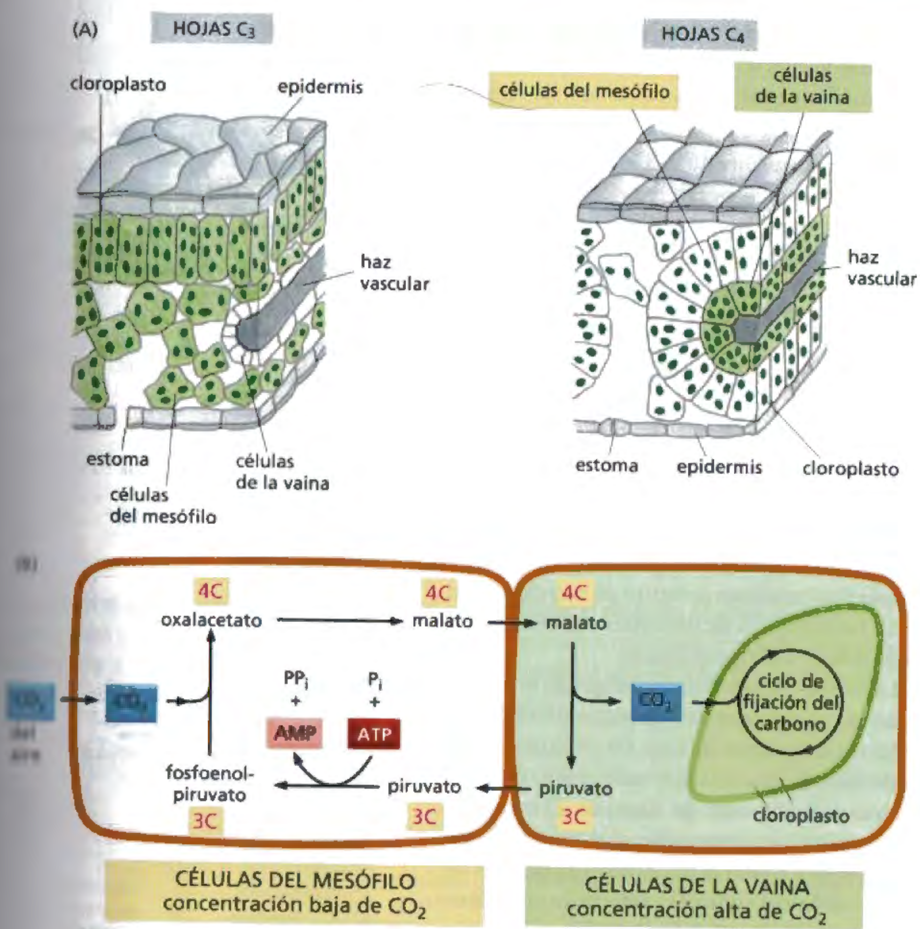


Figura 14–41 Bombeo de CO_2 en plantas C_4. (A) Comparación entre la anatomía interna de la hoja de una planta C_3 y la de una planta C_4. Las células dibujadas en color *verde* contienen cloroplastos que llevan a cabo el ciclo normal de fijación del carbono. En las plantas C_4, las células del mesófilo no fijan carbono sino que están especializadas en el bombeo de CO_2, y generan una elevada relación CO_2 / O_2 en las células túnico-vasculares, que son las únicas células de estas plantas en las que tiene lugar el ciclo de fijación del carbono. Los haces vasculares transportan hasta otros tejidos la sacarosa producida en la hoja. (B) Esquema que visualiza cómo se concentra el dióxido de carbono en las células en fondo de saco para el aprovechamiento de la energía de ATP en células del mesófilo.

síntesis en el interior de las hojas a concentraciones de CO_2 más bajas, necesitan abrir menos sus estomas y, por lo tanto, pueden fijar cerca del doble de carbono neto por unidad de agua perdida que las plantas C_3. Este tipo de fijación del carbono ha evolucionado independientemente en varios linajes de plantas. Aunque la gran mayoría de especies vegetales son del tipo C_3, las plantas C_4, como el maíz y la caña de azúcar, son mucho más eficientes transformando la energía de la luz solar en biomasa que las plantas C_3, como por ejemplo los cereales. Por tanto, las plantas C_3 son de especial importancia para la agricultura mundial.

La fotosíntesis depende de la fotoquímica de las moléculas de clorofila

Una vez descritas las reacciones de fijación del carbono, vamos a retornar a la cuestión sobre cómo las reacciones fotosintéticas de transferencia de electrones generan en la planta el ATP y el NADH necesario para impulsar la producción de los carbohidratos a partir de CO_2 y H_2O. La luz solar captada por las moléculas de **clorofila** (**Figura 14–42**) aporta la energía necesaria. El proceso de transformación de energía empieza cuando un cuanto de luz (un *fotón*) excita a una molécula de clorofila desplazando un electrón de esta molécula de un orbital molecular a otro de mayor energía. Esta molécula excitada es inestable y tiende a volver con rapidez a su estado original no excitado, lo cual puede suceder por una de estas tres vías:

1. Mediante la transformación de la energía extra en calor (movimientos moleculares) o por alguna combinación de calor y luz de una longitud de onda más larga (fluorescencia); este proceso de fluorescencia ocurre cuando una molécula de clorofila en solución absorbe energía luminosa.
2. Mediante la transferencia de la energía extra –pero no del electrón– directamente a una molécula de clorofila vecina, por un proceso denominado *transferencia de energía por resonancia*.

3. Mediante la transferencia del electrón de alta energía, cargado negativamente, a otra molécula cercana, un *aceptor de electrones*, tras lo cual la molécula de clorofila –cargada positivamente– retorna a su estado original tomando un electrón de baja energía de alguna otra molécula, un *dador de electrones*.

En el proceso de la fotosíntesis, los dos últimos mecanismos se hallan claramente facilitados por dos complejos proteicos: la transferencia de energía por resonancia mediante un *complejo antena* y la transferencia del electrón de alta energía mediante un *centro de reacción fotoquímico*. Estos dos tipos de complejos proteicos, actuando de forma coordinada, posibilitan la mayoría de la vida sobre la Tierra. Todo seguido se describen cómo actúan.

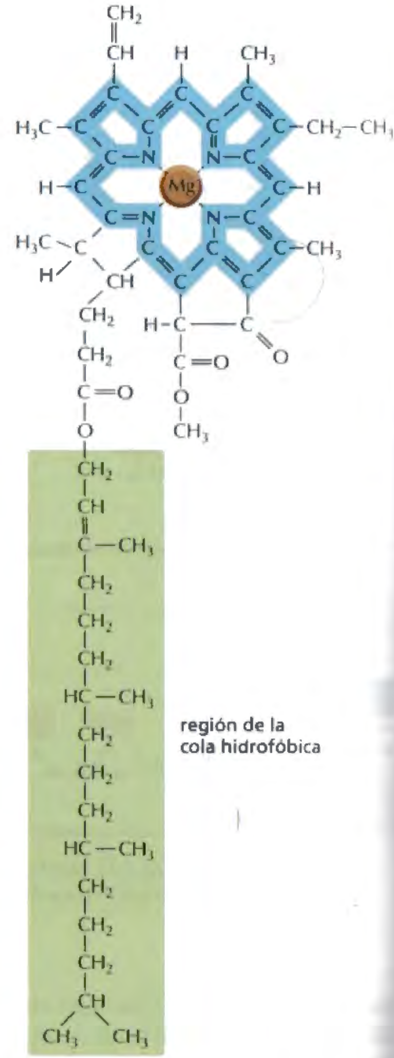


Figura 14–42 Estructura de la clorofila. Un átomo de magnesio está unido a un an[illo] de porfirina, que está relacionado con el anillo de porfirina que une hierro en el grupo hemo (véase Figura 14-22). En los enlaces señalados en *azul*, los electrones están deslocalizados.

Un fotosistema está formado por un centro de reacción fotoquímico y un complejo antena

Unos grandes complejos multiproteicos, denominados **fotosistemas**, catalizan la transformación de la energía luminosa capturada por moléculas excitadas de clorofila, en formas útiles de energía. Un fotosistema consiste en dos componentes estrechamente relacionados: un complejo antena que consiste en unas proteínas unidas a un gran conjunto de moléculas de pigmento que capturan la energía solar y la canalizan al centro de reacción, y un centro de reacción fotoquímico que consiste en un complejo de proteínas y moléculas de clorofila que captan la energía solar transformándola en energía química.

El **complejo antena** es importante para el aprovechamiento de la energía de la luz. En los cloroplastos, los complejos antena consisten en un número de complejos proteicos de membrana distintos (conocidos como complejos utilizadores de luz). En conjunto, estas proteínas están unidas a varios cientos de moléculas de clorofila por cada centro de reacción y están orientadas de manera muy precisa en la membrana del tilacoide. El complejo antena también tiene pigmentos accesorios, denominados *carotenoides*, que protegen a las moléculas de clorofila de la oxidación y pueden ayudar a captar la luz de otras longitudes de onda. Cuando la luz excita a una molécula de clorofila del complejo antena, la energía es transferida rápidamente de una molécula a otra, mediante transferencia energética por resonancia, hasta que alcanza un par especial de moléculas de clorofila situadas en el centro fotoquímico de reacción. Por lo tanto, cada complejo antena actúa como un "embudo", que recoge la energía luminosa y la dirige hacia un único centro de reacción específico que la puede utilizar con eficiencia (**Figura 14–43**).

El **centro de reacción fotoquímico** es un pigmento proteico transmembrana que constituye el corazón de la fotosíntesis. Se cree que se originó hace más de 3 mil millones de años en una bacteria fotosintética primitiva. En el centro de reacción, un par especial de moléculas de clorofila actúan como una trampa irreversible de cuantos de excitación porque el electrón excitado pasa de inmediato a una cadena de aceptores de electrones vecina situada en el complejo proteico (**Figura 14–44**). Mediante el rápido desplazamiento del electrón de alta energía lejos de las clorofilas, el centro de reacción fotoquímico lo transfiere a un am-

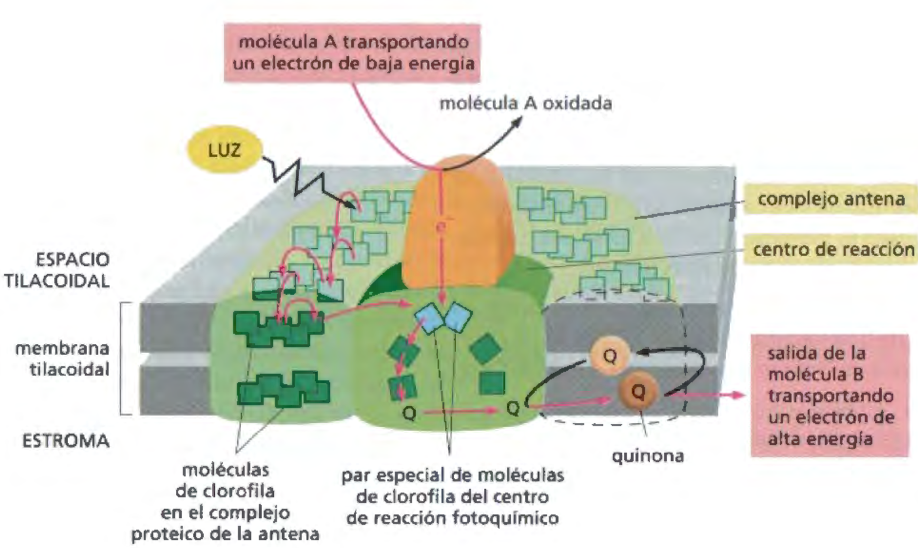


Figura 14–43 El complejo antena y el cen[tro] de reacción fotoquímico de un fotosist[ema]. <GCAC> El complejo antena es un colector [de] la energía de la luz en forma de electrones excitados. Canaliza esta energía a través de [una] serie de transferencias de energía por resonancia hasta un par moléculas de cloro[fila] especiales situadas en el centro de reacción fotoquímico. Así, el centro de reacción adquiere un electrón de alta energía que pasará rápidamente a la cadena de transporte de electrones de la membrana tilacoidal, a través de una quin[ona].

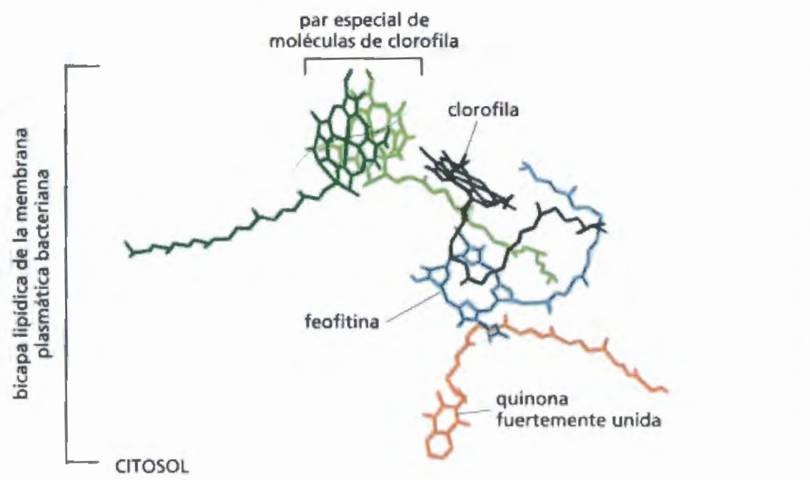


Figura 14–44 Disposición de los transportadores de electrones en un centro de reacción fotoquímico en las bacterias púrpuras. <ATCA> Las moléculas de pigmento están colocadas en el interior de una proteína transmembrana y envueltas por la bicapa lipídica de la membrana plasmática bacteriana. Un electrón del par especial de la molécula de clorofila es excitado por resonancia desde un complejo antena clorofílico y, luego, es transferido desde el par especial a la quinona (véase también Figura 14–45). En los centros de reacción de las plantas, se localiza una disposición similar de los transportadores de electrones (véase Figura 14–47).

...ente en el que es mucho más estable. Por consiguiente, el electrón se sitúa de forma adecuada para participar en reacciones fotoquímicas posteriores que requieren más tiempo para llevarse a cabo. Estas reacciones producen electrones de alta energía producidos por la luz, que alimentan la cadena de transporte de electrones.

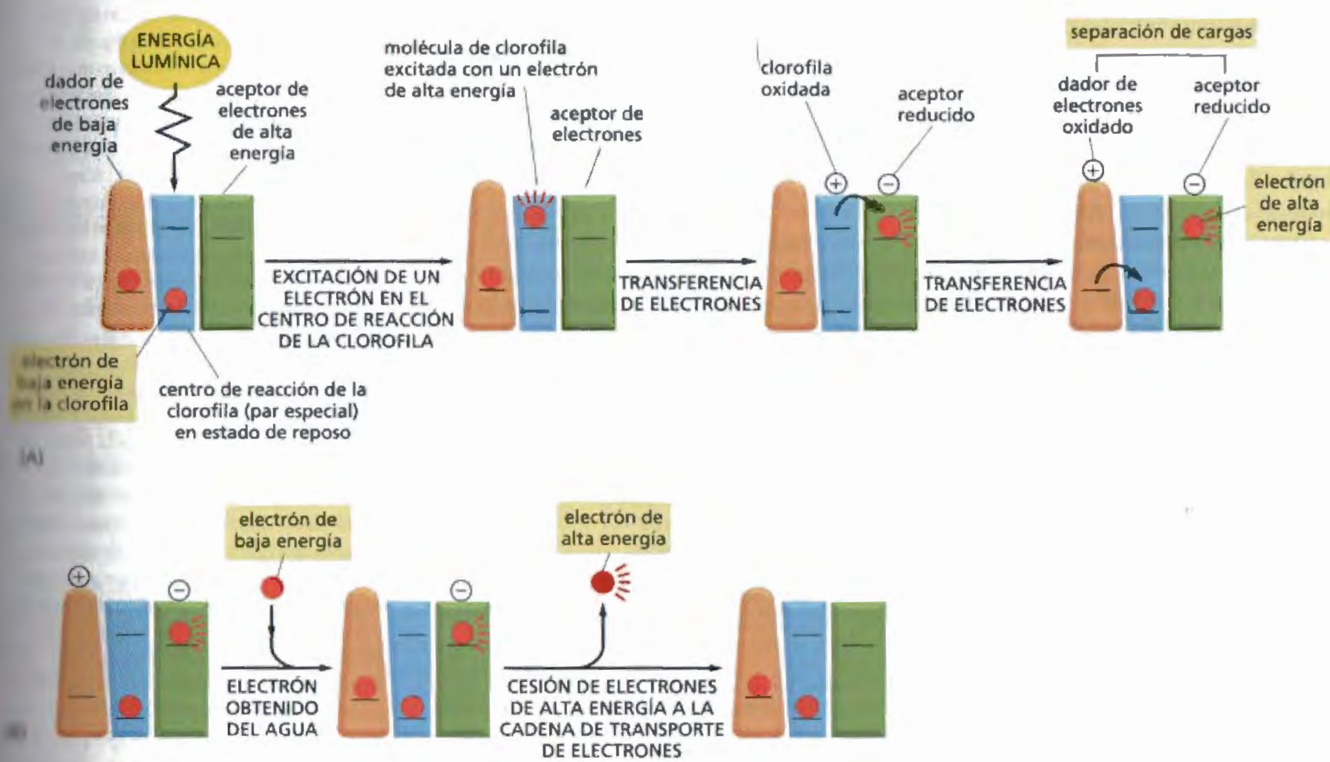


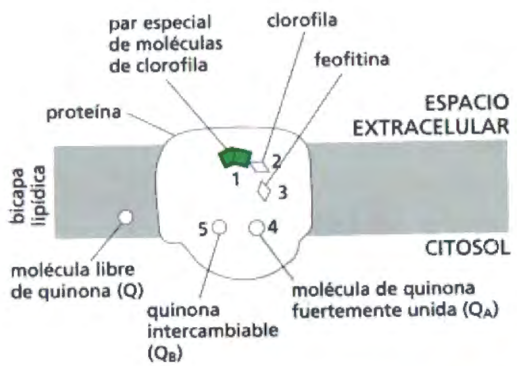
Figura 14–45 Cómo se aprovecha la energía en una molécula de clorofila de un centro de reacción. (A) Los acontecimientos iniciales que se producen en el centro de reacción generan una separación de cargas. Un complejo proteína-pigmento une una molécula de clorofila del par especial (*azul*) colocada de forma precisa de forma que está asequible tanto a un potencial dador de electrones de baja energía (*naranja*) como a un potencial aceptor de electrones de alta energía (*verde*). Cuando la luz transfiere energía a un electrón de la molécula de clorofila (electrón *rojo*), el electrón excitado pasa inmediatamente al aceptor de electrones, que por lo tanto se estabiliza de forma parcial. La molécula de clorofila, cargada positivamente, toma de inmediato el electrón de baja energía del dador de electrones y recupera su estado de reposo, generando una gran separación de carga que estabiliza aún más el electrón de alta energía. Esta reacción se completa en menos de 10^{-6} segundos. (B) En el estadio final del proceso, que sigue a los pasos de (A), el centro de reacción fotosintético recupera su estado de reposo original adquiriendo un nuevo electrón de baja energía y transfiriendo el electrón de alta energía generado por la clorofila a una cadena de transporte de electrones de la membrana. Como se describirá a continuación, el último dador de electrones de baja energía al fotosistema II es el agua; por lo tanto, la luz produce electrones de alta energía en la membrana del tilacoide a partir de los electrones de baja energía del agua.

En un centro de reacción, la energía capturada por la clorofila genera un donador fuerte de electrones a partir de uno débil

Las transferencias de electrones implicadas en las reacciones fotoquímicas que acabamos de describir han sido analizadas exhaustivamente mediante métodos espectroscópicos rápidos. En la **Figura 14–45** se ilustra de forma general de qué forma la luz proporciona la energía necesaria para transferir un electrón a partir de un dador débil de electrones (una molécula con una elevada afinidad por los electrones) a una molécula que en su forma reducida es un dador fuerte de electrones (una molécula con una baja afinidad por los electrones). El par especial de moléculas de clorofila del centro de reacción está equilibrado para pasar cada electrón excitado a una molécula vecina situada de forma precisa en el mismo complejo proteico (un aceptor de electrones). La molécula de clorofila que cede el electrón se carga positivamente, pero vuelve a captar con rapidez un electrón de un dador de electrones adyacente volviendo a su estado basal no cargado (Figura 14–45A, electrón *naranja*). Después, a través de una reacción más lenta, el dador de electrones reemplaza su electrón cedido y el electrón de alta energía que se ha generado por la clorofila excitada es transferido a la cadena de transporte de electrones (Figura 14–45B). Por tanto, la energía de excitación de la clorofila, que por lo general sería liberada como fluorescencia o calor, es utilizada para generar un nuevo dador fuerte de electrones (una molécula que transporta un electrón de alta energía).

El fotosistema de la bacteria púrpura es algo más sencillo que los evolucionados fotosistemas de los cloroplastos, que acabamos de describir, por lo que han constituido un buen modelo para estudiar detalles de las reacciones. En este fotosistema, el centro de reacción es un gran complejo pigmento-proteína que puede ser solubilizado con detergentes y purificado en forma activa. En un nuevo éxito del análisis de estructuras, se determinó su estructura tridimensional completa mediante cristalografía de rayos X (véase Figura 10–34). Esta estructura, combinada con datos cinéticos, proporciona la mejor imagen disponible sobre las reacciones iniciales de transferencia de electrones que ocurren durante la fotosíntesis. La **Figura 14–46** muestra la secuencia real de transferencia de electrones, que se puede comparar con la Figura 14–45A.

En la bacteria púrpura, el electrón utilizado para compensar la deficiencia del electrón creada por separación de carga inducida por la luz procede de un flujo cíclico de electrones transferidos a través de un citocromo (véase el *recuadro naranja* en la Figura 14–45); el dador fuerte de electrones es una quinona. En uno de los dos fotosistemas de los cloroplastos de las plantas superiores también se utiliza una quinona para la transferencia de electrones de alta energía. Sin embargo, como veremos seguidamente, dado que en este fotosistema los electrones los proporciona el agua, en la fotosíntesis de las plantas –a diferencia de lo que ocurre en las bacterias púrpura– se liberan grandes cantidades de oxígeno gaseoso.



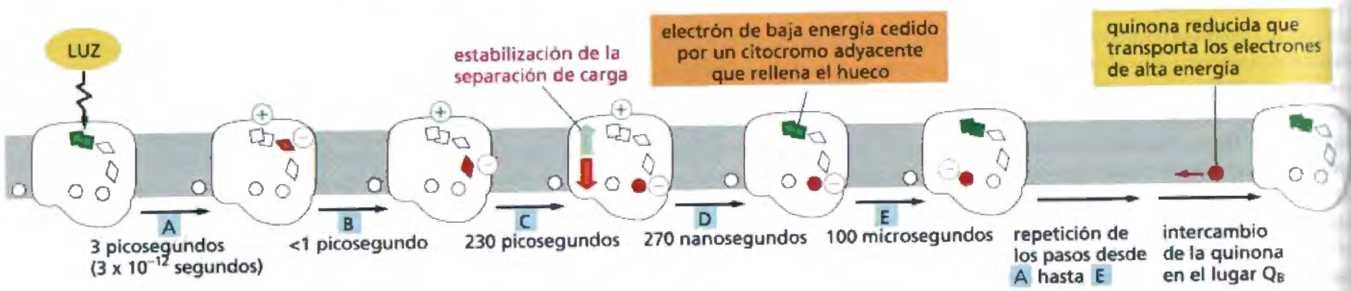


Figura 14–46 Transferencia de electrones que tiene lugar en el centro de reacción fotoquímico de la bacteria púrpura. <ATCA> Tiene lugar una serie de reacciones similares a las del fotosistema II de las plantas, relacionado evolutivamente con él. En la parte superior izquierda de la figura, se muestra un diagrama orientativo que indica las moléculas que transportan electrones, es decir, las de la Figura 14–45 más una quinona intercambiable (Q_B) y una quinona libremente móvil disuelta en la bicapa lipídica (Q). Los transportadores de electrones del 1 al 5 se unen en una posición específica de una proteína transmembrana formada por dos subunidades (véase Figura 10–34). Tras la excitación por un fotón de luz, un electrón de alta energía pasa muy rápidamente de una molécula de pigmento a otra, generando una *separación de carga* estable, tal como se muestra en los pasos de la secuencia de A a C, en la que la molécula de pigmento que transporta electrones de alta energía está indicada en *rojo*. A continuación tienen lugar las etapas D y E de forma progresiva. Después de que un segundo fotón repite esta secuencia con un segundo electrón, la quinona es liberada en la bicapa lipídica llevando dos electrones de alta energía. La quinona pierde con rapidez su carga al aceptar dos protones (véase Figura 14–24).

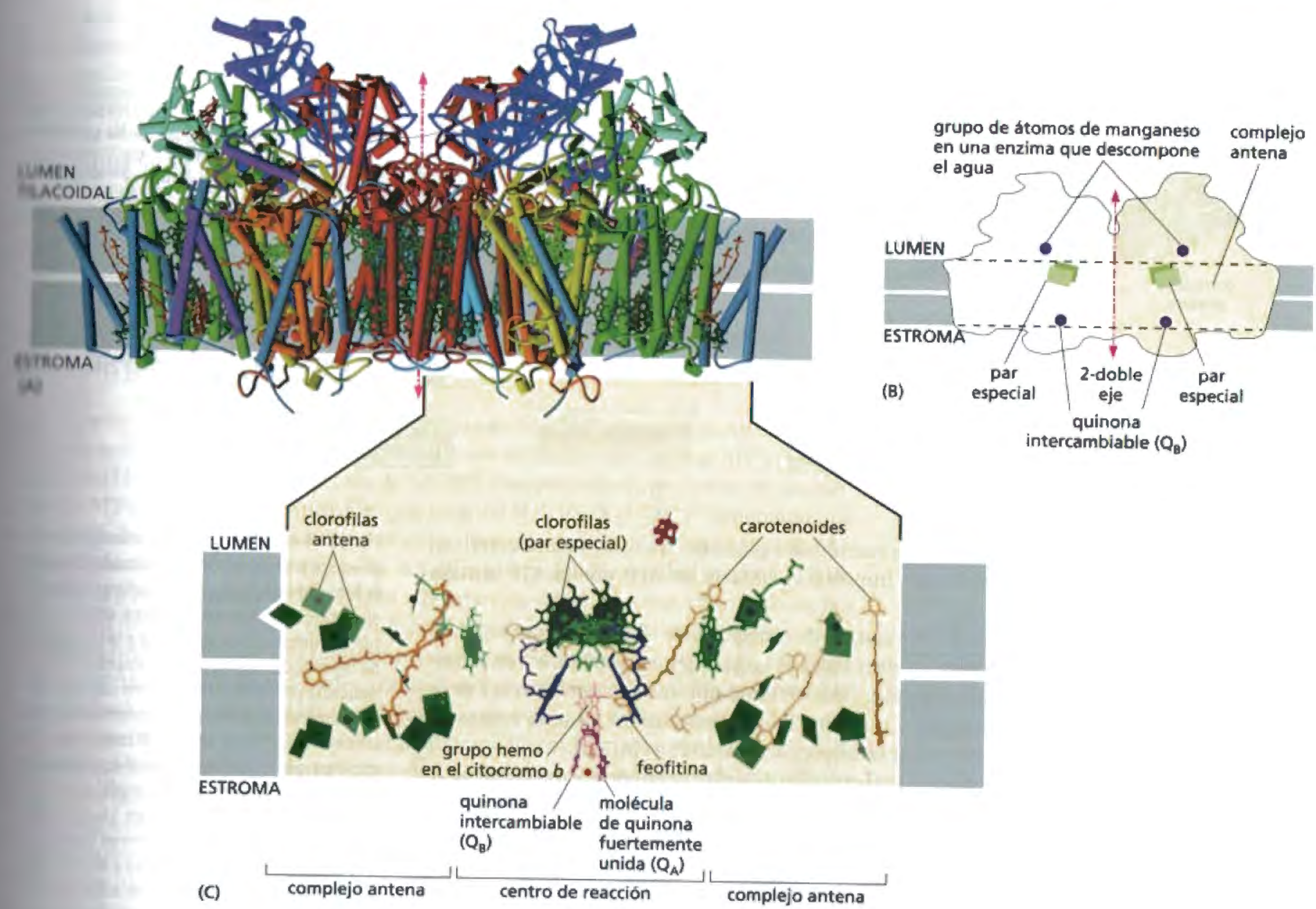


Figura 14–47 Estructura del fotosistema II en plantas y cianobacterias. La estructura que se muestra es un dímero, organizado alrededor de un eje (*flecha discontinua roja*). Cada monómero está formado por 16 proteínas integrales de membrana y 3 proteínas del lumen, con un total de 36 moléculas de clorofila, 7 carotenoides, 2 feofitinas, 2 hemos, 2 plastoquinonas y 1 agregado de manganeso en un centro que descompone el agua. (A) Estructura tridimensional completa del dímero. (B) Esquema del dímero en el que se indican algunas características importantes. (C) Monómero en el que únicamente se muestran las moléculas no proteicas de la estructura, destacando así los pigmentos unidos a proteína y los transportadores de electrones; las estructuras *verdes* son las clorofilas. (Adaptado de K.N. Ferreira et al., *Science* 303:1831-1838, 2004. Con autorización de la AAAS.)

La fotofosforilación no cíclica produce NADPH y ATP

La fotosíntesis en plantas y en cianobacterias produce directamente tanto ATP como NADPH mediante un proceso en dos pasos llamado **fotofosforilación no cíclica**. Dos fotosistemas –denominados fotosistema I y II– trabajan en serie proporcionando energía a un electrón para que alcance un estado de suficiente cantidad de energía, de forma que ahora este electrón puede recorrer toda la vía desde el agua hasta el NADPH. A medida que los electrones de alta energía pasan a través de fotosistemas acoplados generando NADPH, parte de su energía es desviada para la síntesis de ATP.

El primero de los dos fotosistemas –denominado de forma paradójica *fotosistema II* por razones vinculadas a la historia de la ciencia– es el único que tiene capacidad para capturar los electrones del agua. Los oxígenos de dos moléculas de agua se unen a un grupo de cuatro átomos de manganeso situados en la superficie luminal del complejo centro de reacción fotosistema II (**Figura 14–47**). Este complejo posibilita que los electrones sean eliminados uno a uno del agua para rellenar los agujeros generados por la luz en el centro de reacción de las moléculas de clorofila. En cuanto se han eliminado los cuatro electrones (lo que requiere cuatro cuantos de luz), la enzima libera el O_2. Así pues, el fotosistema II cataliza la reacción $2H_2O + 4$ fotones $\rightarrow 4H^+ + 4e^- + O_2$. Como se indicó para la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, que utiliza O_2 para producir agua, el mecanismo se asegura de que no se puedan liberar moléculas de agua parcialmente oxidadas en forma de radicales oxígeno, que son muy reactivos y que serían muy peligrosos. Casi todo el oxígeno de la Tierra se ha producido de esta forma.

El núcleo del centro de reacción del fotosistema II es homólogo al centro de reacción bacteriano descrito y también produce dadores fuertes de electrones en forma de moléculas de quinona reducida disueltas en la bicapa lipídica de la membrana. Las quinonas ceden sus electrones a una bomba de H^+ denominada *complejo citocromo b_6-f*, que se parece en sumo grado al complejo citocromo b-c_1 de la cadena respiratoria de la mitocondria. El complejo citocromo b_6-f bombea H^+ al espacio tilacoidal a través de la membrana del tila-

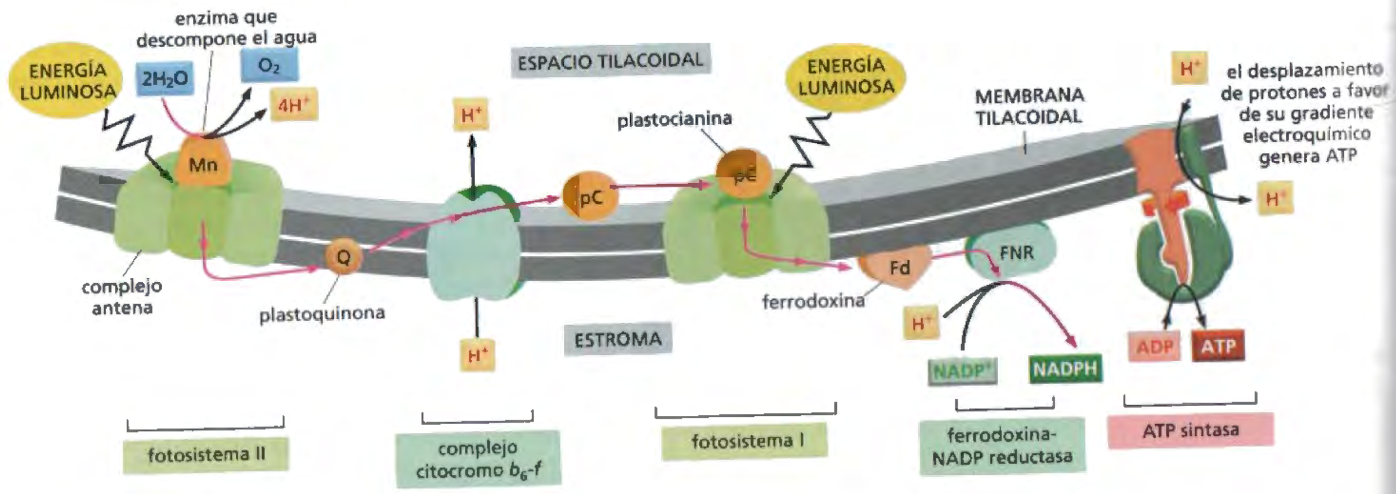


Figura 14–48 Flujo de electrones que se produce en la membrana tilacoidal durante la fotosíntesis. Los transportadores de los electrones móviles de la cadena son la plastoquinona (que se parece a la ubiquinona de las mitocondrias), la plastocianina (una pequeña proteína que contiene cobre) y la ferrodoxina (una pequeña proteína que tiene un centro de hierro-azufre). El complejo citocromo b_6-f es muy similar al complejo b-c_1 de la mitocondria y al complejo b-c de las bacterias (véase la Figura 14–73): los tres complejos aceptan electrones desde quinonas y bombean protones a través de la membrana. Tanto los H^+ liberados en la oxidación del agua en el espacio tilacoidal como el H^+ captado durante la formación del NADPH en el estroma contribuyen a la generación del gradiente electroquímico de H^+. Como se muestra en el esquema, este gradiente impulsa la síntesis de ATP mediante la ATP sintasa presente en la membrana.

coide (o fuera del citosol a través de la membrana plasmática en las cianobacterias); el gradiente electroquímico resultante impulsa la síntesis de ATP por la ATP sintasa (**Figura 14–48**).

El aceptor final de electrones de esta cadena de transporte de electrones es el segundo fotosistema, *fotosistema I*, que acepta un electrón en el agujero generado por la luz en la molécula de clorofila, en su centro de reacción. Cada electrón que entra al fotosistema I es finalmente elevado a un nivel energético más alto, lo que le permitirá pasar al centro de hierro-azufre de la ferrodoxina e impulsar la reducción de $NADP^+$ a NADPH.

Este esquema de la fotosíntesis que acabamos de describir se conoce como *esquema Z*. Por medio de sus dos pasos de activación electrónica, cada uno de ellos catalizados por un fotosistema, un electrón es transferido desde el agua (que normalmente fija sus electrones con mucha fuerza; potencial redox = +820 mV), hasta el NADPH (que por lo general fija sus electrones de forma más débil; potencial redox = –320 mV) (**Figura 14–49**).

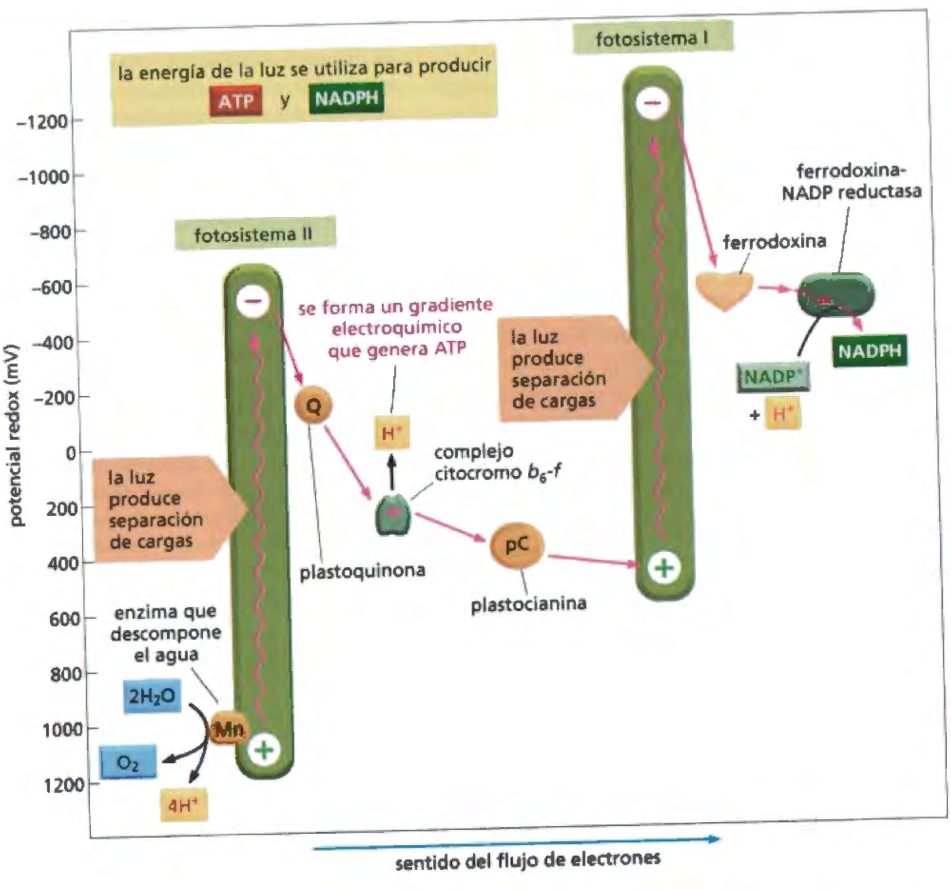


Figura 14–49 Variaciones del potencial redox durante la fotosíntesis. El potencial redox de cada especie molecular se indica por su posición en el eje vertical. Obsérvese que el fotosistema II pasa los electrones derivados del agua al fotosistema I. El flujo neto de electrones a través de los dos fotosistemas en serie va desde el agua hasta el $NADP^+$, y produce NADPH y ATP. El ATP es sintetizado por una ATP sintasa que utiliza el gradiente electroquímico de protones producido por los tres lugares de actividad protónica que se destacan en la Figura 14–48. Este esquema en forma de Z para la producción de ATP se denomina fotofosforilación no cíclica para distinguirlo del esquema cíclico que utiliza únicamente el fotosistema I (véase el texto).

Un solo cuanto de luz visible no dispone de suficiente cantidad de energía para desplazar un electrón desde la base del fotosistema II hasta el extremo superior del fotosistema I, que probablemente constituye la variación de energía necesaria para transferir un electrón desde el agua hasta el $NADP^+$. La utilización de dos fotosistemas conectados en serie consigue que se disponga de la energía de dos cuantos para realizar esta transferencia. Además, de esta forma sobra una cantidad de energía que es suficiente para que la cadena de transporte electrónico que une los dos fotosistemas bombee H^+ a través de la membrana tilacoidal (o la membrana plasmática de las cianobacterias), permitiendo que la ATP sintasa aproveche parte de la energía electrónica derivada de la luz para producir ATP.

Los cloroplastos pueden producir ATP por fotofosforilación cíclica sin generar NADPH

En el esquema de la fotofosforilación no-cíclica que acabamos de mencionar, los electrones altamente energéticos que dejan el fotosistema II son utilizados para generar ATP y pasan al fotosistema I impulsando la producción de NADPH. Esto produce un poco más de una molécula de ATP por cada par de electrones que pasa del H_2O hasta el $NADP^+$ generando una molécula de NADPH. Pero para la fijación del carbono se necesitan 1,5 moléculas de ATP por molécula de NADPH (véase Figura 14–40). Para producir una cantidad extra de ATP, los cloroplastos pueden utilizar el fotosistema I de un modo cíclico, de forma que se produzca ATP en lugar de NADPH. En este proceso, llamado *fotofosforilación cíclica*, los electrones de alta energía del fotosistema I son transferidos de nuevo al complejo citocromo b_6-f en lugar de ser transferidos al $NADP^+$ y, después, con una energía inferior, vuelven al fotosistema I. El único resultado neto, además de la transformación de una parte de la energía luminosa en calor, es el bombeo de un H^+ a través de la membrana tilacoidal mediante el complejo b_6-f, a medida que los electrones pasan a su través. Esto incrementa el gradiente electroquímico de protones que impulsará la síntesis de ATP en la ATP sintasa. (De forma análoga al proceso cíclico que ocurre en la bacteria no sulfurada en la Figura 14–73, parte inferior.)

En resumen, la fosforilación oxidativa implica sólo el fotosistema I, que produce ATP sin la formación de NADPH ni de O_2. De esta manera, la célula regula las actividades relativas de los flujos de electrones cíclico y no cíclico, determinando qué cantidad de energía luminosa se transforma en poder reductor (NADPH) y qué cantidad se transforma en enlaces fosfato de alta energía (ATP).

Los fotosistemas I y II tienen estructuras relacionadas entre sí que además se parecen a la de las bacterias

Los mecanismos fundamentales de los procesos celulares, tales como la replicación del DNA o la respiración, son casi los mismos en las células eucariotas y en las bacterias, a pesar de que el número de proteínas implicadas es considerablemente mayor en las células eucariotas. Los eucariotas evolucionaron a partir de procariotas y durante la evolución probablemente fueron seleccionadas proteínas adicionales que les proporcionaron un mayor grado de eficiencia, de regulación o de ambas cosas, que resultó útil para la célula.

Los fotosistemas constituyen un claro ejemplo de este tipo de evolución. La estructura atómica de los dos fotosistemas de las células eucariotas ha sido desvelada mediante la combinación de cristalografía electrónica y de rayos X; a partir de estos análisis se ha demostrado claramente la estrecha relación entre el fotosistema I, el fotosistema II y el centro de reacción (**Figura 14–50**).

La fuerza protón-motriz es la misma en la mitocondria y en el cloroplasto

La presencia del espacio tilacoidal divide el cloroplasto en tres compartimientos internos en lugar de dos como ocurre en la mitocondria. Sin embargo, en ambos orgánulos el efecto neto de la translocación de H^+ es similar. Como se ilustra en la **Figura 14–51**, en los cloroplastos expuestos a la luz, el H^+ es bombeado desde el estroma (pH 7,5) hasta el espacio tilacoidal (pH aproximadamente 4,5), generando un gradiente de 3 unidades de pH. Esto representa una fuerza protón-motriz de unos 180 mV a través de la membrana tilacoidal e

impulsa la síntesis de ATP mediante la ATP sintasa integrada en esta membrana. La fuerza es casi la misma que a través de la membrana mitocondrial interna, pero la mayor parte de esta fuerza es debida al gradiente de pH más que al potencial de membrana, al contrario de lo que sucede en la mitocondria.

Tanto en las mitocondrias como en los cloroplastos, el centro catalítico de la ATP sintasa se halla a un pH de cerca de 7,5 y está localizado en un gran compartimiento del orgánulo (matriz o estroma) lleno de enzimas solubles. En este espacio es donde se produce todo el ATP del orgánulo (véase Figura 14–51).

La membrana interna del cloroplasto contiene proteínas transportadoras que facilitan el intercambio de metabolitos con el citosol

Si se aíslan cloroplastos de manera que sus membranas internas permanezcan intactas, se puede demostrar que esta membrana tiene una permeabilidad selectiva, lo cual refleja la presencia de transportadores específicos. Además, la mayor parte del gliceraldehído 3-fosfato producido por la fijación de CO_2 en el estroma del cloroplasto es transportado fuera del cloroplasto por un eficiente sistema antiporte que intercambia azúcares-fosfato de 3 átomos de carbono por un flujo de fosfato inorgánico hacia el interior.

Por lo general, el gliceraldehído 3-fosfato proporciona al citosol una abundante fuente de carbohidratos que la célula utiliza como punto de partida de otros muchos procesos de biosíntesis, incluyendo la producción de sacarosa para su exportación. Pero su utilidad no termina aquí. Cuando el gliceraldehído 3-fosfato llega al citosol, rápidamente es transformado (mediante parte de la vía glucolítica) en 1,3-bisfosfoglicerato y 3-fosfoglicerato (véase p. 92), generando una molécula de ATP y otra de NADPH. (Una reacción en dos pasos similar a ésta pero en sentido inverso, transforma el gliceraldehído 3-fosfato en el ciclo de fijación del carbono; véase Figura 14–40.) Por consiguiente, la exportación de gliceraldehído

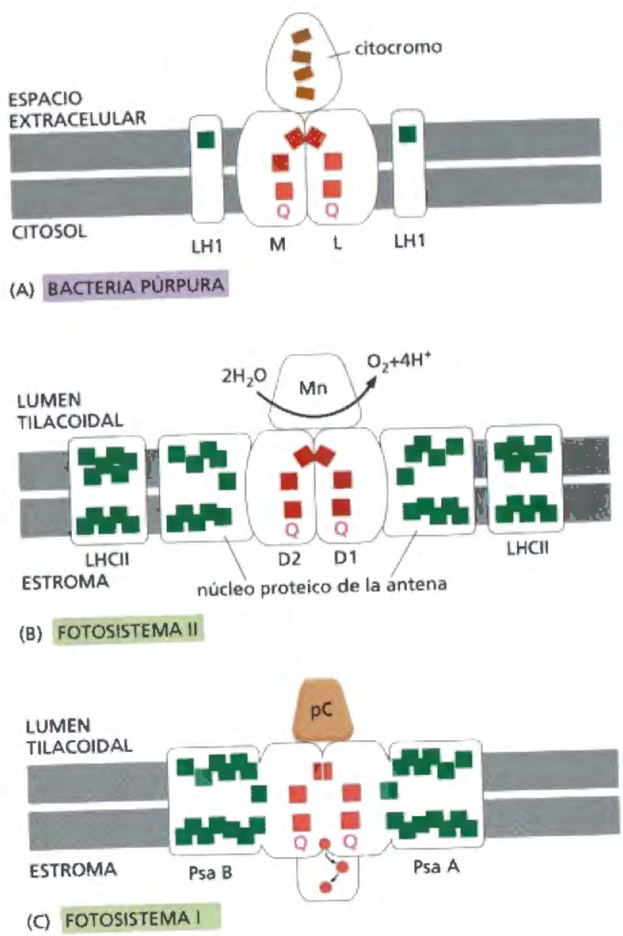


Figura 14–50 Comparación entre tres tipos de centros de reacción fotosintéticos. Los pigmentos implicados en la utilización de la luz se indican en color *verde*, mientras que los implicados en los acontecimientos que tienen lugar en el centro de reacción fotoquímico están en *rojo*. (A) El centro de reacción fotoquímico de la bacteria púrpura, cuyos detalles estructurales están indicados en la Figura 10–34, tiene dos subunidades proteicas relacionadas, L y M, que unen los pigmentos implicados en el proceso central ilustrado en la Figura 14–46. Los electrones de baja energía son cedidos a la clorofila excitada por un citocromo. El LH1 es un complejo pigmento-proteína implicado en la utilización de la luz. (B) El fotosistema II contiene las proteínas D_1 y D_2 que son homólogas de las subunidades L y M de (A). Los electrones de baja energía son cedidos desde el agua a la clorofila excitada por un grupo manganeso. El LHCII es un complejo captador de energía, que cede energía al núcleo proteico de la antena (véase Figura 14–47). (C) El fotosistema I contiene las proteínas Psa A y Psa B, cada una de las cuales es equivalente a la unión de las proteínas D_1 y D_2 con la proteína del núcleo de la antena del fotosistema II. Los electrones de baja energía son cedidos desde una plastocianina (pC) que los une débilmente a la clorofila excitada. Como se indica en el fotosistema I, los electrones de alta energía pasan desde una quinona fija (Q) a través de una serie de centros ferrosulfurados (*círculos rojos*). (Modificado de K. Rhee, E. Morris, J. Barber y W. Kühlbrandt, *Nature* 396:283-286, 1998; W. Kühlbrandt, *Nature* 411:896-899, 2001. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

3-fosfato del cloroplasto suministra al resto de la célula, no sólo la fuente principal de carbono fijado sino también el poder reductor y el ATP necesarios para el metabolismo en el exterior del cloroplasto.

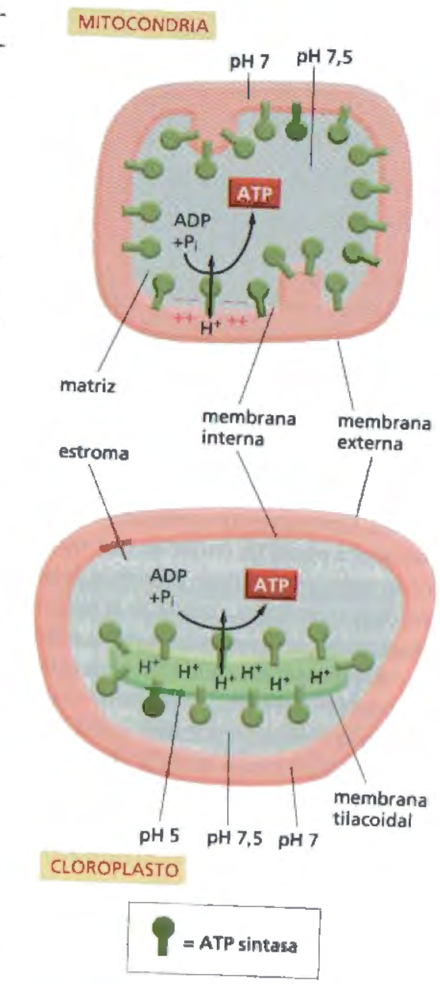


Figura 14–51 Comparación entre los flujos de protones y la orientación de la ATP sintasa que se presentan en las mitocondrias y en los cloroplastos. Los compartimientos que tienen un pH similar se representan en el mismo color. La fuerza protón-motriz a través de la membrana tilacoidal consiste sobre todo en un gradiente de pH; la elevada permeabilidad de esta membrana al Mg^{2+} y a los iones Cl^- permite que el flujo de estos iones disipe la mayor parte del potencial de membrana. Probablemente, las mitocondrias no pueden tolerar un pH de 10 en su matriz, por lo que tienen que generar la fuerza protón-motriz sin este incremento de pH.

Los cloroplastos también llevan a cabo otros importantes procesos biosintéticos

Además de la fotosíntesis, el cloroplasto también realiza otros procesos biosintéticos. Por ejemplo, unas enzimas del estroma del cloroplasto fabrican todos los ácidos grasos de la célula y un conjunto de aminoácidos. De forma similar, en el cloroplasto el poder reductor de los electrones activados por la luz impulsa la reducción de los nitritos (NO_2^-) a amoníaco (NH_3); este amoníaco proporciona a la planta el nitrógeno necesario para la síntesis de aminoácidos y de nucleótidos. Por consiguiente, la importancia metabólica del cloroplasto para las plantas superiores y las algas es mucho más amplia que su papel en el proceso de la fotosíntesis.

Resumen

Los cloroplastos y las bacterias fotosintéticas obtienen los electrones de alta energía por medio de fotosistemas que capturan los electrones excitados cuando la luz solar es absorbida por las moléculas de clorofila. Los fotosistemas están compuestos por un complejo antena que canaliza la energía hacia un centro de reacción fotoquímico donde un complejo de proteínas y pigmentos, ordenado de forma muy precisa, permite que la energía del electrón excitado en la clorofila sea captada por transportadores de electrones. El centro de reacción fotoquímica mejor conocido es el de la bacteria púrpura fotosintética, que contiene un solo fotosistema. Normalmente los dos fotosistemas están acoplados en serie y transfieren los electrones desde el agua hasta el $NADP^+$ *formando NADPH, con la producción concomitante de un gradiente electroquímico transmembrana. En estos fotosistemas se genera oxígeno molecular* (O_2) *como producto intermediario de la eliminación de cuatro electrones de baja energía a partir de dos posiciones específicas de moléculas de agua. Las estructuras tridimensionales detalladas de los fotosistemas I y II muestran un extraordinario grado de homología con la estructura de los fotosistemas de la bacteria fotosintética púrpura, lo cual demuestra un destacable grado de conservación durante miles de millones de años de evolución.*

En comparación con las mitocondrias, los cloroplastos tienen una membrana adicional (la membrana tilacoidal) y un tercer espacio interno (el espacio tilacoidal). Todos los procesos de transporte electrónico tienen lugar en la membrana tilacoidal: para producir ATP, se bombean H^+ *hacia el espacio tilacoidal y un flujo inverso de protones a través de una ATP sintasa produce el ATP en el estroma del cloroplasto. Este ATP se utiliza en conjunción con el NADPH producido en la fotosíntesis para impulsar un gran número de reacciones biosintéticas en el estroma del cloroplasto, incluyendo el importante ciclo de fijación del carbono, que genera carbohidratos a partir de* CO_2. *El carbohidrato, y otros productos importantes del cloroplasto, se exportan al citosol de la célula, donde –en forma de gliceraldehído 3-fosfato– proporcionan carbono orgánico, ATP y poder reductor al resto de la célula.*

SISTEMAS GENÉTICOS DE MITOCONDRIAS Y PLASTIDIOS

La evolución de las mitocondrias y los plastidios a partir de bacterias que fueron endocitadas por células nucleadas ancestrales explicaría por qué ambos tipos de orgánulos contienen sus propios genomas así como sus maquinarias biosintéticas para producir RNA y proteínas. Las mitocondrias y los plastidios no se forman *de novo*, sino que surgen por crecimiento y división de mitocondrias o plastidios preexistentes. En cada generación celular cada orgánulo tiene que duplicar, por término medio, su masa y redistribuirla en cada célula hija. Incluso las células que no se dividen tienen que reponer sus orgánulos que son degradados como parte de un proceso continuo del recambio de orgánulos, o producir más orgánulos, cuando es necesario. El crecimiento y la producción de orgánulos es un proceso complicado, ya que las proteínas de las mitocondrias y de los plastidios pueden estar codificadas en dos lugares: el genoma nuclear y los genomas localizados en sus orgánulos

(**Figura 14–52**). En el Capítulo 12 vimos como algunas proteínas y algunos lípidos son importados por las mitocondrias y los cloroplastos desde el citosol. Ahora veremos cómo se mantienen los genomas de los orgánulos y contribuyen a la biogénesis del orgánulo.

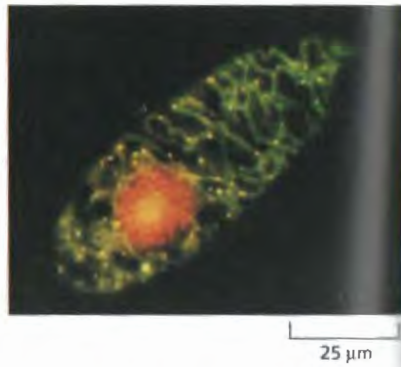


Figura 14–52 Tinción de una mitocondria y su DNA nuclear con un colorante fluorescente. Esta micrografía muestra la distribución del genoma nuclear (*rojo*) y varias copias pequeñas del genoma mitocondrial (puntos *amarillos* brillantes) en una célula de *Euglena gracilis*. El DNA está teñido con bromuro de etidio, un colorante fluorescente que emite luz roja, mientras que la matriz mitocondrial está teñida con un colorante verde fluorescente, que muestra que la mitocondria forma una red ramificada que se extiende por el citosol. La superposición de la matriz *verde* y el DNA *rojo* hace que el genoma mitocondrial se observe de color *amarillo*. (Por cortesía de Y. Hayashi y K. Ueda, *J. Cell Sci.* 93:565-570, 1989. Con la autorización de The Company of Biologists.)

Las mitocondrias y los cloroplastos contienen sistemas genéticos completos

La biosíntesis de las mitocondrias y de los cloroplastos requiere la contribución de dos sistemas genéticos diferentes. Genes especiales del DNA nuclear codifican la mayor parte de las proteínas de las mitocondrias y de los cloroplastos. El orgánulo importa estas proteínas del citosol después de haber sido sintetizadas en los ribosomas citosólicos. El DNA del orgánulo codifica otras proteínas sintetizadas presentes en los ribosomas de su interior y utiliza el mRNA producido en el orgánulo que especifica su secuencia de aminoácidos (**Figura 14–53**). El tráfico proteico entre el citosol y estos orgánulos parece ser unidireccional, ya que por lo general no se exportan proteínas desde las mitocondrias o los cloroplastos al citosol. Una excepción a este principio se produce en condiciones especiales cuando la célula está a punto de entrar en una situación de apoptosis. Como se describe en el Capítulo 19, la mitocondria libera proteínas del espacio intermembrana (como el citocromo *c*) a través de la membrana externa de la mitocondria como parte de una elaborada forma de señalización que se desencadena en las células que sufren una muerte celular programada.

El proceso de transcripción del DNA del orgánulo, la síntesis de proteínas y la replicación del DNA (**Figura 14–54**) se lleva a cabo en el mismo lugar en el que se localiza el genoma: en la matriz de la mitocondria o en el estroma del cloroplasto. Aunque las proteínas implicadas en estos procesos genéticos son específicas del orgánulo, la mayoría de ellas están codificadas por el genoma nuclear. Esta es una de las cosas más sorprendentes, ya que la maquinaria de la síntesis proteica de los orgánulos se parece más a la de las bacterias que a la de las células eucariotas. El parecido es en particular grande en los cloroplastos. Por ejemplo, los ribosomas de los cloroplastos son muy similares a los ribosomas de *E. coli* tanto en su ultraestructura como en su sensibilidad a varios antibióticos (tales como el cloranfenicol, la estreptomicina, la eritromicina y la tetraciclina). Además, en los cloroplastos la síntesis de proteínas comienza con el *N*-formil metionina, como en las bacterias, y no con la metionina como ocurre en el citosol de las células eucariotas. A pesar de que los sistemas genéticos mitocondriales son menos parecidos a los de las bacterias actuales, sus ribosomas también son sensibles a los antibióticos antibacterianos y la síntesis de proteínas también comienza con *N*-formil metionina.

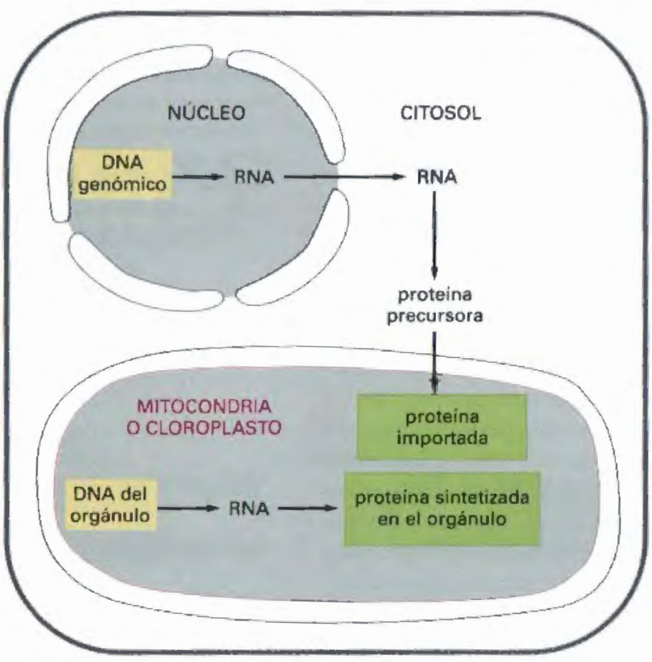


Figura 14–53 Producción de proteínas de la mitocondria y del cloroplasto por dos sistemas genéticos diferentes. La mayor parte de las proteínas de estos orgánulos están codificadas en el núcleo y deben ser importadas desde el citosol.

El crecimiento y la división de los orgánulos determinan el número de mitocondrias y de plastidios de cada célula

En las células de los mamíferos, el DNA mitocondrial constituye menos del 1% del total del DNA celular. Sin embargo, en otras células como las de las hojas de las plantas superiores o los enormes oocitos de los anfibios, en las mitocondrias y en los cloroplastos existe una cantidad de DNA que supone una proporción mucho mayor (**Tabla 14–2**) y, en estos orgánulos, se produce una gran parte del RNA y de la síntesis de proteínas de la célula.

Las mitocondrias y los cloroplastos son lo bastante grandes como para poder ser observados al microscopio en las células vivas. Por ejemplo, las mitocondrias se pueden visualizar en las células por la expresión de una proteína de fusión, modificada por ingeniería genética, y que se ha unido a una proteína verde fluorescente (GFP: ***green fluorescent protein***), o se pueden incubar células con un colorante fluorescente que es captado específicamente por las mitocondrias gracias al gradiente electroquímico a través de sus membranas. Estas imágenes demuestran que las mitocondrias de las células vivas son dinámicas y que con frecuencia se dividen, fusionan y cambian de forma (**Figura 14–55**), como comentamos anteriormente. La división (fisión) y la fusión de estos orgánulos son procesos topológicamente complejos debido a que están rodeados por una doble membrana y durante este proceso la mitocondria debe mantener la integridad de sus distintos compartimientos mitocondriales (**Figura 14–56**).

El número y la forma de las mitocondrias varía enormemente en los diferentes tipos celulares y en el mismo tipo celular puede cambiar según las condiciones fisiológicas. En una célula pueden encontrarse desde muchos orgánulos esféricos o cilíndricos hasta un solo orgánulo con una estructura ramificada (forma reticular). Esta disposición está controlada por las velocidades relativas de división y de fusión, las cuales están reguladas por GTPasas localizadas en las membranas de las mitocondrias. Además, la masa total de orgánulo por célula puede estar regulada de acuerdo con las necesidades celulares. Por ejemplo, se produce un gran incremento mitocondrial (de entre 5 a 10 veces) cuando una fibra muscular en reposo es estimulada repetidas veces para que se contraiga durante un periodo prolongado.

En el espacio que delimita el espacio interno de cada orgánulo pueden existir muchas copias de los genomas mitocondrial y plastidial. El grado de fragmentación del orgánulo determina el número de copias del genoma en cada orgánulo; por lo general en cada compartimiento se encuentran muchas copias (véase la Tabla 14–2). En la mayoría de las células, la replicación del DNA del orgánulo no se limita a la fase S del ciclo celular, cuando se replica el DNA nuclear, sino que ocurre a lo largo de todo el ciclo celular –fuera de la fase de división de la célula. En cada orgánulo parece que las moléculas de DNA se seleccionan al azar para ser replicadas, de forma que a lo largo de un ciclo celular determinado algunas de ellas pueden ser replicadas más de una vez y otras nunca. No obstante, bajo condiciones estacionarias, el proceso está regulado de forma que el número total de moléculas de DNA del orgánulo se duplique en cada ciclo celular, como es necesario para que cada tipo celular mantenga constante el DNA del orgánulo.



Figura 14–54 Electromicrografía de una molécula de DNA mitocondrial animal durante el proceso de replicación del DNA. El genoma de DNA circular se ha replicado únicamente entre los dos puntos señalados con flechas *rojas*. El nuevo DNA sintetizado está coloreado en *amarillo*. (Cortesía de David A. Clayton.)

Tabla 14–2 Cantidades relativas de DNA de los orgánulos en diferentes células y tejidos

ORGANISMO	TIPO DE TEJIDO O CÉLULA	MOLÉCULAS DE DNA POR ORGÁNULO	ORGÁNULOS POR CÉLULA	DNA DE LOS ORGÁNULOS COMO PORCENTAJE DEL DNA CELULAR
DNA MITOCONDRIAL				
Rata	hígado	5-10	1000	1
Levadura*	vegetativa	2-50	1-50	15
Rana	oocito	5-10	10^7	99
DNA DEL CLOROPLASTO				
Chlamydomonas	vegetativa	80	1	7
Maíz	hojas	0-300**	20-40	0-15**

* En las levaduras, la gran variación en el número y el tamaño de las mitocondrias por célula es debida a la fusión y fisión de las mitocondrias.
** En el maíz, la cantidad de DNA del cloroplasto cae de forma drástica en las hojas maduras tras la división celular: el DNA del cloroplasto es degradado y se mantiene el mRNA estable para proporcionar la síntesis de proteínas.

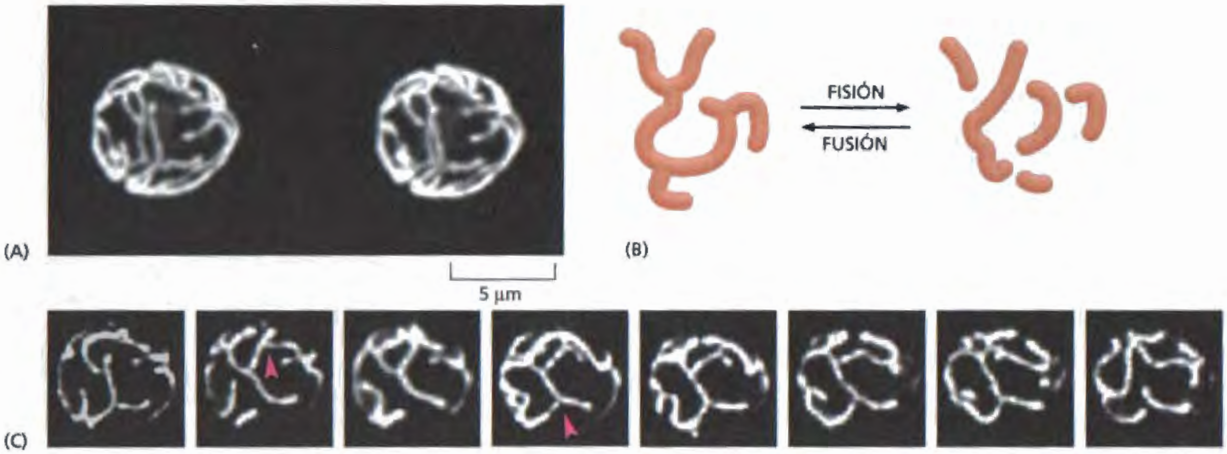


Figura 14–55 Un retículo mitocondrial dinámico. (A) En las células de levadura, las mitocondrias forman un retículo continuo junto a la membrana plasmática (fotografía estereoscópica). (B) El balance entre fusión y fisión determina la disposición de las mitocondrias en las diferentes células. (C) Diferentes etapas sucesivas tomadas con microscopia de fluorescencia en las que se muestra el comportamiento de la red mitocondrial en una célula de levadura. Además de los cambios de forma por fusión y fisión, la red se remodela constantemente (*flechas rojas*). Las micrografías fueron tomadas cada 3 minutos. (A y C, obtenidas de J. Nunnari et al., *Mol. Biol. Cell* 8:1233-1242, 1997. Con la autorización de American Society for Cell Biology.)

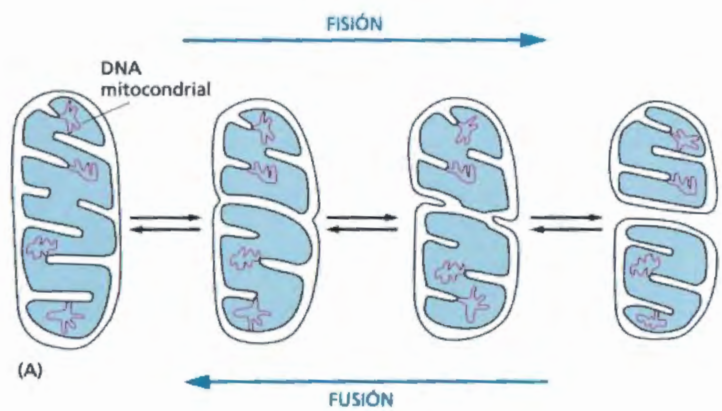
En circunstancias especiales, la célula puede controlar de forma precisa la división de los orgánulos. Por ejemplo, en algunas algas que tienen un solo o unos cuantos cloroplastos, el orgánulo se divide justo antes de que lo haga la célula, en una zona que coincide exactamente con el futuro plano de la división de la célula.

Las mitocondrias y los cloroplastos tienen genomas diferentes

Las mitocondrias y los cloroplastos tienen varias copias de la molécula de DNA del orgánulo y, normalmente, están distribuidas en varios grupos (denominados *nucleoides*), situados en la matriz de la mitocondria o en el estroma del cloroplasto. Se cree que los nucleoides están unidos a la membrana mitocondrial interna. Es probable que la estructura del DNA de los nucleoides se parezca más a la de las bacterias que a la de la cromatina de la célula eucariota. Por ejemplo, como en el caso de las bacterias, ni en cloroplastos ni en mitocondrias existen histonas.

El tamaño del DNA de los orgánulos es similar al DNA viral, pudiendo ir desde menos de 6000 pares de nucleótidos, como en el caso del *Plasmodium falciparum* (el parásito de la malaria humana) hasta más de 300.000 pares de nucleótidos en algunas plantas terrestres (**Figura 14–57**). El genoma de los cloroplastos de las plantas terrestres va desde 70.000 a 200.000 pares de nucleótidos. Durante mucho tiempo se ha creído que los cromosomas de los cloroplastos eran moléculas circulares que tenían una copia única del genoma, pero aho-

Figura 14–56 Fusión y fisión mitocondrial. Estos procesos implican tanto a la membrana externa como a la interna. (A) Durante la fusión y la fisión, las mitocondrias mantienen tanto el compartimiento de la matriz como el del espacio intermembrana. Se cree que en las membranas externa e interna intervienen diferentes mecanismos de fusión. Desde un punto de vista conceptual, el proceso de fisión se parece al de la división de una bacteria (descrito en el Capítulo 16). La ruta esquematizada se ha postulado a partir de imágenes estáticas como la que se muestra en (B). (B) Electromicrografía de la división de una mitocondria de una célula hepática. (B, por cortesía de Daniel S. Friend.)





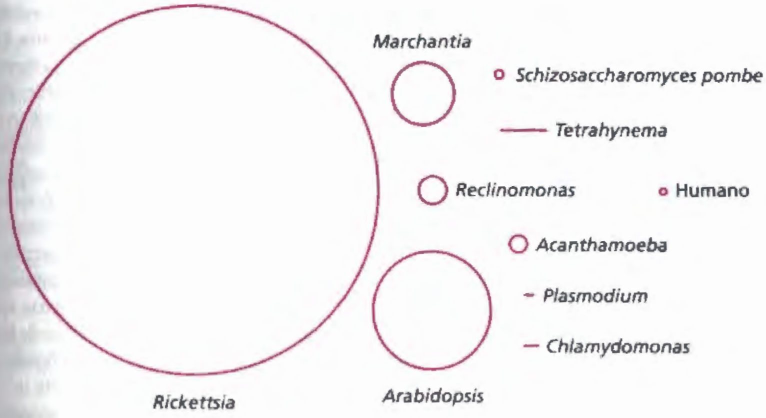


Figura 14–57 Diferentes tamaños de genomas mitocondriales. Se ha determinado la secuencia completa de DNA para más de 500 genomas mitocondriales. Se muestra el tamaño a escala de algunos de estos DNA mitocondriales, en forma de círculos para el genoma circular y en líneas para el lineal. El círculo más grande representa el genoma de *Rickettsia prowazekii*, un pequeño patógeno bacteriano cuyo genoma se parece enormemente al de la mitocondria. El tamaño del genoma mitocondrial no se corresponde de forma exacta con el número de proteínas que codifica: mientras que el DNA mitocondrial humano codifica 13 proteínas, el DNA mitocondrial de *Arabidopsis*, que es 22 veces mayor sólo codifica 32, que es alrededor de 2,5 veces más que las que codifica el DNA mitocondrial humano. El DNA extra que se encuentra en *Arabidopsis*, *Marchantia* y otras mitocondrias de plantas podría ser "DNA de desecho". El DNA mitocondrial del protozoo *Reclinomonas americana* tiene 98 genes, más que el de cualquier mitocondria de cualquier organismo analizado hasta ahora. (Adaptado de M.W. Gray et al., *Science* 283:1476-1481, 1999. Con la autorización de AAAS.)

Ya sabemos que en la mayoría de cloroplastos existen, además de moléculas de este tipo, un número mucho mayor de moléculas lineales formadas por varias copias del genoma unidas en serie. La mezcla de estructuras observada en los cromosomas de los cloroplastos podría estar originada por el proceso de replicación del DNA que está estrechamente relacionado con los acontecimientos de recombinación análogos a los procesos de replicación observados en los virus como el caso del herpes. En muchos genomas mitocondriales también se observan tipos de mezclas de estructuras similares. Sin embargo, en los mamíferos el genoma mitocondrial es un único círculo de DNA de unos 16.500 pares de bases (menos del 0,001% del tamaño del genoma nuclear) y es casi del mismo tamaño en animales tan diversos como *Drosophila* y el erizo de mar.

Tanto las mitocondrias como los cloroplastos probablemente han evolucionado a partir de bacterias endosimbiónticas

El carácter procariota de los sistemas genéticos de los orgánulos celulares, especialmente notable en el caso de los cloroplastos, sugiere que las mitocondrias y los cloroplastos evolucionaron a partir de bacterias que fueron endocitadas hace más de mil millones de años. De acuerdo con una versión de esta *hipótesis endosimbióntica*, las células eucariotas aparecieron en forma de organismos anaeróbicos sin mitocondrias ni cloroplastos y luego establecieron una relación endosimbióntica estable con un tipo de bacterias, utilizando el sistema de fosforilación oxidativa de las bacterias en beneficio propio (**Figura 14–58**). De acuerdo con esta hipótesis, el proceso de endocitosis que condujo al desarrollo de las mitocondrias, se produjo cuando el oxígeno apareció en la atmósfera en cantidades sustanciales, hace más de $1{,}5 \times 10^9$ años, antes de que los animales y las plantas se separaran (véase Figura 14–71). Parece ser que los cloroplastos derivaron de forma similar pero más tarde, a partir de la endocitosis de un organismo fotosintético productor de oxígeno parecido a una cianobacteria.

La mayoría de los genes que codifican las proteínas actuales de las mitocondrias y de los cloroplastos se hallan en el núcleo celular. Por lo tanto, parece probable que durante la evolución de la célula eucariota se produjera una extensa transferencia de genes desde el orgánulo al DNA del núcleo. Se esperaría que una transferencia con éxito de este tipo fuese un proceso raro, ya que un gen que se traslada desde el DNA del orgánulo debe cambiar para transformarse en un gen nuclear funcional: tiene que adaptarse a los requerimientos de la transcripción nuclear y de la traducción citoplasmática y adquirir una secuencia señal de tal manera que la proteína codificada pueda ser trasladada al orgánulo después de su síntesis en el citosol. Sin embargo, es evidente que en la actualidad siguen produciéndose transferencias de genes al núcleo celular.

La transferencia de genes explicaría por qué algunos genes del núcleo que codifican proteínas de las mitocondrias y de los cloroplastos se parecen a los genes bacterianos. Así, la secuencia de aminoácidos de la enzima mitocondrial *superóxido dismutasa* de gallina se parece mucho más a la misma enzima de una bacteria que a la superóxido dismutasa del citosol de las propias células eucariotas.

La transferencia de genes parece haber sido un proceso gradual. Cuando se comparan genomas que codifican un número diferente de proteínas se observa un patrón de reduc-

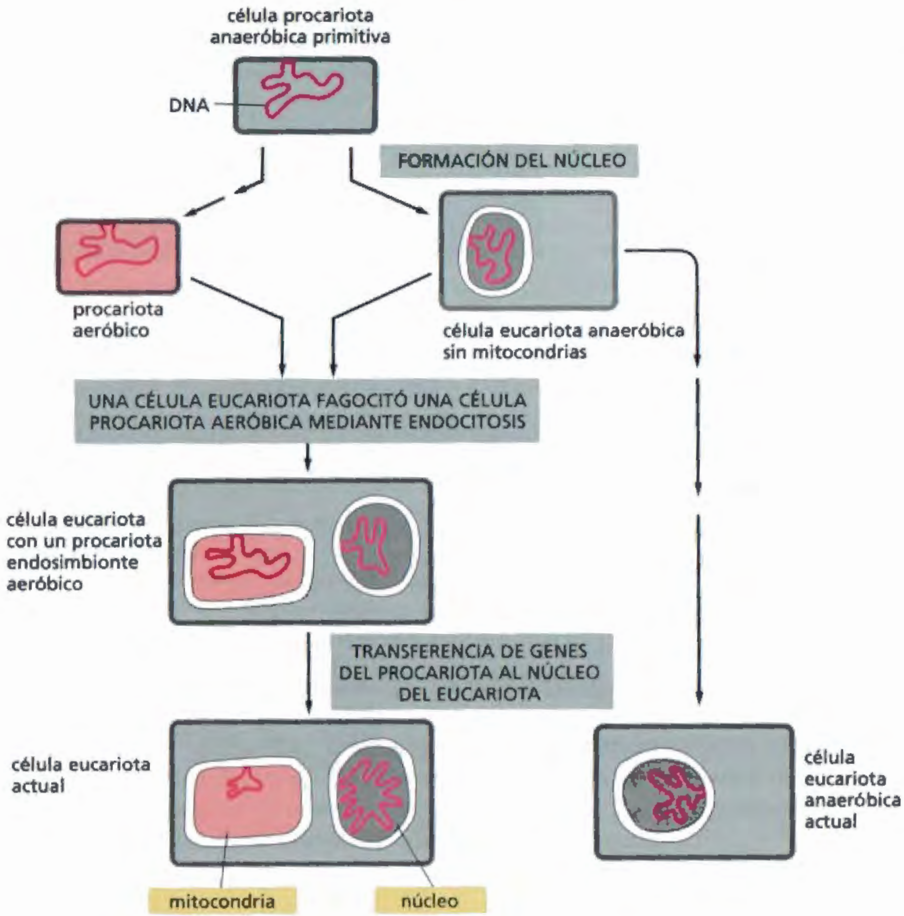


Figura 14–58 Una posible ruta evolutiva sobre el origen de la mitocondria. En la actualidad en la tierra, hay organismos eucariotas unicelulares anaeróbicos que carecen de genoma mitocondrial, entre ellos se encuentra el protozoo *Giardia*. Sin embargo, todos los que se han examinado parecen tener restos de algún tipo de orgánulo rodeado por una membrana. En estos restos, se producen reacciones mitocondriales, tales como la producción de centros de sulfuro de hierro. Hasta ahora no se conoce ningún ejemplo vivo de la célula anaeróbica postulada en esta figura que incorporó el primer precursor de la mitocondria. Por esta y otras razones, se han propuesto vías alternativas en las que la combinación de una bacteria y una arquea pudo conducir a la aparición de las primeras células eucariotas y las primeras mitocondrias.

ción secuencial de las funciones mitocondriales codificadas (**Figura 14–59**). Por ejemplo, el más pequeño, y probablemente el más evolucionado de los genomas mitocondriales, sólo codifica unas cuantas de las proteínas de la membrana mitocondrial interna implicadas en las reacciones del transporte de electrones, además del RNA ribosómico y algunos tRNA. Los genomas mitocondriales que se han mantenido más complejos tienden a conservar este mismo conjunto de genes, además de otros. Los genomas más complejos se caracterizan por la presencia de muchos genes extra respecto al genoma mitocondrial animal y al de levaduras. Muchos de estos genes codifican componentes del sistema genético mitocondrial, tales como las subunidades de la RNA polimerasa y proteínas ribosomales; en organismos cuyo contenido de DNA mitocondrial es reducido, estos genes se encuentran en el núcleo celular.

¿Qué tipo de bacteria dio lugar a las mitocondrias? Por comparación de secuencias, parece que las mitocondrias descienden de un tipo particular de bacteria púrpura fotosintética que perdió su capacidad de realizar fotosíntesis y que quedó únicamente con una cadena respiratoria.

Las mitocondrias presentan una utilización relajada de codones y pueden tener una variante del código genético

El tamaño relativamente pequeño del genoma mitocondrial humano lo convirtió en un material atractivo para utilizar en los primeros proyectos de secuenciación de DNA; en 1981, los investigadores publicaron la secuencia completa de sus 16.569 nucleótidos. Comparando esta secuencia con las de tRNA mitocondriales conocidas y con las secuencias parciales de aminoácidos disponibles de las proteínas codificadas por el DNA mitocondrial, fue posible localizar en la molécula circular de DNA todos los genes mitocondriales humanos (**Figura 14–60**).

Comparando los genomas del núcleo, de los cloroplastos y de las bacterias con el genoma mitocondrial humano se pueden observar varios rasgos sorprendentes:

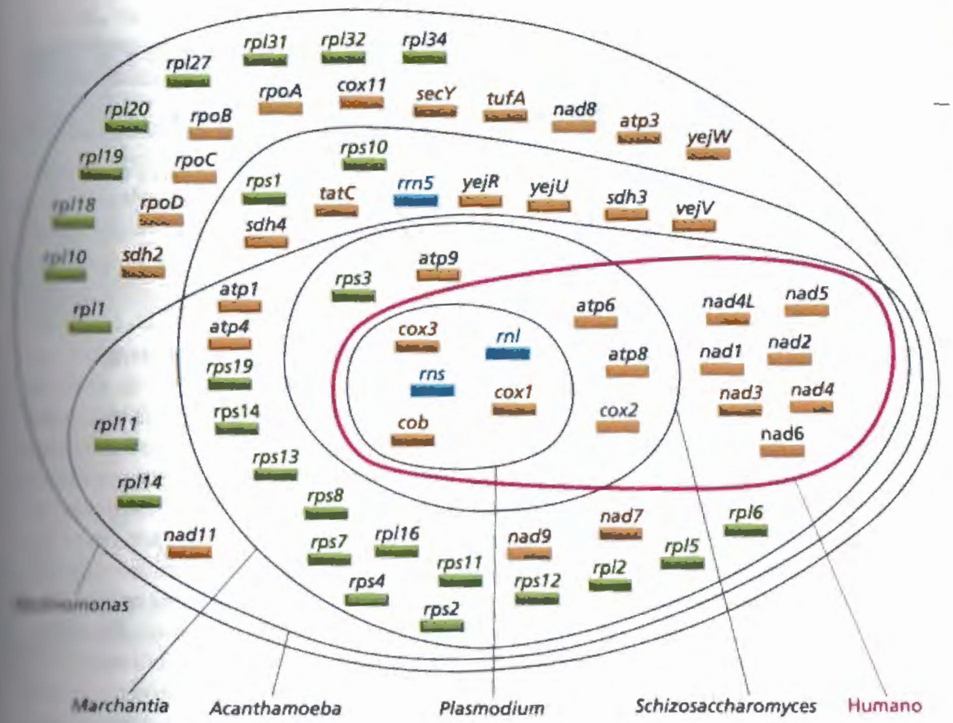


Figura 14–59 Comparación de genomas mitocondriales. Los genomas mitocondriales menos complejos codifican subconjuntos de proteínas y de RNA ribosomales del conjunto de los que son codificados por genomas mitocondriales más grandes. Sólo hay cuatro genes que están en todos los genomas mitocondriales conocidos: los que codifican los RNA ribosomales (*rns* y *rnl*), el citocromo *b* (*cob*) y una subunidad de la citocromo oxidasa (*cox1*). (Adaptado de M.W. Gray et al., *Science* 283:1476-1481, 1999. Con la autorización de AAAS.)

1. *Empaquetamiento génico denso.* A diferencia de otros genomas, parece que casi todos los nucleótidos forman parte de secuencias codificantes, ya sea de proteínas o de moléculas de rRNA o de tRNA. Dado que estas secuencias codificantes están prácticamente una a continuación de otra, existe muy poco espacio para las secuencias de DNA reguladoras.
2. *Uso relajado del codón.* Aunque en el citosol y en los cloroplastos existen 30 o más moléculas de tRNA diferentes que especifican aminoácidos, sólo se requieren 22 moléculas de tRNA para la síntesis proteica mitocondrial. En las mitocondrias, las reglas normales de apareamiento codón-anticodón son relajadas, de modo que muchas moléculas de tRNA reconocen cualquiera de los cuatro nucleótidos de la tercera posición (fluctuante). Esta lectura de "2 de cada 3" permite que un tRNA se aparee con uno cualquiera de los cuatro codones diferentes y permita la síntesis proteica con menos moléculas de tRNA.
3. *Una variante del código genético.* Quizás lo más sorprendente aparezca al comparar las secuencias génicas mitocondriales y las secuencias de aminoácidos de las proteínas correspondientes, ya que se concluye que en las mitocondrias el código genético está alterado, de modo que 4 de los 64 codones tienen "significados" diferentes de los que tienen en otros genomas (**Tabla 14–3**).

Figura 14–60 Organización del genoma mitocondrial humano. El genoma contiene 2 genes rRNA, 22 genes tRNA y 13 secuencias que codifican proteínas. También se han secuenciado completamente los DNA de los genomas mitocondriales de muchos otros animales. Muchos de estos DNA mitocondriales de células animales tienen los mismos genes y la misma organización en todos los organismos animales desde los mamíferos hasta los peces.

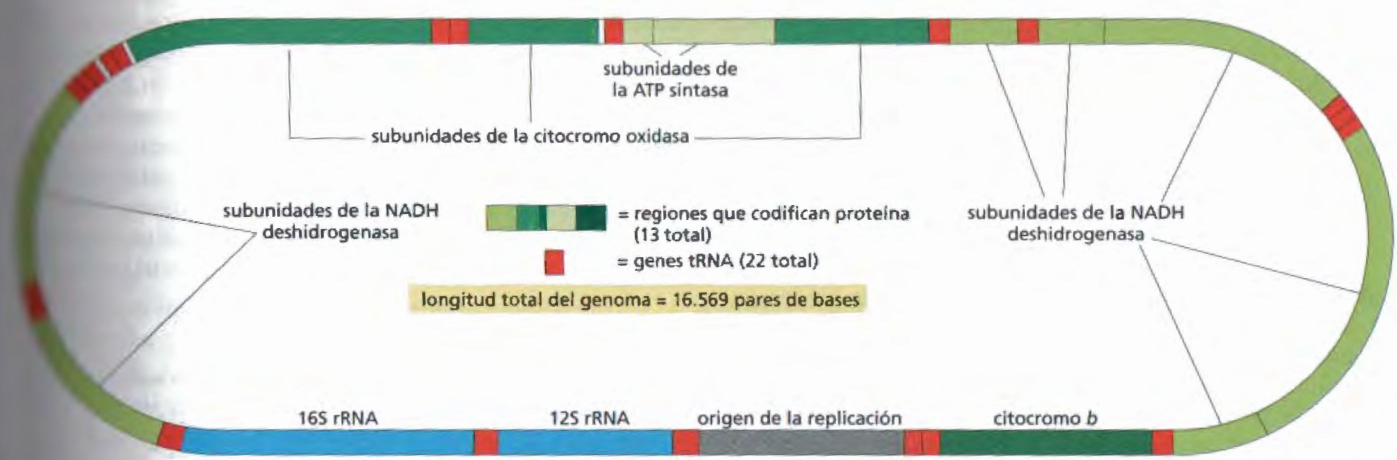


Tabla 14–3 Algunas diferencias entre el código genético "universal" y algunos códigos genéticos mitocondriales*

CODÓN	CÓDIGO "UNIVERSAL"	CÓDIGOS MITOCONDRIALES			
		MAMÍFEROS	INVERTEBRADOS	LEVADURAS	PLANTAS
UGA	STOP	*Trp*	*Trp*	*Trp*	STOP
AUA	Ile	*Met*	*Met*	*Met*	Ile
CUA	Leu	Leu	Leu	*Thr*	Leu
AGA, AGG	Arg	*STOP*	*Ser*	Arg	Arg

* En *rojo* cursiva se señalan los códigos que difieren del código "universal".

La estrecha similitud entre el código genético de todos los organismos proporciona evidencias incontestables de que todas las células evolucionaron a partir de un antepasado común. Entonces, ¿cómo podemos explicar las diferencias en el código genético de las mitocondrias? Una pista procede del descubrimiento de que el código genético mitocondrial es diferente en diferentes organismos. En el protozoo *Reclinomonas*, que tiene el mayor número de genes mitocondriales de los de la Figura 14–59, el código genético no varía respecto al código genético estándar del núcleo celular. Así UGA, que en todas las células es un codón de paro, en las mitocondrias de mamíferos, hongos e invertebrados se lee como triptófano. De manera similar, el codón AGG que normalmente codifica arginina, en las mitocondrias de los mamíferos codifica paro y en las mitocondrias de *Drosophila* codifica serina (véase Tabla 14–3). Esta variación sugiere que en el código genético de las mitocondrias aparece una variación al azar. Seguramente, el número en extremo pequeño de proteínas codificadas por el genoma mitocondrial hace que un cambio ocasional en el significado de un codón raro sea tolerable, mientras que un cambio de este tipo en un gran genoma podría alterar la función de muchas proteínas y, por tanto, destruir la célula.

Las mitocondrias de las células animales contienen el sistema genético más sencillo de todos los conocidos

Estudios comparativos entre las secuencias de DNA de diferentes organismos revelan que en los vertebrados (incluidos nosotros mismos), la velocidad de sustitución de nucleótidos durante la evolución ha sido 10 veces mayor en los genomas mitocondriales que en los genomas nucleares. Esta diferencia posiblemente se deba a la reducida fidelidad de los sistema de replicación y/o reparación en el DNA mitocondrial. Dado que en las mitocondrias de las células animales sólo se tienen que replicar y expresar en forma de RNA y de proteína, unos 16.500 nucleótidos de DNA, la tasa de error por nucleótido copiado por la replicación de DNA, mantenido por la reparación de DNA, transcrito por la RNA polimerasa o traducido a proteína por los ribosomas mitocondriales, puede ser relativamente alta sin que se altere ninguno de los escasos productos génicos. Este hecho explicaría por qué los mecanismos que realizan estos procesos son bastante sencillos respecto a los utilizados con el mismo propósito en otras partes de la célula. Por ejemplo, aunque no se ha probado, se puede esperar que la presencia de tan sólo 22 tipos de tRNA y el tamaño extraordinariamente pequeño de los rRNA (inferior a dos tercios del tamaño de los rRNA de *E. coli*) pueden reducir la fidelidad de la síntesis proteica en la mitocondria.

La velocidad elevada de la evolución de los genes mitocondriales de los animales hace que las comparaciones entre las secuencias de DNA mitocondriales sean en especial útiles para estimar las fechas de sucesos evolutivos relativamente recientes, tales como las fases del desarrollo de los primates.

Algunos genes de orgánulos contienen intrones

El procesamiento de los RNA precursores desempeña un papel importante en los dos sistemas mitocondriales estudiados con más detalle: el humano y el de levadura. En células humanas, las dos hebras del DNA mitocondrial son transcritas a la misma velocidad a partir de una sola región promotora en cada hebra, produciendo dos moléculas diferentes de RNA

gigantes, cada una de las cuales tiene una copia completa de cada hebra del DNA. Por lo tanto, la transcripción es por completo simétrica. Los transcritos hechos sobre una hebra son procesados en profundidad mediante la acción de nucleasas que los fragmentan, produciendo las dos moléculas de rRNA, la mayoría de las moléculas de tRNA y unas 10 moléculas de RNA que presentan poli-A. Por el contrario, el procesamiento del transcrito de la otra hebra sólo produce ocho moléculas de tRNA y un pequeño RNA que tiene poli-A; aparentemente, el 90% restante de este transcrito (que es complementario de las secuencias codificantes sintetizadas en la otra hebra) contiene información no útil y es degradado. Los RNA que presentan poli-A son los mRNA mitocondriales: aunque les falta la estructura de caperuza ("cap") en su extremo 5´, tienen una cola de poli-A en su extremo 3´ que se añade después de la transcripción mediante una polimerasa de poli-A mitocondrial.

A diferencia de los genes mitocondriales de humanos, algunos genes mitocondriales de plantas y de hongos (incluyendo las levaduras) presentan *intrones*, que deben ser eliminados por maduración por corte y empalme del RNA. También se presentan intrones en algunos genes de cloroplastos vegetales. Muchos de los intrones de genes de orgánulos consisten en secuencias de nucleótidos emparentadas que son capaces de madurar por sí solos fuera de los transcritos de RNA, mediante catálisis mediada por RNA (véase Capítulo 6), aunque por lo general estas reacciones de automaduración están facilitadas por proteínas. La presencia de intrones en los genes de orgánulos es sorprendente, ya que en los genes de las bacterias, cuyos antepasados se cree que dieron lugar a las mitocondrias y a los cloroplastos de las plantas, no se hallan intrones similares a éstos.

En levaduras es posible que un mismo gen mitocondrial tenga un intrón en una cadena pero no en la otra. Al parecer, estos "intrones opcionales" son capaces de desplazarse, entrando o saliendo de los genomas, igual que los elementos transponibles. Por otro lado, en otros genes mitocondriales de levadura se han hallado intrones en la misma posición que en el genoma de las mitocondrias de *Aspergillus* y de *Neurospora*, lo cual implica que estos intrones fueron heredados a partir de un antepasado común de estos hongos. Parece probable que las secuencias de estos intrones tengan un origen muy antiguo –habría que remontarse a una bacteria ancestral– y que se hayan perdido en muchas bacterias, pero que se hayan conservado preferentemente en aquellos genomas de orgánulos en los que la maduración del RNA esté regulada, colaborando al control de la expresión génica.

El genoma del cloroplasto de las plantas superiores tiene unos 120 genes

Ya se han secuenciado más de 20 genomas de cloroplastos. Los genomas de plantas distintas (tales como el tabaco y las hepáticas) son muy similares entre sí e incluso muy similares a los de las algas verdes (**Figura 14–61**). Los genes de los cloroplastos están implicados en cuatro tipos principales de procesos: transcripción, traducción, fotosíntesis y biosíntesis de pequeñas moléculas tales como aminoácidos, ácidos grasos y pigmentos. Los genes de los cloroplastos codifican al menos 40 proteínas cuyas funciones son desconocidas. Paradójicamente, todas las proteínas conocidas codificadas en el cloroplasto forman parte de grandes complejos proteicos que también contienen una o más subunidades codificadas en el núcleo. Las posibles razones de esta paradoja se expondrán más adelante.

Los genomas de los cloroplastos y de las bacterias presentan similitudes sorprendentes. Las secuencias reguladoras básicas, como los promotores de la trascripción y los terminadores, son casi idénticas en los dos casos. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas en cloroplastos son claramente reconocibles como bacterianas y varias agrupaciones de genes con funciones relacionadas (p. ej., los que codifican proteínas ribosomales) están organizados de la misma manera en los genomas de los cloroplastos, de *E. coli* y de las cianobacterias.

Son necesarios detallados estudios comparativos de un gran número de secuencias nucleotídicas homólogas para trazar la vía evolutiva desde las bacterias a los cloroplastos, pero se pueden esbozarse varias conclusiones:

1. Los cloroplastos de plantas superiores evolucionaron a partir de bacterias fotosintéticas.
2. Muchos de los genes de la bacteria original pueden ser identificados en el genoma nuclear, donde fueron transferidos y mantenidos de forma estable. En plantas superiores, por ejemplo, dos tercios de las casi 60 proteínas ribosomales del cloroplasto

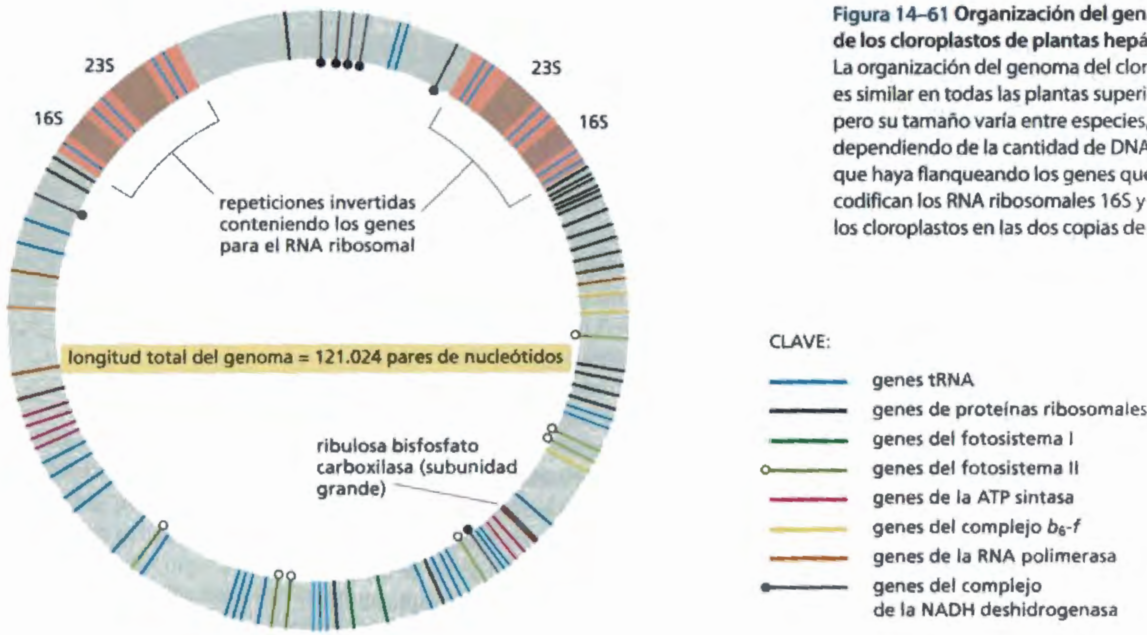


Figura 14–61 Organización del genoma de los cloroplastos de plantas hepáticas. La organización del genoma del cloroplasto es similar en todas las plantas superiores, pero su tamaño varía entre especies, dependiendo de la cantidad de DNA que haya flanqueando los genes que codifican los RNA ribosomales 16S y 23S de los cloroplastos en las dos copias de DNA.

están codificadas en el núcleo celular, aunque los genes tienen un claro ancestro bacteriano, y los ribosomas del cloroplasto todavía retienen sus propiedades bacterianas originales.

Los genes mitocondriales se heredan por un mecanismo no mendeliano

Muchos de los experimentos realizados sobre los mecanismos de la biogénesis mitocondrial se han llevado a cabo en *Saccharomyces cerevisiae* (la levadura del pan). Existen diversas razones para esta elección. En primer lugar, estas levaduras tienen la capacidad de sobrevivir exclusivamente de la glucólisis si se cultivan en presencia de glucosa y, por lo tanto, sin utilizar las mitocondrias, necesarias para la fosforilación oxidativa. Este hecho permite a estas células sobrevivir con mutaciones de su DNA mitocondrial o nuclear que interfieran con las funciones mitocondriales; sin embargo, estas mutaciones resultan letales en muchos otros eucariotas. En segundo lugar, las levaduras son eucariotas unicelulares sencillos, fáciles de cultivar y de caracterizar bioquímicamente. Por último, las células de la levadura por lo general se reproducen asexualmente mediante gemación, pero también se pueden reproducir sexualmente. Durante su reproducción sexual, dos células haploides se fusionan formando un zigoto diploide que puede crecer por divisiones mitóticas o bien dividirse por meiosis produciendo de nuevo células haploides.

El control en el laboratorio de la alternancia entre reproducción sexual y asexual facilita en gran medida su análisis genético. Dado que las mutaciones en los genes mitocondriales no se heredan de acuerdo a las reglas mendelianas que gobiernan la herencia de los genes nucleares, los estudios genéticos revelan –antes de que el genoma mitocondrial sea secuenciado– cuáles de los genes implicados en la función mitocondrial de la levadura se localizan en el núcleo y cuáles en la mitocondria. En la **Figura 14–62** se ilustra un ejemplo de herencia no mendeliana (citoplasmática) de los genes mitocondriales en una célula haploide de levadura. En este ejemplo, se traza la herencia de un gen mutante que hace que la síntesis proteica mitocondrial sea resistente al cloranfenicol.

Cuando una célula haploide resistente al cloranfenicol se cruza con una célula haploide del fenotipo salvaje sensible al cloranfenicol, el zigoto diploide resultante contendrá una mezcla de mitocondrias mutantes y salvajes. En el zigoto se fusionarán los dos conjuntos mitocondriales dando lugar a un retículo continuo que contendrá los genomas de las dos células que se han cruzado. Cuando este zigoto sufra la mitosis, en las células diploides hijas se segregarán copias de ambos DNA mitocondriales, el mutante y el salvaje. En el caso del DNA nuclear, cada célula hija recibe exactamente dos copias de cada cromosoma, uno de cada progenitor. Por el contrario, en el caso del DNA mitocondrial, la célula hija puede he-

mular más copias del DNA mutante que del salvaje, o viceversa. En las siguientes mitosis se podrán ir enriqueciendo en cualquiera de los dos tipos de DNA, de forma que llegará un momento en que muchas células sólo contendrán o DNA mutante o DNA salvaje. Este proceso aleatorio se denomina *segregación mitótica.*

Cuando estas células diploides, que han segregado su genoma mitocondrial de esta forma, sufren meiosis y forman cuatro células haploides hijas, cada una de estas células hijas recibirá los mismos genes mitocondriales. Este tipo de herencia se denomina no-mendeliana o *herencia citoplasmática*, en contraposición con la herencia mendeliana de los genes nucleares (véase la Figura 14–62). Cuando esto ocurre, se demuestra que el gen en cuestión se localiza fuera de los cromosomas nucleares.

A pesar de que las agrupaciones de moléculas de DNA mitocondrial (nucleoides) están relativamente inmóviles en el retículo mitocondrial, debido a que se encuentran anclados en la membrana interna, a veces se pueden observar grupos de nucleoides. Esto sucede con más frecuencia en el momento en que las dos redes mitocondriales paternas se fusionan formando el zigoto. Cuando en un mismo nucleoide hay DNA diferentes, se puede producir recombinación, de tal manera que el genoma mitocondrial contendrá DNA de los dos progenitores, que se heredará de forma estable después de su separación mitótica.

En muchos organismos los genes de los orgánulos se heredan de la madre

Las consecuencias de la herencia citoplasmática son más profundas para algunos organismos, incluido el hombre, que para las levaduras. En las levaduras, cuando dos células haploides se cruzan, ambas son de igual tamaño y por lo tanto contribuyen por igual a la dotación del DNA mitocondrial del zigoto (véase la Figura 14–62). Por consiguiente, en la levadura la

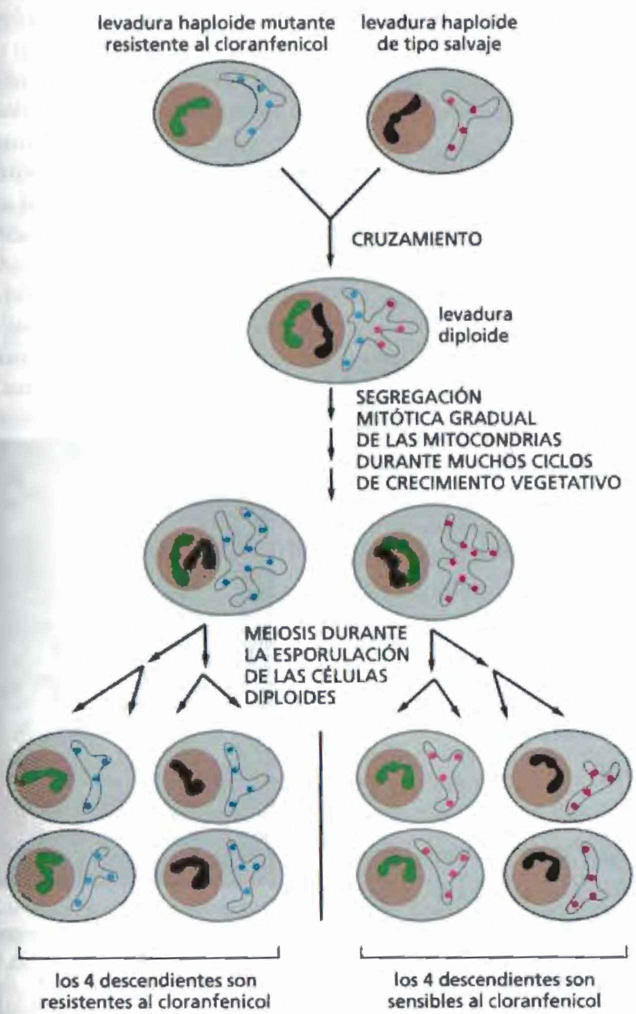


Figura 14–62 Diferencias entre los patrones de herencia de los genes mitocondriales y los genes nucleares en la levadura. Para cada gen nuclear, dos de las cuatro células que resultan de la meiosis heredan el gen procede de una de las células haploides parentales originales (cromosomas *verdes*); las otras dos células heredan el gen que procede de la otra célula (cromosomas *negros*). En cambio, en el caso de los genes mitocondriales (herencia no mendeliana) es posible que las cuatro células que resultan de la meiosis hereden los genes mitocondriales de una sola de las dos células haploides originales. En este ejemplo, el gen mitocondrial es tal, que en su forma mutante (DNA mitocondrial marcado con *puntos azules*) hace que la síntesis de proteínas mitocondriales sea resistente al cloranfenicol, un inhibidor de la síntesis de proteínas que actúa específicamente sobre los ribosomas semejantes a los de los procariotas de las mitocondrias y de los cloroplastos. Es posible detectar las células de levadura que contienen el gen mutado por su capacidad para crecer en presencia de cloranfenicol en un sustrato como glicerol, que no puede ser utilizado por la glucólisis. Con la glucólisis bloqueada, el ATP debe ser suministrado por la mitocondria funcional y, por tanto, las células que tienen el DNA mitocondrial normal (*puntos rojos*) no pueden crecer.

herencia mitocondrial es *biparental*: ambos progenitores contribuyen por igual al acervo de genes mitocondriales de la progenie (aunque, como hemos visto, tras varias generaciones de crecimiento vegetativo, a menudo cada *individuo* de la progenie tiene mitocondrias procedentes de uno solo de los progenitores). Por el contrario, en los animales superiores el óvulo aporta siempre al zigoto mucho más citoplasma que el espermatozoide –en algunas especies animales, el espermatozoide no aporta nada de citoplasma al zigoto. Por consiguiente, cabe esperar que en los animales superiores, la herencia mitocondrial sea *unipa-rental* (más exactamente, *materna*). En algunos animales de laboratorio se ha podido demostrar esta *herencia materna*. Un cruce entre animales que presentan DNA mitocondrial del tipo A y animales del tipo B genera una progenie que presenta sólo DNA mitocondrial del tipo materno. De forma similar, siguiendo en grandes familias la distribución de secuencias variantes de DNA mitocondrial, hemos encontrado que en la especie humana, las mitocondrias se heredan por vía materna.

En alrededor de dos terceras partes de las plantas superiores, los cloroplastos paternos masculinos (contenidos en los granos de polen) no pasan al zigoto, de tal manera que tanto el DNA de los cloroplastos como el de las mitocondrias se heredan por vía materna. En otras plantas, los cloroplastos del polen sí que pasan al zigoto, de forma que la herencia de los cloroplastos sea biparental. En estas plantas, la presencia de cloroplastos defectuosos es la causa de la *variegación*: mediante la segregación mitótica, en un zigoto se puede producir una mezcla de cloroplastos normales y defectuosos durante el crecimiento y desarrollo de la planta, produciendo por lo tanto porciones alternantes verdes y blancas en las hojas. Las porciones verdes tienen los cloroplastos normales, mientras que las blancas tienen los cloroplastos defectuosos (**Figura 14–63**).

Un óvulo humano fecundado contiene casi unas 2000 copias del genoma mitocondrial humano, la mayor parte o todo heredado de la madre. En un humano en el que todo su genoma contenga una mutación deletérea, debería, en principio, no sobrevivir. Sin embargo, algunas madres tienen una población mixta formada por una parte del genoma mitocondrial mutante y otra normal. Sus hijas e hijos heredarán esta población mixta de DNA y serán sanos, a no ser que en el proceso de segregación mitótica resulte que, por casualidad, una gran parte de las mitocondrias sea defectuosa en un determinado tejido. Los tejidos que corren un mayor riesgo son aquellos que tienen necesidad de una gran cantidad de ATP, como por ejemplo el tejido nervioso y el muscular.

Podemos identificar una enfermedad hereditaria en los humanos causada por una mutación en el DNA mitocondrial porque se transmitirá de las madres a los hijos e hijas, y éstas (no los hijos) la transmitirán también a sus hijos e hijas. Como cabría esperar, teniendo en cuenta que la segregación mitótica es un proceso al azar, los síntomas de este tipo de enfermedades varía enormemente entre los diferentes miembros de una misma familia, tanto por lo que se refiere a la gravedad como a la edad y al tejido afectado.

Consideremos por ejemplo una enfermedad hereditaria como es la *epilepsia mioclónica y la enfermedad de las fibras rojas deshilachadas* (*MERRF: myoclonic epilepsy and ragged red fiber disease*) causada por una mutación en un gen que codifica un tRNA. Esta enfermedad aparece cuando, por casualidad, un determinado tejido hereda una gran cantidad de genoma mitocondrial defectuoso. Por encima de un valor umbral, la cantidad de tRNA defectuoso disminuye la síntesis de proteínas mitocondriales imprescindibles para el transporte de electrones y la producción de ATP. Como resultado de ello, el músculo es débil, aparecen problemas cardíacos (como consecuencia de los efectos sobre el músculo cardíaco), algún tipo de epilepsia o de demencia (debido a sus efectos sobre las células nerviosas) o pueden aparecer otros síntomas. No nos debe sorprender que muchas otras enfermedades mitocondriales resulten en fenotipos similares.



Figura 14–63 Una hoja variegada. En las zonas blancas de la hoja, las células han heredado un cloroplasto defectuoso. (Por cortesía de John Innes Foundation.)

Los mutantes diminutos de la levadura demuestran la extraordinaria importancia del núcleo celular en la biogénesis mitocondrial

Diversos estudios genéticos en levadura han resultado de una gran importancia para el análisis de la biogénesis mitocondrial. Un ejemplo notable lo constituyen los estudios de mutantes de levadura que tienen grandes deleciones en su DNA mitocondrial, de manera que toda la síntesis proteica mitocondrial se halla anulada. Como era de esperar, estos mutantes no pueden llevar a cabo la respiración mitocondrial. Algunos de estos mutantes carecen incluso de DNA mitocondrial. Dado que estos mutantes forman colonias extraordinariamente pequeñas

cuando crecen en un medio que contiene una baja cantidad de glucosa, todos los mutantes con estas mitocondrias defectuosas se denominan *mutantes diminutos citoplasmáticos*.

Los mutantes diminutos no pueden sintetizar proteínas en sus mitocondrias, por lo que no pueden tener mitocondrias que produzcan ATP, pero a pesar de todo tienen mitocondrias con una membrana externa normal y con una membrana interna que presenta crestas muy poco desarrolladas (**Figura 14–64**). Estas mitocondrias contienen casi todas las proteínas mitocondriales que están codificadas por los genes nucleares y se importan desde el citosol, incluyendo las DNA y las RNA polimerasas, todas las enzimas del ciclo del ácido cítrico y muchas proteínas de la membrana mitocondrial interna, lo que demuestra claramente la extraordinaria importancia del núcleo en la biogénesis mitocondrial. Los mutantes diminutos también demuestran que un orgánulo que se divide por fisión puede replicarse de forma indefinida en el citoplasma de células eucariotas proliferantes, incluso en ausencia completa de su propio genoma. Es posible que normalmente los peroxisomas se repliquen de esta manera (véase Figura 12–33).

Para el caso de los cloroplastos, los equivalentes más cercanos a los mutantes diminutos mitocondriales de las levaduras son los mutantes de algas unicelulares como la *Euglena*. Algunos mutantes de este tipo en las que no tiene lugar la síntesis proteica en los cloroplastos, presentan cloroplastos y son perfectamente viables si se les proporciona sustratos oxidables. No obstante, si en las plantas superiores se bloquea el desarrollo de los cloroplastos maduros, ya sea situando las plantas en la oscuridad o bien debido a que el DNA del cloroplasto sea defectuoso o no exista, las plantas mueren.

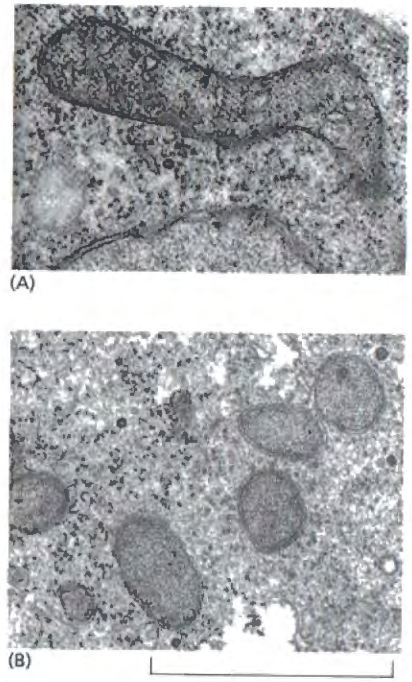


Figura 14–64 Electromicrografías de células de levadura. (A) Estructura de una mitocondria normal. (B) Mitocondrias con un mutante diminuto que carece de todos los productos génicos codificados por las mitocondrias, por lo que el orgánulo está formado exclusivamente por proteínas codificadas en el núcleo de la célula. (Por cortesía de Barbara Stevens.)

Las mitocondrias y los plastos tienen proteínas específicas de tejido que están codificadas en el núcleo de la célula

En determinados tipos celulares, las mitocondrias pueden tener funciones especializadas. Por ejemplo, el *ciclo de la urea* es la vía metabólica central de los mamíferos para eliminar el nitrógeno de los compuestos que contienen nitrógeno. Este nitrógeno se excreta por la orina en forma de urea. Diferentes enzimas de la matriz mitocondrial, codificadas en el núcleo, catalizan diferentes etapas de este ciclo. La síntesis de urea sólo se lleva a cabo en algunos tejidos, entre ellos el hígado. Solamente en estos tejidos se sintetizan estas enzimas necesarias y son transportadas a la mitocondria.

Los complejos enzimáticos respiratorios de la membrana mitocondrial interna de las células de los mamíferos también contienen diversas enzimas específicas de tejido, subunidades codificadas en el núcleo que al parecer actúan como reguladoras del transporte de electrones. Así, algunos humanos presentan una alteración genética muscular debido a una subunidad defectuosa de la citocromo oxidasa. Dicha subunidad es específica de las fibras musculares esqueléticas, por lo que las otras células de este mismo individuo, incluyendo las fibras musculares del corazón, funcionan normalmente y permiten la supervivencia del individuo. Como sería de esperar, las diferencias específicas de tejido también se presentan entre las proteínas de los cloroplastos codificadas en el núcleo.

Las mitocondrias importan la mayor parte de sus lípidos; los cloroplastos producen la mayor parte de ellos

La biosíntesis de cloroplastos y de mitocondrias requiere lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Los cloroplastos tienden a producir los lípidos que necesitan. En las hojas de la espinaca, por ejemplo, toda la síntesis celular de ácidos grasos tiene lugar en los cloroplastos, mientras que su insaturación tiene lugar en otro compartimiento de la célula. Los grandes glucolípidos del cloroplasto también se producen de forma local.

Las mitocondrias, por el contrario, importan la mayor parte de sus lípidos. En las células animales, los fosfolípidos fosfatidilcolina y fosfatidilserina, se sintetizan en el retículo endoplasmático y luego son transferidos a la membrana mitocondrial externa. Además de descarboxilar la fosfatidilserina importada transformándola en fosfatidiletanolamina, la principal reacción de la biosíntesis de lípidos catalizada por la mitocondria es la transformación de los lípidos importados hasta cardiolipina (bisfosfatidilglicerol). La cardiolipina es un fosfolípido "doble" que tiene cuatro colas de ácidos grasos (**Figura 14–65**). Se halla sobre todo en la membrana mitocondrial interna y constituye alrededor de un 20% de su contenido lipídico total.

En el Capítulo 12 se trata la importante cuestión de cómo se produce el transporte específico a las mitocondrias y a los cloroplastos de determinadas proteínas citosólicas.

Las mitocondrias pueden contribuir al envejecimiento de las células y de los organismos

El oxígeno gas, O_2, que tiene una gran afinidad por los electrones, se vuelve especialmente reactivo en cuanto adquiere un único electrón y se reduce en parte a superóxido (O_2^-). Este fenómeno explica por qué al final de la cadena respiratoria los dos átomos de oxígeno superóxido O_2^- permanecen estrechamente unidos a la citocromo oxidasa hasta que han captado cuatro electrones y pueden ser liberados de forma segura en forma de dos moléculas de agua (véase Figura 14–27). A medida que se conocen detalles del proceso biológico de transporte de electrones entendemos que la evolución ha seleccionado muchos mecanismos inteligentes que impiden que los electrones de elevada energía se escapen de la cadena de transporte de electrones. Sin embargo, a pesar de ello a menudo se producen accidentes; se ha estimado que en 1 de cada 2000 transferencias de electrones entre el NADH y el oxígeno se forma una molécula de O_2^-.

Por lo tanto, las células tienen mecanismos de seguridad que minimizan los daños que producen los iones superóxido y otras especies reactivas del oxígeno en cuanto se forman estos iones. El principal mecanismo de seguridad son las enzimas *superóxido dismutasa* (*SOD*), que catalizan la reacción $O_2^- + O_2^- + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. El peróxido de hidrógeno, todavía tóxico, es metabolizado hasta agua mediante la *catalasa* (que lleva a cabo la reacción $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$) o por la *glutatión peroxidasa* (que lleva a cabo la reacción $H_2O_2 + 2\ GSH \rightarrow 2\ H_2O + GSSG$, donde GSH representa el tripéptido glutatión con su grupo sulfhidrilo cisteína).

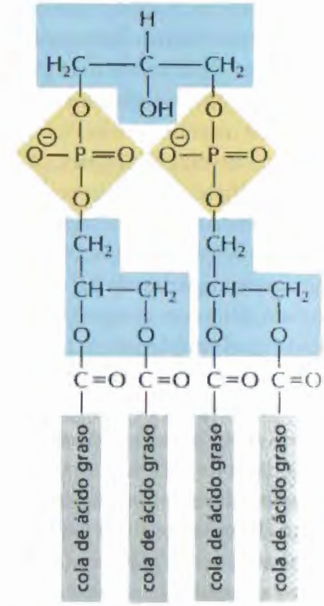


Figura 14–65 Estructura de la cardiolipina. La cardiolipina es un lípido inusual en la membrana mitocondrial interna.

Aproximadamente el 90% del O_2^- generado en las células se forma en el interior de las mitocondrias. Por tanto, no resulta sorprendente que la mitocondria contenga sus propias enzimas superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, o que los ratones deficientes en superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD) mueran muy jóvenes a diferencia de los ratones que sólo carecen de la forma citosólica o de la forma extracelular de esta enzima. Incluso en animales normales, se observa que el DNA mitocondrial contiene unos niveles de nucleótidos oxidados anormales diez veces superiores que los del DNA nuclear. Este tipo de observaciones, junto con las observaciones de que las mitocondrias de las personas de edad avanzada funcionan poco, ha conducido a una hipótesis de "círculo vicioso" que intenta explicar por qué envejecen los organismos. Desde este punto de vista, las alteraciones por oxidación generan mutaciones que se acumulan en el DNA mitocondrial de los tejidos somáticos, que a su vez causa una aceleración de la producción de errores por oxidación en estos tejidos. Este circuito de retroalimentación continúa hasta que las mitocondrias de los ratones viejos o de los ancianos producen tantos productos de oxidación que todo el organismo decae, dando lugar a una edad avanzada debilitada.

¿Hay algo cierto en esta hipótesis? Es evidente que el envejecimiento es un proceso complejo. Además, en los organismos pluricelulares inferiores como los gusanos y las moscas, la esperanza de vida se puede prolongar de forma espectacular mediante algún cambio genético de entre varios posibles. Estos datos sugieren que estos organismos han sido programados para envejecer y morir cuando lo hacen, en lugar de acabar con una gran cantidad de mutaciones o alteraciones acumuladas. Como una prueba directa de la hipótesis de círculo vicioso, ratones modificados genéticamente para producir la mitad de la cantidad normal de MnSOD viven tanto como los ratones normales y no parecen envejecer antes de tiempo, pero acumulan una extraordinaria cantidad de alteraciones oxidativas en las mitocondrias, presentan un declive prematuro de la función mitocondrial y presentan una acumulación prematura de tumores.

Aunque todavía es prematuro, parece probable que podamos prolongar nuestras vidas simplemente tomando pastillas de antioxidantes.

¿Por qué los cloroplastos y las mitocondrias tienen sus propios sistemas genéticos?

¿Por qué las mitocondrias y los cloroplastos necesitan sus propios sistemas genéticos, si otros orgánulos, que también están en el citosol, como los peroxisomas y los lisosomas, no

los tienen? La pregunta no es trivial, puesto que mantener un sistema genético diferente resulta costoso, ya que para ello en el núcleo se tienen que codificar más de 90 proteínas, incluyendo muchas proteínas ribosómicas, las aminoacil-tRNA sintasas, las DNA y RNA polimerasas, y las enzimas de procesamiento y de modificación del RNA (**Figura 14–66**). Las secuencias de aminoácidos de la mayoría de las proteínas de mitocondrias y cloroplastos difieren de las secuencias de las proteínas correspondientes del núcleo y del citosol y no existe ninguna razón para pensar que estos orgánulos tengan relativamente pocas proteínas en común con el resto de la célula. Esto significa que el núcleo tiene que proporcionar como mínimo 90 genes para poder mantener el sistema genético de cada orgánulo.

La razón de este arreglo tan costoso no está clara; la esperanza de que el conocimiento de la secuencia de nucleótidos del genoma de las mitocondrias y de los cloroplastos proporcione la respuesta definitiva, ha resultado fallida. Ninguna teoría ha planteado razones imperiosas por las que las proteínas de las mitocondrias tengan que estar producidas en las propias mitocondrias y no puedan estar sintetizadas, todas ellas, en el citosol.

Las diferentes subunidades proteicas de los diferentes complejos enzimáticos mitocondriales están altamente conservadas a lo largo de la evolución, pero no está conservado su lugar de síntesis (véase Figura 14–59). Sin embargo, dos genes codificantes de proteínas, *CoxI* y *Cob* están presentes en todos los genomas mitocondriales. Las proteínas codificadas por estos genes son grandes e hidrofóbicas, con muchos segmentos transmembrana y quizá tienen que ser insertadas en la membrana mitocondrial interna de forma cotraduccional por los ribosomas mitocondriales.

Otra opción es que los sistemas genéticos de los orgánulos sean simplemente un callejón evolutivo sin salida. Desde el punto de vista de la hipótesis endosimbióntica, esto podría significar que los procesos por los que los endosimbiontes transfirieron la mayoría de sus genes al núcleo se pararon antes de completarse. Transferencias adicionales pudieron

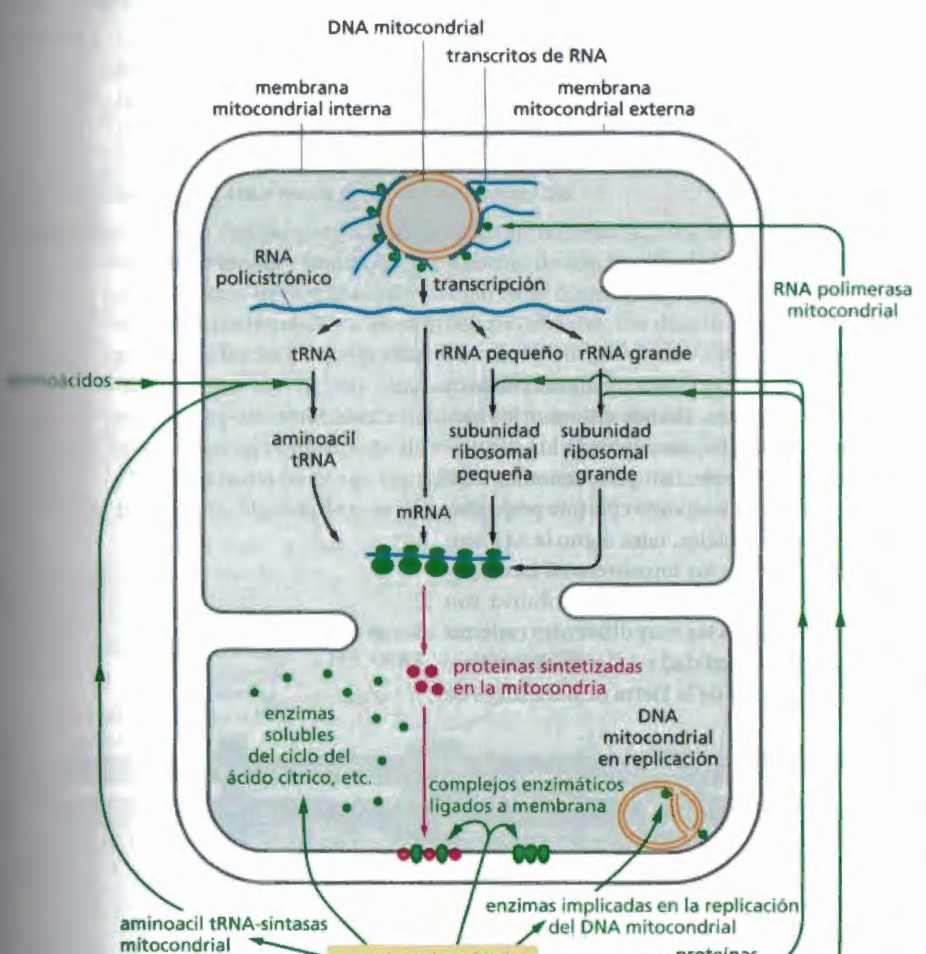


Figura 14–66 Origen de las proteínas y de los RNA mitocondriales. Las proteínas codificadas en el núcleo e importadas desde el citosol desempeñan un papel importante en la generación del sistema genético de las mitocondrias, además de constituir la mayor parte de las demás proteínas del orgánulo. En este diagrama no se indican las otras proteínas codificadas por el núcleo que regulan la expresión de cada uno de los genes mitocondriales en un nivel postranscripcional. Las mitocondrias sólo contribuyen a su sistema genético con los mRNA, los rRNA y los tRNA (en la mitocondria de algunos organismos, incluso los tRNA son importados).

haber quedado excluidas para la mitocondria por alteraciones en el código genético mitocondrial haciendo que estos genes mitocondriales hubieran permanecido no funcionales de haber sido transferidos al núcleo.

Resumen

Las mitocondrias son adiciones a las células que permiten a la mayoría de los eucariotas llevar a cabo la fosforilación oxidativa, mientras que los cloroplastos son adiciones a la célula que permiten a determinados eucariotas (plantas y algunas algas) llevar a cabo la fotosíntesis. Probablemente como resultado de su origen procariota, cada orgánulo crece a través de procesos coordinados que requieren la contribución de dos sistemas genéticos diferentes: el del orgánulo y el del núcleo celular. La mayoría de las proteínas de estos orgánulos están codificadas por el DNA nuclear, son sintetizadas en el citosol y luego son transportadas individualmente al orgánulo. Sin embargo, algunas proteínas del orgánulo y algunos RNA están codificadas por el DNA del orgánulo. El genoma mitocondrial humano contiene aproximadamente 16.500 nucleótidos y codifica 2 moléculas de RNA ribosómico, 22 moléculas de RNA de transferencia y 13 cadenas polipeptídicas diferentes. El genoma de los cloroplastos es unas 10 veces mayor que el de las mitocondrias y contiene unos 120 genes. Sin embargo, en mutantes en los que el genoma del orgánulo no es funcional, se pueden formar orgánulos parcialmente funcionales y en cantidades normales, lo que demuestra la extraordinaria importancia que tiene el núcleo en la biogénesis de ambos orgánulos.

Los ribosomas de los cloroplastos se parecen en gran medida a los ribosomas bacterianos, mientras que los ribosomas mitocondriales muestran similitudes y diferencias que dificultan mucho más el estudio de su origen. Algunas similitudes proteicas sugieren que las mitocondrias y los cloroplastos se originaron cuando una célula eucariota primitiva estableció una relación endosimbióntica estable con una bacteria: se cree que una bacteria púrpura dio lugar a las mitocondrias y que, más tarde, una cianobacteria dio lugar a los cloroplastos. Muchos de los genes de estas antiguas bacterias todavía son funcionales para producir proteínas del orgánulo, pero muchos otros han quedado integrados, por razones desconocidas, en el genoma nuclear, donde codifican enzimas semejantes a las de las bacterias, que son sintetizadas en los ribosomas del citosol y luego transportadas al orgánulo.

Las alteraciones que se van acumulando en los genomas de la mitocondria a lo largo del tiempo pueden constituir una de las causas del envejecimiento de las células y de los organismos, aunque todavía faltan muchos estudios para comprobar esta hipótesis de "círculo vicioso".

LA EVOLUCIÓN DE LAS CADENAS DE TRANSPORTE DE ELECTRONES

La mayor parte de lo que se conoce sobre la estructura, función y evolución de las células y organismos puede relacionarse con sus necesidades energéticas. Hemos visto que los mecanismos fundamentales para utilizar energía de fuentes tan dispares como la luz y la oxidación de la glucosa son los mismos. Parece que un método efectivo para sintetizar ATP surgió en una evolución temprana y desde entonces ha sido conservado con sólo pequeñas variaciones. ¿Cómo surgieron los primeros componentes cruciales, tales como la ATP sintasa, las bombas de protones generadoras de poder reductor y los fotosistemas? Las hipótesis sobre los acontecimientos que sucedieron en una escala temporal evolutiva son difíciles de probar. Pero disponemos de pistas, tanto respecto a las muy diferentes cadenas de transporte electrónico primitivas que sobreviven en la actualidad en algunas bacterias, como respecto a evidencias geológicas en relación al ambiente de la Tierra de hace miles de millones de años.

Probablemente las células más primitivas producían ATP por fermentación

Como se explicó en el Capítulo 1, se cree que las primeras células vivas aparecieron hace más de 3×10^9 años, cuando la Tierra no tenía más de 10^9 años. Probablemente las vías metabólicas más primitivas que producían ATP se parecían a las actuales formas de fermentación debido a la falta de oxígeno en el ambiente y a la presencia de moléculas orgánicas producidas de forma geoquímica.

En el proceso de fermentación se produce ATP mediante un proceso de fosforilación que utiliza la energía liberada cuando una molécula orgánica rica en hidrógeno, como la glucosa, se oxida parcialmente (véase Figura 2–71). Los electrones que proceden de las moléculas orgánicas oxidadas son transferidos (vía NADH o NADPH) a una molécula orgánica diferente (o a una parte diferente de la misma molécula) que, por lo tanto, se reduce. Al final del proceso de fermentación, una (o varias) de las moléculas orgánicas producidas se excretan al medio como productos metabólicos residuales; otros, tales como el piruvato, son retenidos por la célula para la biosíntesis.

Los productos excretados son diferentes en organismos diferentes, pero tienden a ser ácidos orgánicos (compuestos carbonados con un grupo COOH). En las células bacterianas los más importantes son el ácido láctico (que también se acumula en la glucólisis anaeróbica que se produce en el músculo) y ácidos como el fórmico, el acético, el propiónico, el butírico y el succínico.

La cadena de transporte de electrones capacitó a las bacterias anaeróbicas para utilizar compuestos orgánicos no fermentables como fuente principal de energía

Los procesos de fermentación primitivos no sólo generaban el ATP sino también el poder reductor (en forma de NADH o de NADPH) necesarios para la biosíntesis esencial. De esta forma, muchas de las principales vías metabólicas pudieron haber evolucionado mientras la fermentación constituyó la única forma de producción de energía. Sin embargo, con el tiempo las actividades metabólicas de esos organismos procariotas fueron cambiando el medio ambiente circundante, forzando a los organismos a desarrollar nuevas vías bioquímicas. La acumulación de productos residuales de fermentación, por ejemplo, pudo favorecer la siguiente serie de cambios:

Estadio 1. La excreción continua de ácidos orgánicos disminuyeron el pH del medio ambiente y favorecieron la evolución de proteínas que actuaban como bombas transmembrana de H^+ que bombeaban H^+ hacia el exterior de la célula para protegerla de los efectos peligrosos de la acidificación intracelular. Una de esas bombas debió utilizar la energía procedente de la hidrólisis del ATP y pudo haber sido la antecesora de la ATP sintasa actual.

Estadio 2. Al mismo tiempo que los ácidos orgánicos no fermentables se acumulaban en el medio ambiente y favorecían la evolución de una bomba de H^+ consumidora de ATP, el aporte de nutrientes fermentables de origen geoquímico, que aportaba la energía a las bombas y a otros procesos celulares, fue disminuyendo. Ello favoreció a las bacterias que podían excretar H^+ sin hidrolizar ATP, lo que les permitía conservar el ATP para otras actividades celulares. De este tipo de presiones selectivas pudieron haber surgido las primeras proteínas unidas a membrana que utilizaron el transporte de electrones entre moléculas de diferente potencial redox como fuente de energía para transportar H^+ a través de la membrana plasmática. Algunas de esas proteínas debieron encontrar sus dadores y acepto-

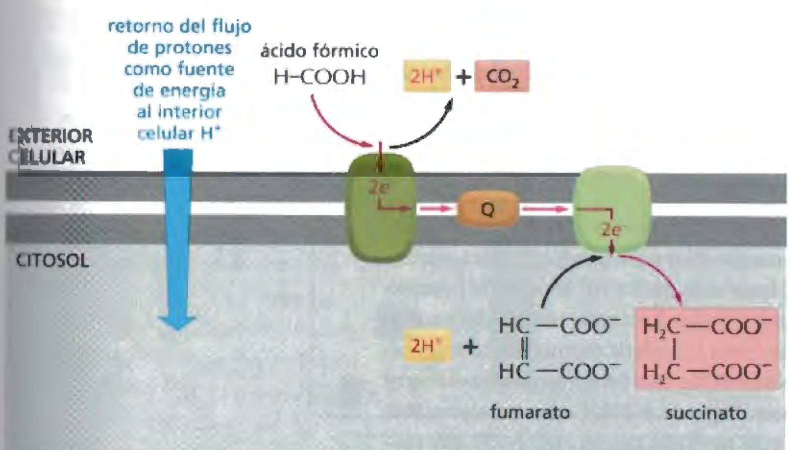


Figura 14–67 Oxidación de ácido fórmico en algunas bacterias actuales. En las bacterias anaeróbicas, incluyendo *E. coli*, la oxidación de ácido fórmico está mediada por una cadena de transporte de electrones conservadora de energía en la membrana celular. Tal como se indica en la figura, los reactivos de este proceso son el ácido fórmico y el fumarato, mientras que los productos de este proceso son el succinato y el CO_2. Nótese que los H^+ se generan fuera de la célula y se utilizan dentro de la célula, lo cual equivale a bombear H^+ hacia el exterior celular. Así pues, este sistema de transporte de electrones ligado a membrana puede generar un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana. El potencial redox del par ácido fórmico-CO_2 es de –420 mV, mientras que el del par fumarato-succinato es de +30 mV. (Comparar con la Figura 14–29.)

res de electrones entre los ácidos orgánicos no fermentables que acumulaban. Muchas de esas proteínas transportadoras de electrones se encuentran en las bacterias actuales: por ejemplo, algunas bacterias que crecen en ácido fórmico bombean H^+ utilizando una pequeña cantidad de energía redox derivada de la transferencia de electrones desde el ácido fórmico al fumarato (**Figura 14–67**). Otras tienen componentes transportadores de electrones similares dedicados solamente a la oxidación y reducción de sustratos inorgánicos (para un ejemplo de ello, véase la Figura 14–69).

Estadio 3. A la larga, algunas bacterias desarrollaron sistemas de transporte electrónico que bombeaban H^+, que fueron lo bastante eficientes para obtener más energía redox de la que necesitaban para mantener su pH interno. Ahora bien, las bacterias que disponían de los dos tipos de bombas de H^+ presentaban una ventaja. En esas células un gran gradiente electroquímico de protones generado por un excesivo bombeo de H^+ permitía el retorno de los protones a la célula a través de bombas de H^+ impulsadas por ATP, haciéndolas actuar al revés, ya que funcionaban como ATP sintasas produciendo ATP. A causa de que estas bacterias requerían cada vez menos aporte de nutrientes fermentables, proliferaron a expensas de sus vecinas.

En la **Figura 14–68** se resumen estos tres estadios hipotéticos en la evolución de los mecanismos de la fosforilación oxidativa.

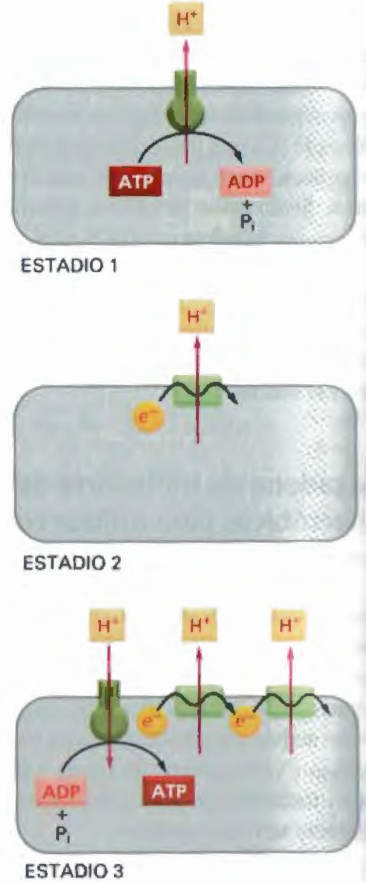


Figura 14–68 Evolución de los mecanismos de fosforilación oxidativa. Se muestra una posible secuencia; los estadios se describen en el texto.

Las bacterias fotosintéticas, suministrando una fuente inagotable de poder reductor, superaron el mayor obstáculo de la evolución de las células

Las etapas evolutivas descritas habrían resuelto el problema de mantener un pH intracelular neutro y una fuente abundante de energía, pero habrían dejado sin solución otro problema también muy importante. La disminución de la cantidad de nutrientes orgánicos fermentables significaba que se debía encontrar una fuente de carbono alternativa, para producir los azúcares que se utilizaban como precursores de otras muchas moléculas de la célula. El dióxido de carbono de la atmósfera constituía una abundante fuente potencial de carbono. Sin embargo, su conversión en una molécula orgánica, como por ejemplo un carbohidrato, requiere que el CO_2 fijado sea reducido por un fuerte dador electrónico, como el NADH o el NADPH, capaz de suministrar los dos electrones necesarios para generar a partir de cada CO_2 una unidad de (CH_2O) (véase la Figura 14–40). En las primeras etapas de la evolución celular debieron abundar agentes reductores fuertes como éstos, procedentes de los procesos de fermentación. Pero a medida que el aporte de nutrientes fermentables disminuía y empezaba a actuar una ATP sintasa unida a membrana produciendo la mayor parte del ATP de las células, también debió empezar a disminuir el abundante aporte de NADH y de otros agentes reductores. Por ello, resultó imprescindible que las células desarrollaran un nuevo sistema de generar una fuente de poder reductor fuerte.

Los principales dadores disponibles de electrones fueron los ácidos orgánicos producidos por el metabolismo anaeróbico de los carbohidratos, algunas moléculas inorgánicas como el sulfuro de hidrógeno (H_2S) generadas geoquímicamente y el agua. Sin embargo, el poder reductor de estas moléculas resulta demasiado débil para poder ser utilizado en la fijación del CO_2. Probablemente, la utilización de un gradiente electroquímico de electrones a través de la membrana plasmática, para impulsar un *flujo inverso de electrones*, generó un suministro temprano de dadores fuertes de electrones. Este proceso requirió la evolución de complejos enzimáticos unidos a membrana semejantes a la NADH deshidrogenasa; mecanismos de este tipo sobreviven todavía en el metabolismo anaeróbico de algunas bacterias actuales (**Figura 14–69**).

Sin embargo, el principal avance en el metabolismo energético fue el desarrollo de centros de reacción fotoquímicos que pueden utilizar energía solar para producir directamente moléculas como el NADH. Se cree que esto sucedió hace más de 3×10^9 años, en el proceso de la evolución celular, en los organismos ancestrales de las bacterias verdes del azufre. Actualmente estas bacterias utilizan la energía solar para transferir átomos de hidrógeno (como un electrón más un protón) desde el H_2S al NADPH, de esta forma se genera el fuerte poder reductor necesario para la fijación del carbono (**Figura 14–70**). Como los electrones eliminados del H_2S se hallan a un potencial redox más negativo que el H_2O (–230 mV res-

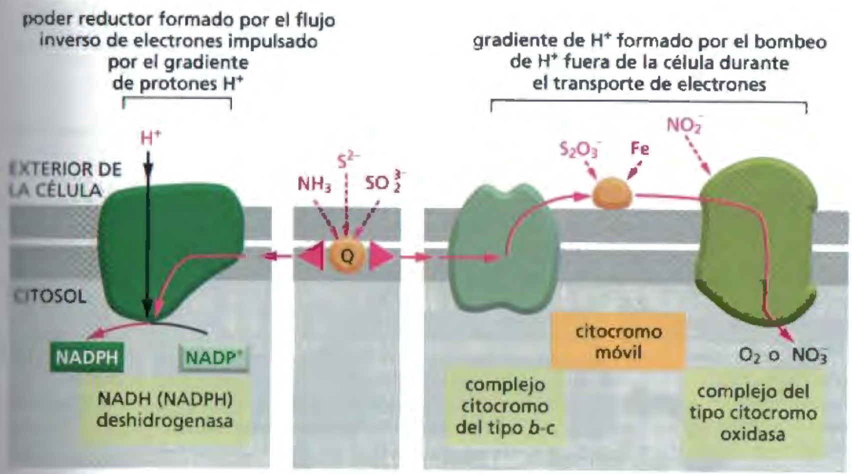


Figura 14–69 Algunas de las vías del transporte de electrones de las bacterias actuales. Algunas especies pueden crecer de forma anaeróbica utilizando nitratos como aceptor final de electrones en lugar de oxígeno. La mayoría de estas bacterias utilizan el ciclo de fijación del carbono y sintetizan sus moléculas orgánicas a partir de dióxido de carbono. Estas vías generan todo el ATP y el poder reductor que requieren para su crecimiento, a partir de la oxidación de moléculas inorgánicas, como hierro, amonio, nitritos y compuestos de azufre.

Obsérvese que el flujo de electrones en la cadena respiratoria, tanto si es directo como inverso, tiene lugar a partir de la quinona (Q). Como en la cadena respiratoria, el flujo inverso de electrones hace que se bombeen H^+ fuera de la célula, lo que da lugar a la formación del gradiente de protones que impulsa la producción de ATP mediante una ATP sintasa (no mostrada aquí). El NADPH necesario para la fijación del carbono se produce mediante un flujo inverso de electrones impulsado también por el gradiente de H^+, tal como se indica en la figura.

pecto a + 820 mV del H_2O), un cuanto de luz absorbida por el único fotosistema de esas bacterias es suficiente para conseguir un potencial redox lo bastante alto como para generar NADPH a través de una cadena de transporte de electrones fotosintética relativamente sencilla.

Las cadenas de transporte electrónico de las cianobacterias producen oxígeno atmosférico y permitieron nuevas formas de vida

Parece ser que el siguiente paso se produjo con el desarrollo de las cianobacterias, hace quizás unos 3×10^9 años. Consistió en la evolución de organismos capaces de utilizar agua como fuente de electrones para la reducción del CO_2. Este proceso implicó la evolución de una enzima hidrolizadora de la molécula de agua y también requirió un segundo fotosistema que actuara en serie con el primero haciendo de puente para salvar la enorme diferencia de potencial redox existente entre el H_2O y el NADPH. Las homologías estructurales que existen entre fotosistemas actuales sugieren que este cambio implicó la cooperación de un fotosistema derivado de las bacterias verdes (fotosistema I) con un fotosistema derivado de las bacterias púrpuras (fotosistema II). Las consecuencias biológicas de este paso evolutivo se manifestaron hace mucho tiempo. Al principio, había organismos cuyas demandas químicas a su medio ambiente eran mínimas, por lo que se extendían y evolucionaban por vías que no podían seguir las bacterias fotosintéticas primitivas, que necesitaban H_2S o ácidos orgánicos como fuentes de electrones. En consecuencia se acumularon grandes cantidades de materiales orgánicos reducidos, sintetizados biológicamente. Además, el oxígeno apareció en la atmósfera por primera vez.

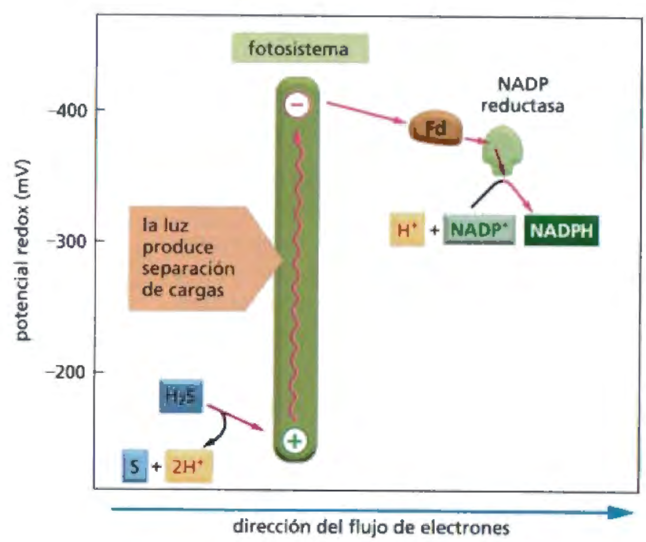


Figura 14–70 Flujo general de electrones en una forma relativamente primitiva de fotosíntesis observada en bacterias verdes del azufre actuales. El fotosistema de una bacteria verde se parece al fotosistema I de las plantas y de las cianobacterias en que utiliza series de centros ferrosulfurados como aceptores primarios de electrones, los cuales finalmente ceden sus electrones de alta energía a la ferrodoxina (Fd). Un ejemplo de una bacteria de este tipo es *Chlorobium tepidum*, que puede vivir perfectamente en aguas termales, a altas temperaturas y bajas intensidades de luz.

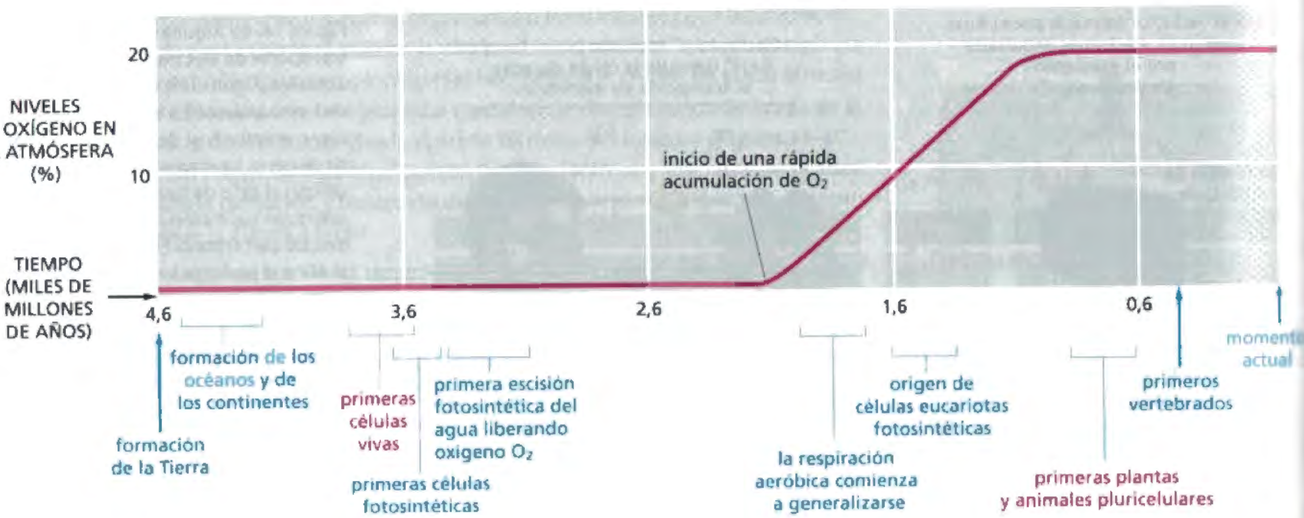


Figura 14–71 Algunos de los principales acontecimientos que se cree que ocurrieron durante la evolución de los organismos vivos sobre la Tierra. Con la evolución de los mecanismos de fotosíntesis basados en la membrana, los organismos pudieron producir sus propias moléculas orgánicas a partir de CO_2 gaseoso. Como se explica en el texto, se cree que el tiempo de más de 10^9 años, transcurrido entre la aparición de bacterias que escindían el agua y liberaban O_2 durante la fotosíntesis y la acumulación de altos niveles de O_2 en la atmósfera, fue debido a la reacción inicial del oxígeno con el abundante ion ferroso (Fe^{2+}) que estaba disuelto en los océanos primitivos. Únicamente cuando el hierro se agotó, el oxígeno pudo comenzar a acumularse. En respuesta al aumento del nivel de oxígeno en la atmósfera aparecieron los organismos no fotosintéticos utilizadores de oxígeno y fue cuando la concentración de oxígeno de la atmósfera se equilibró.

El oxígeno es muy tóxico porque las reacciones de oxidación que cataliza pueden alterar al azar moléculas biológicas. Por ejemplo, muchas bacterias anaeróbicas actuales mueren con rapidez cuando son expuestas al aire. Por lo tanto, los organismos de la Tierra primitiva tuvieron que desarrollar mecanismos de protección contra el incremento de los niveles de O_2 en el ambiente. Los organismos que aparecieron evolutivamente más tarde, como nosotros mismos, presentan numerosos mecanismos de destoxificación que protegen las células de los efectos adversos del oxígeno. A pesar de ello, se ha postulado que la acumulación de alteraciones oxidativas en nuestras macromoléculas pueda ser una causa importante del envejecimiento de los humanos, como hemos explicado previamente.

El incremento de los niveles del O_2 atmosférico fue inicialmente muy lento y permitió una evolución gradual de medidas protectoras. Por ejemplo, los mares primitivos tenían grandes cantidades de hierro ferroso (Fe^{2+}), y casi todo el oxígeno producido por las bacterias fotosintéticas primitivas pudo haber sido utilizado en transformar el Fe^{2+} en Fe^{3+}. Esta conversión causó la precipitación de enormes cantidades de óxidos férricos. Las extensas acumulaciones de formaciones de hierro en rocas sedimentarias, que aparecieron hace aproximadamente $2{,}7 \times 10^9$ de años, permiten datar el desarrollo evolutivo de las cianobacterias. Hace aproximadamente 2×10^9 años, el suministro de hierro ferroso se agotó y cesó la deposición de precipitaciones de hierro. Las evidencias geológicas sugieren que entonces empezaron a aumentar progresivamente los niveles de oxígeno en la atmósfera, alcanzando los niveles actuales hace entre 0,5 y $1{,}5 \times 10^9$ de años (**Figura 14–71**).

La disponibilidad de oxígeno hizo posible el desarrollo de bacterias que dependían del metabolismo aeróbico para producir ATP. Como hemos descrito, estos organismos pudieron utilizar la gran cantidad de energía liberada en la degradación de carbohidratos y de otras moléculas orgánicas reducidas hasta CO_2 y H_2O. Los componentes de los complejos de transporte electrónico preexistentes fueron modificados generándose una citocromo oxidasa, de forma que los electrones obtenidos a partir de sustratos orgánicos e inorgánicos pudieron ser transportados hasta el O_2 como aceptor final de electrones. Muchas bacterias púrpura fotosintéticas actuales pueden alternar entre la fotosíntesis y la respiración, según la disponibilidad de luz y de oxígeno, con sólo pequeñas reorganizaciones en sus cadenas de transporte de electrones.

Como resultado de la fotosíntesis, se acumularon materiales orgánicos en la Tierra, lo que provocó que algunas bacterias fotosintéticas (incluyendo las precursoras de *E. coli*) perdieran su capacidad de sobrevivir sólo de la energía de la luz y se volvieran por completo dependientes de la respiración. Como se ha descrito (véase Figura 14–58), se ha sugerido que las primeras mitocondrias surgieron hace más de $1{,}5 \times 10^9$ años, quizá cuando unas bacterias dependientes de la respiración se transformaron en endosimbiontes de células primitivas eucariotas. Posteriormente, los descendientes de estas células eucariotas aeróbicas primitivas endocitaron una bacteria fotosintética que se convirtió en el precursor de los cloroplastos.

En la **Figura 14–72** se representan las posibles vías de los diferentes tipos de bacterias descrita en este capítulo. La evolución siempre es conservativa, tomando partes antiguas y construyendo sobre ellas algo nuevo. Quizás por ello en las mitocondrias y en los cloroplas-

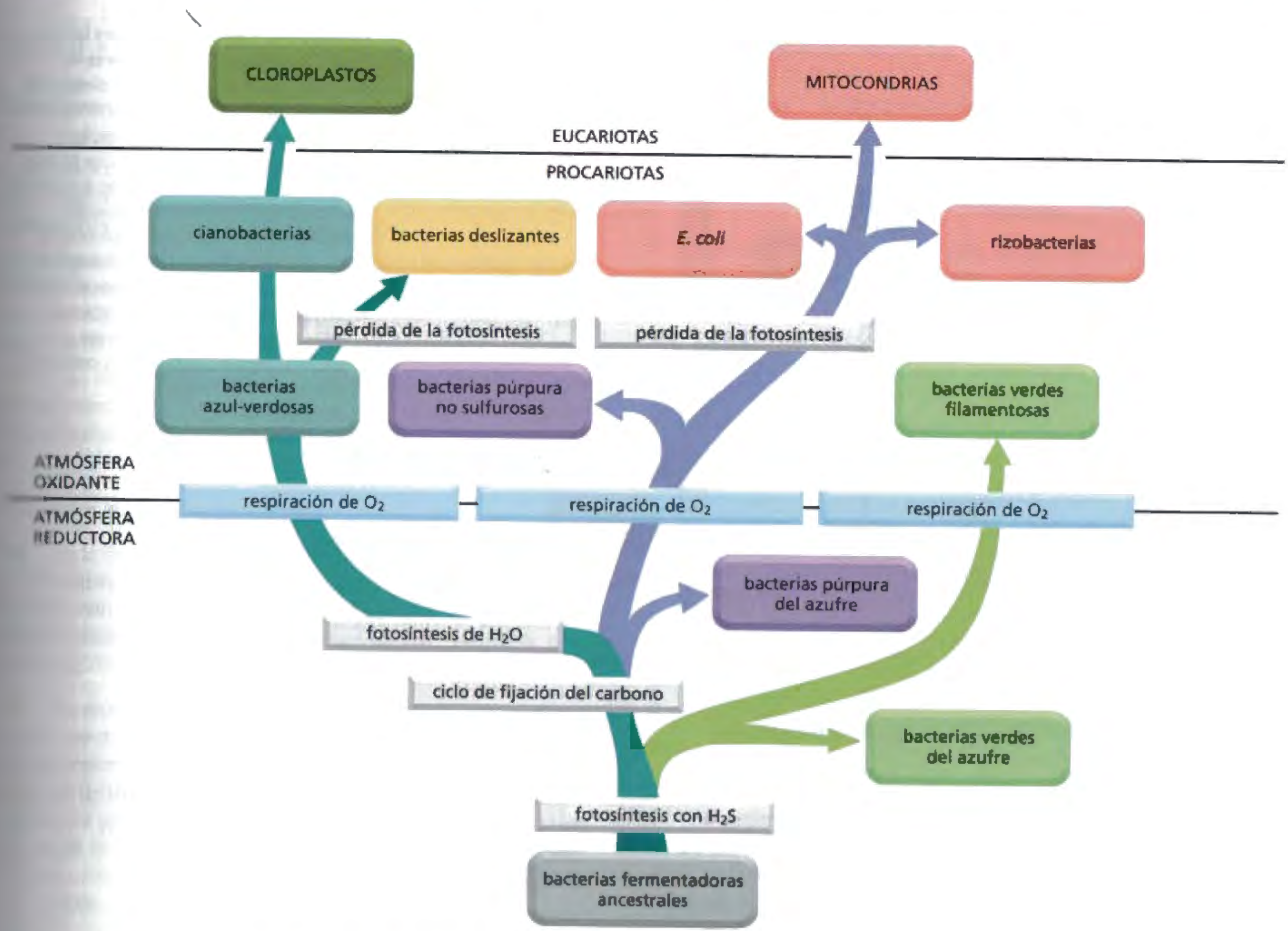


Figura 14–72 Árbol filogenético de la evolución propuesta de las mitocondrias y los cloroplastos y de sus ancestros bacterianos. Parece que la respiración de oxígeno comenzó su desarrollo hace 2×10^9 años. Como se indica, se cree que evolucionó de forma independiente en las líneas verdes, púrpura y azul-verdosas (cianobacterias) de bacterias fotosintéticas. Se especula que una bacteria púrpura aeróbica debió perder su capacidad para realizar la fotosíntesis y dio lugar a las mitocondrias, mientras que las cianobacterias dieron lugar a los cloroplastos. Los análisis detallados de secuencias de nucleótidos sugieren que las mitocondrias derivan de bacterias parecidas a las rhizobacterias, las agrobacterias y a las rickettsias –tres especies estrechamente relacionadas que generan asociaciones íntimas con las células eucariotas actuales. No se sabe si las arqueas tienen el tipo de fotosistema descrito en este capítulo, por lo que no se incluye aquí.

[illegible] de las células eucariotas superiores actuales todavía sobreviven, aunque en forma alterada, partes de la cadena de transporte electrónico de las bacterias anaeróbicas de hace más de 3-4 × 10^9 años. Considérese, por ejemplo la homología existente en la estructura y en la función entre un complejo enzimático que bombea protones en el segmento central de la cadena respiratoria mitocondrial (el complejo b-c_1) y los segmentos análogos de las cadenas de transporte electrónico de las bacterias y de los cloroplastos actuales (**Figura 14–73**).

Resumen

Al parecer las células primitivas fueron organismos similares a las bacterias actuales, que vivían en un medio rico en moléculas orgánicas muy reducidas que habían sido generadas a través de procesos geoquímicos, en el transcurso de cientos de millones de años. Probablemente estas células primitivas obtenían la mayor parte de su ATP mediante la transformación de estas moléculas orgánicas reducidas en diversos ácidos orgánicos, que eran excretados como productos de desecho. Así pues, estas fermentaciones acidificaron el medio, lo cual pudo haber sido la causa de la evolución de las primeras bombas de H^+ unidas a membrana, que permitieron mantener un pH neutro en el interior de la célula. Las propiedades de las bacterias actuales sugieren que en este ambiente anaeróbico aparecieron una bomba de H^+ impulsada por el transporte electrónico y una bomba de H^+ impulsada por ATP. La inversión del sentido del funcionamiento de la bomba de H^+ impulsada por ATP, pudo permitir que funcionase como una ATP sintasa. Al desarrollarse cadenas de transporte electrónico más efectivas, la energía liberada por las reacciones redox entre moléculas inorgánicas y/o la

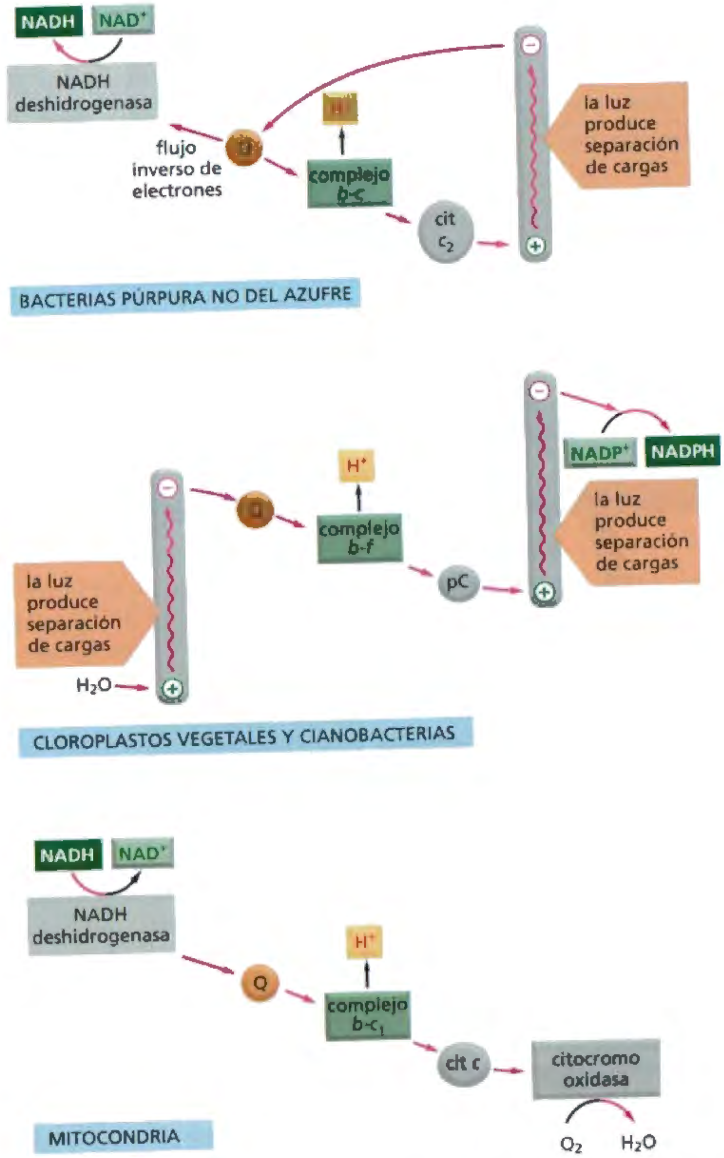


Figura 14–73 Comparación entre los tres tipos de cadenas transportadoras de electrones que se analizan con detalle en este capítulo. Las bacterias, los cloroplastos y las mitocondrias tienen un complejo enzimático unido a membrana que es muy semejante al complejo citocromo b-c_1 de las mitocondrias. Estos complejos captan electrones del transportador quinona (Q) y bombean H^+ a través de sus respectivas membranas. Además, en sistemas *in vitro* reconstruidos, los diferentes complejos pueden sustituirse uno por otro; las estructuras de sus componentes proteicos indican que están relacionados evolutivamente.

energía acumulada en compuestos no fermentables se pudo utilizar para producir un gran gradiente electroquímico de protones que permitió utilizar la bomba de H^+ impulsada por ATP para generar ATP.

La proliferación de bacterias que utilizaban moléculas orgánicas preformadas como fuente de carbono y de poder reductor, no pudo llegar muy lejos, ya que estas moléculas orgánicas eran generadas muy lentamente por los procesos geoquímicos. Por consiguiente, el agotamiento de los nutrientes orgánicos fermentables condicionó la evolución de las bacterias fotosintéticas, que podían utilizar CO_2 para producir carbohidratos. Combinando fragmentos de las cadenas de transporte electrónico desarrolladas con anterioridad, las bacterias fotosintéticas llegaron a desarrollar un fotosistema que utilizó la energía luminosa para generar el NADPH necesario para la fijación del carbono. La posterior aparición de cadenas fotosintéticas de transporte electrónico más complejas en las cianobacterias permitió que se pudiera utilizar el agua, en lugar de dadores de electrones menos abundantes y que eran utilizados por otras bacterias fotosintéticas, como dador de electrones para la formación del NADPH. De esta forma, la vida pudo proliferar en grandes áreas de la Tierra, por lo que se volvieron a acumular moléculas orgánicas reducidas.

Hace aproximadamente 2×10^9 años, el oxígeno liberado por la fotosíntesis de las cianobacterias empezó a acumularse en la atmósfera. Cuando tanto las moléculas orgánicas como el oxígeno llegaron a ser abundantes, las cadenas de transporte electrónico se adaptaron a transportar electrones desde el NADH hasta el oxígeno y en muchas bacterias se desarrolló un metabolismo aeróbico eficiente. En las mitocondrias de los organismos eucariotas se presentan estos mismos mecanismos aeróbicos y existen considerables evidencias de que tanto las mitocondrias como los cloroplastos evolucionaron a partir de bacterias aeróbicas.

PROBLEMAS

¿Qué afirmaciones son ciertas? Explicar por qué sí o por qué no

14–1 Los tres complejos enzimáticos respiratorios de la membrana mitocondrial interna están presentes en un despliegue estructuralmente ordenado que facilita la transferencia correcta de los electrones entre los complejos adecuados.

14–2 Los ácidos débiles lipofílicos cortocircuitan el flujo normal de los protones a través de la membrana mitocondrial interna, eliminando de ese modo la fuerza protón-motriz, deteniendo la síntesis de ATP y bloqueando el flujo de los electrones.

14–3 Las mutaciones que se heredan según las leyes mendelianas afectan a los genes nucleares; las que transgreden las leyes mendelianas es probable que afecten a genes de orgánulos.

Resolver los siguientes problemas

14–4 En la década de 1860, Louis Pasteur observó que, al añadir O_2 a un cultivo de levaduras que crecían de forma anaeróbica en un medio con glucosa, la tasa de consumo de dicha glucosa disminuía drásticamente. Explica las bases de este resultado, también conocido con el nombre de efecto Pasteur.

14–5 En mitocondrias hepáticas que respiran activamente, el pH en la matriz es casi media unidad de pH mayor que el del citosol. Asumiendo que el citosol tiene pH 7 y que la matriz es una esfera con un diámetro de 1 μm [$V = (4/3)\pi r^3$], calcular el número de protones presentes en la matriz de una mitocondria que esté respirando. Si la matriz alcanzase un pH de 7 (igual al del citosol), ¿cuántos protones deberían bombearse al exterior para establecer un pH de 7,5 (una diferencia de 0,5 unidades de pH)?

14–6 El músculo cardiaco obtiene la mayor parte del ATP que necesita para sostener sus continuas contracciones gracias a la fosforilación oxidativa. Cuando la glucosa se oxida hasta CO_2, el músculo cardiaco consume O_2 a una tasa de 10 μmol/min por g de tejido, con el fin de reemplazar el ATP utilizado en la contracción y alcanzar una concentración estacionaria de ATP de 5 μmol/g de tejido. A esta velocidad, ¿cuántos segundos tardará el corazón en consumir una cantidad de ATP equivalente a su nivel estacionario? (La oxidación completa de una molécula de glucosa hasta CO_2 produce 30 ATP, 26 de los cuales derivan de la fosforilación oxidativa, utilizando los 12 pares de electrones captados en forma de los transportadores de electrones NADH y $FADH_2$.)

14–7 Si se incuban mitocondrias aisladas en presencia de una fuente de electrones como el succinato, pero en ausencia de oxígeno, los electrones entran en la cadena respiratoria, reduciendo los diferentes transportadores de electrones de manera casi completa. Cuando, a continuación, introducimos oxígeno, los transportadores se oxidan a diferentes tasas (**Figura P14–1**) ¿De qué manera estos resultados permiten ordenar a los transportadores de electrones de la cadena respiratoria? ¿Cuál es este orden?

14–8 El desacoplador dinitrofenol fue, en su momento, recetado como un fármaco que ayudaba a perder peso. ¿De qué manera un agente desacoplador de la fosforilación oxidativa puede promover la pérdida de peso? ¿Por qué ya no se receta?

14–9 ¿Cuánta energía está disponible en la luz visible? ¿Cuánta energía suministra el Sol a la Tierra? ¿Cuán eficientes son las plantas a la hora de convertir la energía lumínica en energía química? Las respuestas a estas preguntas proporcionan un importante telón de fondo para el tema de la fotosíntesis.

Cada cuanto o fotón de luz tiene una energía $h\nu$, donde h es la constante de Planck ($1{,}58 \times 10^{-37}$ kcal seg/fotón) y ν es la frecuencia en seg^{-1}. La frecuencia de la luz es igual a c/λ, donde c es la velocidad de la luz ($3{,}0 \times 10^{17}$ nm/seg) y λ es la longitud de onda en nm. Por lo tanto, la energía (E) de un fotón es:

$$E = h\nu = hc/\lambda$$

A. Calcular la energía de un mol de fotones (6×10^{23} fotones/mol) de 400 nm (luz violeta), de 680 nm (luz roja) y de 800 nm (luz infrarroja).

B. La luz solar incide sobre la Tierra a una velocidad de unas 0,3 kcal/seg por metro cuadrado. Asumiendo, para hacer este cálculo, que la luz solar sea en una luz monocromática de 680 nm de longitud de onda, ¿cuántos segundos tardaría un mol de fotones en irradiar un metro cuadrado?

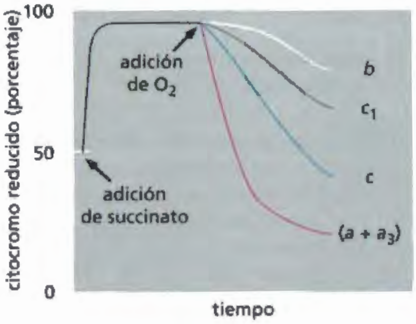


Figura P14–1 Análisis espectrofotométrico rápido de las velocidades de oxidación de los transportadores de electrones de la cadena respiratoria (Problema 14–7). Los citocromos a y a_3 no pueden distinguirse, por lo que aparecen indicados como citocromo ($a + a_3$).

C. Admitiendo que se necesitan ocho fotones para fijar una molécula de CO_2 en forma de carbohidrato bajo unas condiciones óptimas (el valor habitualmente aceptado es de 8-10 fotones), calcular cuánto tiempo le costaría a una tomatera con un superficie foliar de 1 metro cuadrado, sintetizar un mol de glucosa a partir de CO_2. Suponer que los fotones inciden sobre la hoja a la tasa calculada anteriormente y, asimismo, que todos los fotones son absorbidos y utilizados para fijar el CO_2.

D. Si se necesitan 112 kcal/mol para fijar un mol de CO_2 en forma de carbohidrato, ¿cuál es la eficiencia de la conversión de la energía lumínica en energía química tras la captura del fotón? Supón nuevamente que se necesitan 8 fotones de luz roja (680 nm) para fijar una molécula de CO_2.

14–10 Recordando el famoso experimento de Joseph Priestley, en el que una rama de menta salvaba la vida a un ratón dentro de una cámara cerrada, hacer un experimento análogo para ver qué hacen una planta C_3 y otra C_4 cuando se confinan juntas en un ambiente cerrado. Colocar una planta de maíz (C_4) y un geranio (C_3) en una cámara de plástico cerrada herméticamente con aire normal (300 partes por millón de CO_2) cerca de una ventana del laboratorio. ¿Qué les sucederá a las dos plantas? ¿Competirán o colaborarán? Y si compiten, ¿cuál de ellas ganará y por qué?

14–11 Examinar la hoja variegada de la **Figura P14–2**. Las áreas oscuras son verdes y las claras son amarillas. Es frecuente encontrar áreas amarillas rodeadas de otras verdes, pero no hay áreas verdes rodeadas por otras amarillas. Proponer una explicación.



Figura P14–2 Una hoja variegada de *Aucuba japonica* con áreas verdes (oscuras) y amarillas (claras) (Problema 14–11).

BIBLIOGRAFÍA

General

Cramer WA & Knaff DB (1990) Energy Transduction in Biological Membranes: A Textbook of Bioenergetics. New York: Springer-Verlag.

Mathews CK, van Holde KE & Ahern K-G (2000) Biochemistry, 3.ª ed. San Francisco: Benjamin Cummings.

Nicholls DG & Ferguson SJ (2002) Bioenergetics, 3.ª ed. London: Academic Press.

La mitocondria

Abrahams JP, Leslie AG, Lutter R & Walker JE (1994) Structure at 2.8Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370:621–628.

Berg HC (2003) The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem* 72:19-54.

Boyer PD (1997) The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* 66:717–749.

Ernster L & Schatz G (1981) Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol* 91:227s–255s.

Frey TG, Renken CW & Perkins GA (2002) Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim Biophys Acta* 1555:196–203.

Pebay-Peyroula E & Brandolin G (2004) Nucleotide exchange in mito-chondria: insight at a molecular level. *Curr Opin Struct Biol* 14:420–425.

Meier T, Polzer P, Diederichs K et al (2005) Structure of the rotor ring of F-type Na^+-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*. *Science* 308:659–662.

Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191:144–148.

Nicholls DG (2006) The physiological regulation of uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta* 1757:459–466.

Racker E & Stoeckenius W (1974) Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation. *J Biol Chem* 249:662–663.

Saraste M (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283:1488–1493.

Scheffler IE (1999) Mitochondria. New York/Chichester: Wiley-Liss.

Stock D, Gibbons C, Arechaga I et al. (2000) The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr Opin Struct Biol* 10:672–679.

Weber J (2007) ATP synthase—the structure of the stator stalk. *Trends Biochem Sci* 32:53–56.

Las cadenas de transporte de electrones y sus bombas de protones

Beinert H, Holm RH & Munck E (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277:653–659.

Berry EA, Guergova-Kuras M, Huang LS & Crofts AR (2000) Structure and function of cytochrome *bc* complexes. *Annu Rev Biochem* 69:1005–1075.

Brand MD (2005) The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Biochem Soc Trans* 33:897–904.

Brandt U (2006) Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annu Rev Biochem* 75:69–92.

Chance B & Williams GR (1955) A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature* 176:250–254.

Gottschalk G (1997) Bacterial Metabolism, 2.ª ed. New York: Springer.

Gray HB & Winkler JR (1996) Electron transfer in proteins. *Annu Rev Biochem* 65:537–556.

Keilin D (1966) The History of Cell Respiration and Cytochromes. Cambridge: Cambridge University Press.

Sazanov LA (2007) Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry* 46:2275–2288.

Subramaniam S & Henderson R (2000) Molecular mechanism of vectorial proton translocation by bacteriorhodopsin. *Nature* 406:653–657.

Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E et al (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8Å. *Science* 272:1136–1144.

Wikstrom M & Verkhovsky MI (2006) Towards the mechanism of proton pumping by the haem-copper oxidases. *Biochim Biophys Acta* 1757:1047–1051.

Cloroplastos y fotosíntesis

Blankenship RE (2002) Molecular Mechanisms of Photosynthesis. Oxford, UK:Blackwell Scientific.

Bassham JA (1962) The path of carbon in photosynthesis. *Sci Am* 206:88–100.

Deisenhofer J & Michel H (1989) Nobel lecture. The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodopseudomonas viridis*. *EMBO J* 8:2149–2170.

Edwards GE, Furbank RT, Hatch MD & Osmond CB (2001) What does it take to be c(4)?—lessons from the evolution of c(4) photosynthesis. *Plant Physiol* 125:46–49.

Ferreira KN, Iverson TM, Maghlaoui K et al (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* 303:1831–1838.

Iwata S & Barber J (2004) Structure of photosystem II and molecular architecture of the oxygen-evolving centre. *Curr Opin Struct Biol* 14:447–453.

Jordan P, Fromme P, Witt HT et al (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5Å resolution. *Nature* 411:909–917.

Merchant S & Sawaya MR (2005) The light reactions: A guide to recent acquisitions for the picture gallery. *The Plant Cell* 17:648–663.

Nelson N & Ben-Shem A (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5:971–982.

Sistemas genéticos de mitocondrias y plastidios

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG et al (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457–465.

Balaban RS, Nemoto S & Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120:483–495.

Bendich AJ (2004) Circular chloroplast genomes:The grand illusion. *The Plant Cell* 16:1661–1666.

Birky CW, Jr (1995) Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11331–1133[illegible].

Bullerwell CE & Gray MW (2004) Evolution of the mitochondrial genome: protist connections to animals, fungi and plants. *Curr Opin Microbiol* 7:528–534.

Cavalier-Smith T (2002) Chloroplast evolution: secondary symbiogenesis and multiple losses. *Curr Biol* 12:R62–R64.

Chen XJ & Butow RA (2005) The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nature Rev Genet* 6:815–825.

Clayton DA (2000) Vertebrate mitochondrial DNA—a circle of surprises. *Exp Cell Res* 255:4–9.

Daly DO & Whelan J (2005) Why genes persist in organelle genomes. *Genome Biol* 6:110.

de Duve C (2007) The origin of eukaryotes: A reappraisal. *Nature Rev Genet* 8:395–403.

Dyall SD, Brown MT & Johnson PJ (2004) Ancient invasions: From endosymbionts to organelles. *Science* 304:253–257.

Hoppins S, Lackner L & Nunnari J (2007) The Machines that Divide and Fuse Mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76:751–80.

Wallace DC (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283:1482–1488.

La evolución de las cadenas de transporte de electrones

Blankenship RE & Bauer CE (eds) (1995) Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Dordrecht: Kluwer.

de Las Rivas J, Balsera M & Barber J (2004) Evolution of oxygenic photosynthesis: genome-wide analysis of the OEC extrinsic proteins. *Trends Plant Sci* 9:18–25.

Orgel LE (1998) The origin of life—a review of facts and speculations. *Trends Biochem Sci.* 23:491–495.

Schafer G, Purschke W & Schmidt CL (1996) On the origin of respiration: electron transport proteins from archaea to man. *FEMS Microbiol Rev* 18:173–188.

Skulachev VP (1994) Bioenergetics: the evolution of molecular mechanisms and the development of bioenergetic concepts. *Antonie Van Leeuwenhoek* 65:271–284.

Mecanismos de comunicación celular

15

Para formar un organismo pluricelular las células tienen que comunicarse, tal como se comunican los humanos si se tienen que organizar formando sociedades complejas. Y también como en los humanos en los que las comunicaciones suponen algo más que la simple transmisión de ruidos desde la boca a los oídos, la comunicación de célula a célula supone algo más que la transmisión de señales químicas a través del espacio comprendido entre una célula y otra. Son necesarios complejos mecanismos intracelulares para controlar qué señales se emiten en qué momento, y para permitir que la célula receptora de la señal interprete estas señales y las utilice para guiar su comportamiento. De acuerdo con el registro fósil, los organismos pluricelulares no aparecieron en la Tierra hasta unos 2,5 mil millones de años después de la aparición de los organismos unicelulares parecidos a los procariotas actuales. Este largo retraso puede reflejar la dificultad de la evolución de los sistemas de comunicación entre las células animales, las células vegetales y los hongos –la maquinaria que les permitiría a las células que compartían el mismo genoma colaborar y coordinar el comportamiento y especializarse para subordinar sus posibilidades individuales de supervivencia en interés del organismo pluricelular como un todo. Estos mecanismos de comunicación célula-célula tan sofisticados constituyen el objeto de este capítulo.

La comunicación entre las células está mediada fundamentalmente por **moléculas señal extracelulares**. Algunas de ellas trabajan a largas distancias, señalizando células muy lejanas. Otras sólo señalizan las células inmediatamente vecinas. La mayoría de las células de los organismos pluricelulares tanto emiten como reciben señales. La recepción de las señales depende de *proteínas receptoras* situadas casi siempre en la superficie celular, que se unen a la molécula señal. La unión activa el receptor el cual, a su vez, activa una o más *vías intracelulares de señalización*. Estas cadenas de liberación de moléculas –principalmente *proteínas señal intracelulares*– procesan la señal dentro de la célula receptora y la distribuyen a las dianas intracelulares adecuadas. Por lo general, estas dianas son proteínas efectoras que se alteran cuando se activa la vía de señalización y provocan un cambio apropiado del comportamiento celular. En función de la señal y de la naturaleza y del estado de la célula receptora, estos efectores pueden ser proteínas reguladoras de genes, canales iónicos, componentes de una vía metabólica, partes del citoesqueleto u otras formaciones celulares (**Figura 15-1**).

En este capítulo, se describirán en primer lugar los principios generales de la comunicación celular. A continuación, se examinarán las principales familias de proteínas receptoras de superficie celular y las principales cascadas de señalización intracelular que activan. Aunque el capítulo se centra sobre todo en las células animales, finalizaremos considerando las características especiales de la comunicación celular en plantas.

En este capítulo

PRINCIPIOS GENERALES DE LA COMUNICACIÓN CELULAR 879

SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DE RECEPTORES DE SUPERFICIE CELULAR ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCR) Y MEDIADORES INTRACELULARES PEQUEÑOS 904

SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DE RECEPTORES DE SUPERFICIE CELULAR ACOPLADOS A ENZIMAS 922

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTES DE PROTEOLISIS REGULADA POR PROTEÍNAS LATENTES REGULADORAS DE GENES 946

SEÑALIZACIÓN EN PLANTAS 955

PRINCIPIOS GENERALES DE LA COMUNICACIÓN CELULAR

Mucho antes de que los organismos pluricelulares aparecieran sobre la Tierra, los organismos unicelulares ya habían desarrollado mecanismos que les permitían responder a cambios químicos o físicos de su entorno. Casi con toda seguridad, estos mecanismos también les permitían responder a la presencia de otras células. Algunas evidencias de ello proceden de estudios realizados en organismos unicelulares actuales como las bacterias o las levaduras. A pesar de que estas células llevan una vida fundamentalmente independiente, pueden comunicarse entre sí y cada una de ellas puede influir en el comportamiento de otras célu-

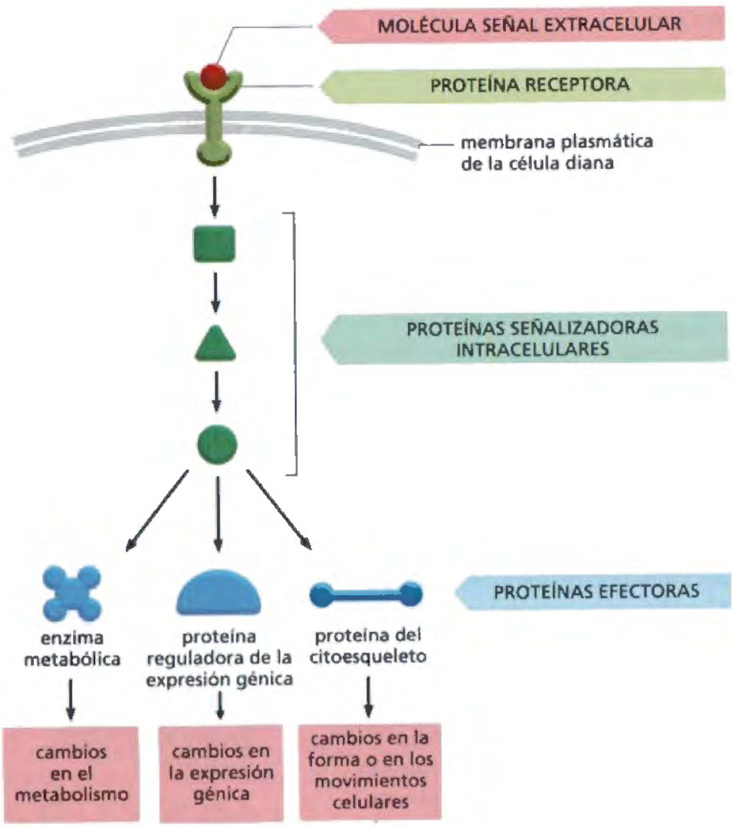


Figura 15–1 Una vía sencilla de señalización intracelular activada por una molécula señal extracelular. La molécula señal normalmente se une a una proteína receptora situada en la superficie celular de la célula diana y activa una o más vías de señalización intracelular mediada por una serie de proteínas señalizadoras. Por último, una o más de estas proteínas intracelulares de señalización modifican la actividad de las proteínas efectoras y de este modo el comportamiento de la célula.

las. Por ejemplo, muchas bacterias responden a señales químicas secretadas por sus vecinas y que aumentan de concentración cuando aumenta la densidad de la población. Este proceso, denominado *detección de quórum* permite a la bacteria coordinar su comportamiento, incluyendo su motilidad, la producción de antibióticos, la formación de esporas y la conjugación sexual.

De forma similar, las células de levadura se comunican entre sí en preparación para el acoplamiento sexual. La levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* proporciona un ejemplo bien estudiado: cuando un individuo haploide está preparado para el acoplamiento, segrega un péptido denominado *factor de acoplamiento* que constituye una señal para que las células cuyo tipo de acoplamiento es el contrario dejen de proliferar y se preparen para el acoplamiento (**Figura 15–2**). La posterior fusión de dos células haploides de tipo de acoplamiento contrario produce una célula diploide, la cual entonces puede sufrir meiosis y esporular, generando células haploides con una nueva dotación de genes (véase Figura 21–3B). El mezclado de los genes través de la reproducción sexual ayuda a las especies a poder sobrevivir en un ambiente que varía de forma impredecible (como se describe en el Capítulo 21).

Estudios sobre levaduras mutantes que son incapaces de acoplarse han permitido identificar muchas proteínas que son necesarias para este proceso de señalización. Estas proteínas forman una red de señalización que incluye receptores de superficie celular, proteínas de unión a GTP y proteínas quinasa, cada una de las cuales tiene parientes cercanos entre las proteínas receptoras y las proteína intracelulares que participan en la señalización de las células animales. Sin embargo, a través de la duplicación génica y de la divergencia, los sistemas de señalización de los animales han llegado a ser mucho más elaborados que los de las levaduras; por ejemplo, el genoma humano tiene más de 1500 genes que codifican proteínas receptoras y el número de proteínas receptoras diferentes es todavía mayor debido a la maduración alternativa del RNA y a modificaciones postraduccionales.

El gran número de proteínas señal, de receptores y de proteínas señal intracelulares utilizadas por los animales se pueden agrupar en un número mucho menor de familias de proteínas, la mayoría de las cuales han sido muy conservadas durante la evolución. Las moscas, los gusanos y los mamíferos utilizan maquinarias de comunicación celular que son esencialmente idénticas, y muchos de los componentes clave y vías de señalización se descubrieron a través de análisis mutacionales en *Drosophila* y en *C. elegans*.

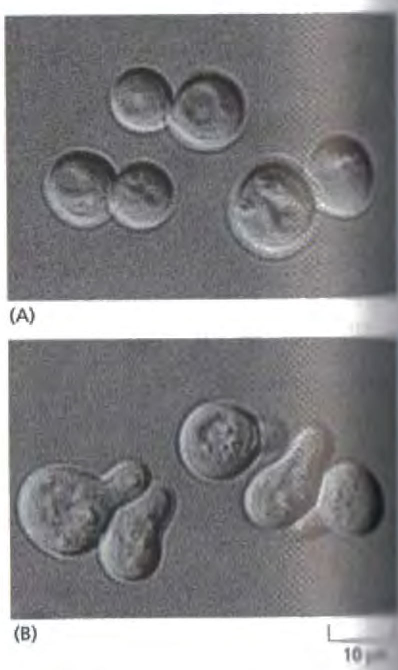


Figura 15–2 Las células de levadura responden a un factor de acoplamiento. (A) Por lo general, las células de levadura son esféricas (B), pero en respuesta al factor de acoplamiento secretado por células de levadura vecinas, emiten una protuberancia hacia la fuente del factor en preparación para el acoplamiento. (Cortesía de Michael Snyder.)

Las moléculas señal extracelulares se unen a receptores específicos

Las células de los animales pluricelulares se comunican mediante centenares de tipos de moléculas señal, incluyendo proteínas, pequeños péptidos, aminoácidos, nucleótidos, esteroides, retinoides, derivados de ácidos grasos, e incluso gases disueltos como el óxido nítrico y el monóxido de carbono. La mayoría de estas moléculas señal son liberadas por las células señalizadoras al espacio extracelular mediante exocitosis (se describe en el Capítulo 13). Otras se liberan por difusión a través de la membrana plasmática, y otras quedan expuestas al espacio extracelular mientras permanecen fuertemente unidas a la superficie de la célula señalizadora y sólo constituyen una señal para las otras células cuando entran en contacto con ellas. Las proteínas transmembrana pueden actuar como señalizadoras de esta forma o sus dominios extracelulares pueden ser liberados de la superficie celular mediante rotura proteolítica y, así, actuar a distancia.

Sea cual sea la naturaleza de la molécula señal, la *célula diana* responde mediante un **receptor**, que se une específicamente a la molécula señal y entonces inicia una respuesta en la célula diana. Muchas de las moléculas señal extracelulares actúan a concentraciones muy bajas (típicamente $\leq 10^{-8}$ M), y los receptores que las reconocen se unen a ellas por lo general con una elevada afinidad (constante de afinidad $K_a \geq 10^8$ litros/mol; véase la Figura 3–43).

En la mayoría de los casos, los receptores son proteínas transmembrana de la superficie de las células diana. Cuando estas proteínas se unen a una molécula señal extracelular (un *ligando*), se activan y generan varias señales intracelulares que alteran el comportamiento de la célula. En otros casos, los receptores están situados en el interior de la célula diana y la molécula señal tiene que entrar en la célula para activarlos: estas moléculas señal, por lo tanto, deben ser lo bastante pequeñas e hidrofóbicas para poder difundir a través de la membrana plasmática (**Figura 15–3**).

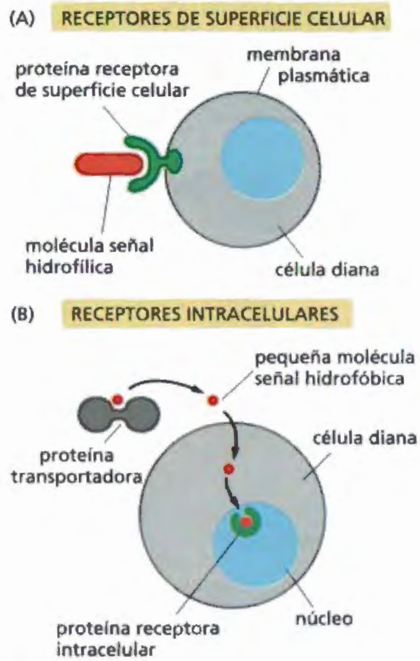


Figura 15–3 Las moléculas señal extracelulares se unen a receptores de la superficie celular o a receptores intracelulares. (A) La mayoría de las moléculas señalizadoras son hidrofílicas y, por tanto, incapaces de atravesar directamente la membrana plasmática de la célula diana; por ello, se unen a receptores de la superficie celular que, a su vez, generan señales en el interior de la célula diana (véase la Figura 15–1). (B) Por el contrario, algunas moléculas señal pequeñas difunden a través de la membrana plasmática y se unen a proteínas receptoras situadas en el interior de la célula diana –en el citosol o en el núcleo (como se muestra en la ilustración). Muchas de estas moléculas señal pequeñas son hidrofóbicas y casi insolubles en soluciones acuosas; por ello, son transportadas a través del torrente sanguíneo y de otros fluidos extracelulares, unidas a proteínas transportadoras, de las que tienen que disociarse antes de entrar en la célula diana.

Las moléculas señal extracelulares pueden actuar a corta o a larga distancia

Muchas moléculas señal permanecen unidas a la superficie de la célula señalizadora, influyendo sólo en las células con las que entran en contacto (**Figura 15–4**A). Esta **señalización dependiente de contacto** es en especial importante durante el desarrollo y en respuestas inmunes. Durante el desarrollo, la señalización dependiente de contacto puede actuar a distancias relativamente grandes, cuando las células que se comunican emiten largos brazos para entrar en contacto entre sí.

Sin embargo, en la mayoría de casos las células señal secretan moléculas señal al fluido extracelular. Las moléculas secretadas pueden ser transportadas a largas distancias y actuar sobre células diana muy alejadas, o pueden actuar como **mediadores locales** afectando únicamente a células del ambiente inmediato a la célula señal. Este último proceso se denomina **señalización paracrina** (Figura 15–4B). Habitualmente en la señalización paracrina la célula señalizadora y la célula diana son tipos celulares diferentes, pero las células también pueden producir señales a las que responden ellas mismas. A este tipo de señalización se le denomina *señalización autocrina*. Por ejemplo, las células cancerosas utilizan a menudo este tipo de estrategia para estimular su propia supervivencia y proliferación.

Para que las señales paracrinas sólo actúen de forma local es necesario que las moléculas señal secretadas no puedan difundir muy lejos; por esta razón por lo general son captadas rápidamente por las células diana vecinas, destruidas por enzimas extracelulares o inmovilizadas por la matriz extracelular. Los *proteoglucanos heparán sulfato* (se tratan en el Capítulo 19), tanto de la matriz extracelular como los unidos a las superficies celulares, a menudo participan en la localización de la acción de proteínas señal secretadas. Tienen largas cadenas laterales de polisacáridos que unen proteínas señal y las inmovilizan. También pueden controlar la estabilidad de estas proteínas, su transporte a través del espacio extracelular o su interacción con los receptores de superficie celular. También existen proteínas antagonistas secretadas, que modifican la distancia a la que actúa una señal paracrina. Estos antagonistas se unen a la molécula señal o a su receptor de la superficie celular bloqueando su actividad; este hecho desempeña un papel importante en la restricción del rango de eficiencia de una proteína señal secretada que influencia las decisiones de desarrollo que generan las células embrionarias (se describe en el Capítulo 22).

Los organismos pluricelulares, grandes y complejos, necesitan mecanismos de señalización de largo alcance para coordinar el comportamiento de sus células en zonas remotas

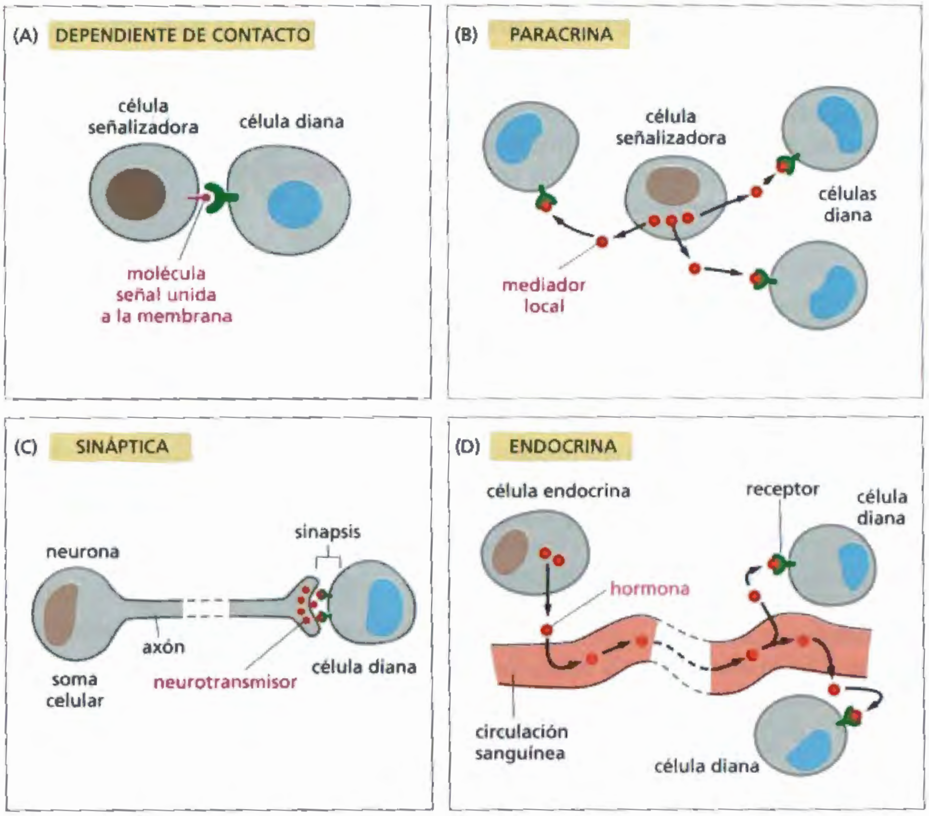


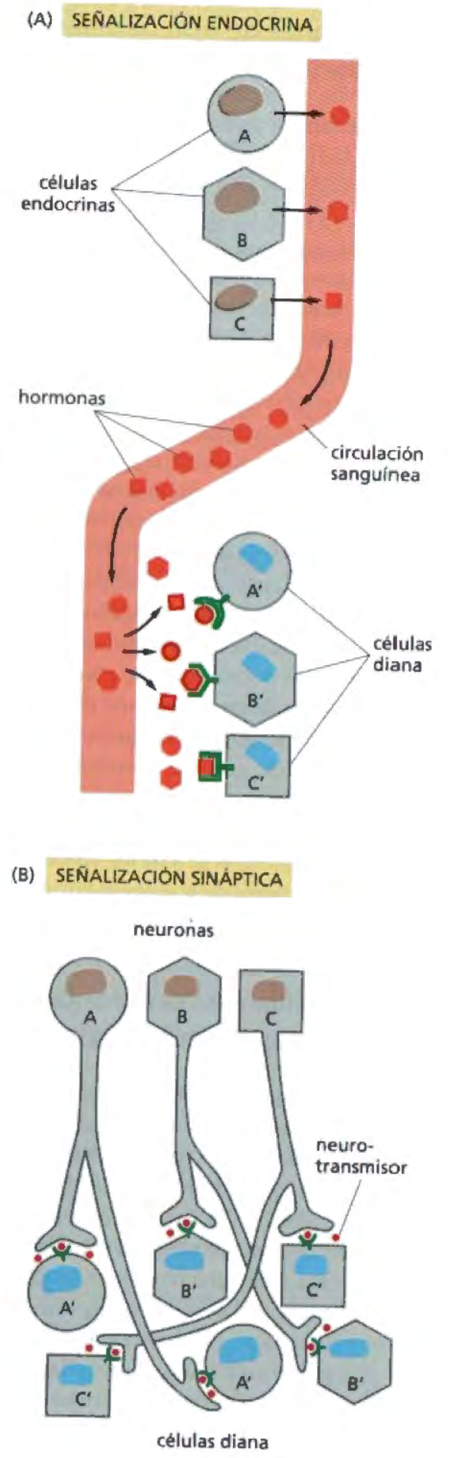
Figura 15–4 Cuatro formas de señalización intercelular. (A) La señalización dependiente de contacto requiere que las células estén en contacto directo a través de sus membranas. (B) La señalización paracrina se basa en señales liberadas por las células al medio extracelular y que actúan de forma local sobre células vecinas. (C) La señalización sináptica la realizan neuronas que transmiten señales eléctricas a lo largo de sus axones y liberan neurotransmisores en las sinapsis, las cuales pueden estar muy alejadas del soma celular. (D) La señalización endocrina se basa en células endocrinas, que secretan hormonas al torrente sanguíneo desde donde son distribuidas por todo el organismo. En las señalizaciones paracrina, sináptica y endocrina se utilizan muchos de los mismos tipos de moléculas señalizadoras. Las diferencias cruciales radican en la velocidad y en la selectividad con que las señales son liberadas a sus dianas.

de su cuerpo. Por ello han desarrollado tipos celulares especializados en la comunicación intercelular a larga distancia. Los más sofisticados de ellos son las células nerviosas, o neuronas, que típicamente extienden largas prolongaciones (axones) que les permiten entrar en contacto con las células diana aunque estén situadas muy lejos. En estos lugares de contacto, las prolongaciones forman unas estructuras especializadas en la transmisión de señales denominadas *sinapsis químicas*. Cuando se activan por estímulos procedentes del ambiente o de otras células nerviosas, las neuronas envían impulsos eléctricos (potenciales de acción) que avanzan con rapidez por el axón; cuando un impulso de este tipo llega a una sinapsis, al final del axón, provoca la secreción de una señal química que actúa como un **neurotransmisor**. La estructura organizada de forma tan compacta de una sinapsis asegura que el neurotransmisor sea liberado específicamente a los receptores de la célula diana postsináptica (Figura 15–4C). Este proceso de **señalización sináptica** se trata en detalle en el Capítulo 11.

Una estrategia bastante diferente de señalización a larga distancia utiliza las **células endocrinas**. Estas células secretan sus moléculas señal, denominadas **hormonas**, al torrente sanguíneo, que las transporta a largas distancias y las distribuye por todo el cuerpo, permitiendo que actúen sobre células diana que pueden encontrarse en cualquier lugar del organismo (Figura 15–4D).

En la **Figura 15–5** se comparan los mecanismos que permiten a las células endocrinas y a las células nerviosas coordinar a largas distancias el comportamiento celular en los animales. Dado que la señalización endocrina depende de la difusión y del flujo sanguíneo, es relativamente lenta. Por el contrario, la señalización sináptica es mucho más rápida y también mucho más precisa. Las células nerviosas pueden transmitir información a grandes distancias mediante impulsos eléctricos que viajan a velocidades de hasta 100 metros por segundo; una vez liberado por una terminación nerviosa, un neurotransmisor difunde no más de 100 nm hasta la célula diana, un proceso que dura menos de un milisegundo. Otra diferencia entre la señalización endocrina y la sináptica es que, mientras que las hormonas se diluyen enormemente en la sangre circulante y en el líquido intersticial, por lo que tienen que poder actuar a concentraciones muy bajas (de forma característica $< 10^{-8}$ M), los neurotransmisores se diluyen mucho menos y alcanzan concentraciones locales altas. Por ejemplo, la concentración del neurotransmisor *acetilcolina* en la hendidura sináptica de una unión neuromuscular activa es de alrededor de 5×10^{-4} M. Por lo tanto, en la señalización sináptica los receptores de los neurotransmisores tienen una afinidad relativamente baja por sus ligandos, lo que significa que el neurotransmisor puede disociarse rápido del receptor y facilitar que la

Figura 15-5 Contraste entre la señalización endocrina y las estrategias neuronales para un amplio rango de señalización. En animales complejos, las células endocrinas y las células nerviosas actúan conjuntamente coordinando las actividades de células de diversas partes del cuerpo. Mientras que diferentes células endocrinas tienen que utilizar diferentes hormonas para comunicarse de forma específica con sus células diana, diferentes células nerviosas pueden utilizar el mismo neurotransmisor y a pesar de ello, comunicarse también de este modo. (A) Las células endocrinas secretan hormonas a la circulación y sólo actúan en aquellas células diana que tienen los receptores apropiados: los receptores se unen específicamente a la hormona, que será así "atrapada" por las células desde el líquido extracelular. (B) En la señalización sináptica, por el contrario, la especificidad reside en los contactos entre la célula nerviosa y las células diana específicas que señaliza. <CTGA> Generalmente, sólo está expuesta al neurotransmisor liberado por la terminación nerviosa la célula diana que se halla en contacto sináptico con la célula nerviosa (aunque algunos neurotransmisores actúan de una manera paracrina como mediadores locales que influencian muchas células diana en un área).



respuesta termine. Además, los neurotransmisores son retirados con rapidez de la hendidura sináptica, tanto por enzimas hidrolíticas específicas que lo destruyen como por proteínas de membrana específicas que transportan el neurotransmisor, bombeándolo de nuevo hacia la terminación nerviosa o hacia las células gliales vecinas. Así pues, la señalización sináptica es mucho más precisa que la señalización endocrina, tanto en tiempo como en espacio.

La velocidad de respuesta a una señal extracelular depende no sólo del mecanismo de distribución de la señal, sino también de la naturaleza de la respuesta en la célula diana. En los casos en los que la respuesta solamente requiere cambios en proteínas que ya están presentes en la célula, ésta puede darse muy rápidamente: por ejemplo, un cambio alostérico en un canal controlado por un neurotransmisor (se analiza en el Capítulo 11) puede alterar el potencial eléctrico de la membrana en cuestión de milisegundos y las respuestas que sólo dependen de la fosforilación de proteínas pueden darse en cuestión de segundos. Sin embargo, cuando la respuesta implica cambios en la expresión génica y en la síntesis de nuevas proteínas, por lo general requiere muchos minutos o incluso horas para producirse, independientemente del sistema de transmisión de la señal (**Figura 15–6**).

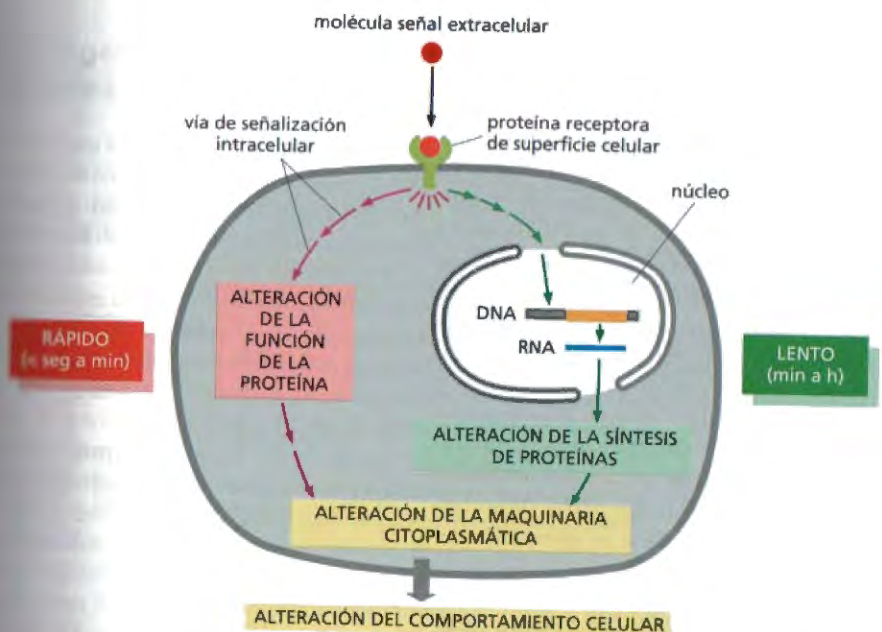


Figura 15-6 La señales extracelulares actúan de forma lenta o rápida cambiando el comportamiento de una célula diana. Ciertos tipos de respuesta señalizadoras, como el incremento del crecimiento y la división celulares, implican cambios en la expresión de genes y en la síntesis de nuevas proteínas; por lo tanto, ocurren lentamente, a menudo puede transcurrir una hora o más. Otras respuestas –como los cambios en el movimiento de la célula, la secreción o el metabolismo– no implican por necesidad cambios en la transcripción y, por lo tanto, se producen con mucha más rapidez, a menudo en cuestión de minutos o segundos; estos cambios pueden ser por ejemplo la fosforilación rápida de proteínas efectoras en el citoplasma. Las respuestas sinápticas mediadas por cambios en el potencial de membrana pueden ocurrir en cuestión de milisegundos (no mostrado aquí).

Las uniones de tipo gap permiten que las células vecinas compartan la información de señalización

Las **uniones de tipo gap** son canales muy estrechos llenos de agua que conectan directamente los citoplasmas de dos células epiteliales adyacentes o de algunos otros tipos celulares (véase la Figura 19–34). Los canales permiten el intercambio de iones inorgánicos y de otras pequeñas moléculas solubles en agua, pero no de macromoléculas como proteínas o ácidos nucleicos. Así, las células que están conectadas por uniones de tipo gap pueden comunicarse entre sí de forma directa sin tener la dificultad de la barrera que supone la presencia de las membranas plasmáticas (**Figura 15–7**). De esta forma, las uniones de tipo gap proporcionan la forma más íntima de todas las formas de comunicación celular, puentes citoplasmáticos (véase la Figura 21–31) o fusión celular.

En contraste con otros sistemas de comunicación celular, por lo general las uniones de tipo gap permiten que la comunicación se produzca en ambos sentidos de forma simétrica y su efecto típico consiste en homogeneizar las condiciones de las células que se comunican. También pueden ser importantes diseminando el efecto de las señales extracelulares que actúan a través de mediadores intracelulares pequeños, como el Ca^{2+} y el AMP cíclico (se describe más adelante), los cuales pasan fácilmente a través de los canales de las uniones de tipo gap. Por ejemplo, en el hígado una caída en la concentración de los niveles de glucosa en sangre estimula la liberación de *noradrenalina* (norepinefrina) por las terminaciones nerviosas simpáticas. La noradrenalina estimula a los hepatocitos (células del hígado) a que aumenten la degradación de glucógeno y a que liberen glucosa a la sangre, una respuesta que depende de un incremento de los niveles intracelulares de AMP cíclico. Sin embargo, no todos los hepatocitos están inervados por terminaciones nerviosas simpáticas. Mediante las uniones de tipo gap que conectan los hepatocitos, los hepatocitos inervados transmiten la señal a los no inervados, al menos en parte mediante el desplazamiento de moléculas de AMP cíclico a través de las uniones de tipo gap. Como era de esperar, los ratones que tienen una mutación en el gen de las uniones de tipo gap, que se expresa sobre todo en el hígado, no pueden movilizar la glucosa normalmente cuando los niveles de glucosa en sangre caen. Las uniones de tipo gap se tratan en detalle en el Capítulo 19.

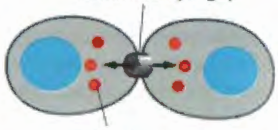


Figura 15–7 Señalización a través de uniones de tipo gap. Las células que están conectadas por uniones de tipo gap comparten pequeñas moléculas, incluidas las moléculas señalizadoras pequeñas intracelulares como el AMP cíclico y el Ca^{2+}, por lo que pueden responder a señales extracelulares de forma coordinada.

Cada célula está programada para responder a combinaciones específicas de moléculas señal extracelulares

Una célula típica de un organismo pluricelular puede estar expuesta a centenares de moléculas señal diferentes de su entorno. Estas moléculas pueden ser solubles, estar unidas a la matriz extracelular o estar unidas a la superficie de las células vecinas; pueden ser estimuladoras o inhibidoras; pueden actuar en innumerables combinaciones diferentes y pueden afectar a casi cualquier aspecto del comportamiento de la célula. La célula puede responder selectivamente a este babel de señales selectivas, de acuerdo con su carácter específico. Este carácter lo ha adquirido mediante la progresiva especialización celular en el transcurso del desarrollo. Una célula puede estar programada para responder a un conjunto de señales, diferenciándose; a otro conjunto de señales, creciendo y dividiéndose, y a otro grupo de señales, desarrollando alguna función especializada como la contracción o la secreción. Uno de los grandes retos de la biología celular consiste en llegar a conocer de qué forma las células integran toda esta información de señales para poder realizar las decisiones cruciales: dividirse, diferenciarse, etc. Para la mayoría de las células de los tejidos animales, incluso la decisión de continuar viviendo depende de la interpretación correcta de una combinación específica de señales necesaria para sobrevivir. Cuando a una célula (p. ej. en cultivo) se la depriva de estas señales, activa un programa suicida y se mata, habitualmente por *apoptosis*, una forma de *muerte celular programada* (**Figura 15–8**), como se describe en el Capítulo 18. Debido a que diferentes tipos de células necesitan combinaciones diferentes de señales de supervivencia, cada tipo celular está restringido en el cuerpo a un juego específico de ambientes. Por ejemplo, muchas células epiteliales requieren señales de supervivencia procedentes de la lámina basal sobre la que están asentadas (se trata en el Capítulo 19); mueren por apoptosis si pierden el contacto con su lámina de matriz.

En principio, los centenares de moléculas señal que produce cada animal pueden utilizarse para generar un número casi ilimitado de combinaciones que permiten controlar los diferentes comportamientos de sus células de una manera muy específica. Son suficientes

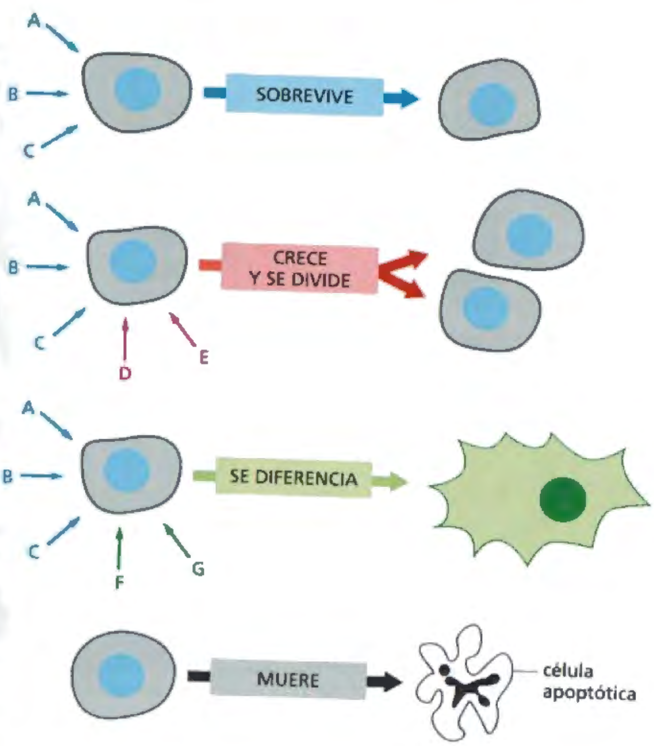


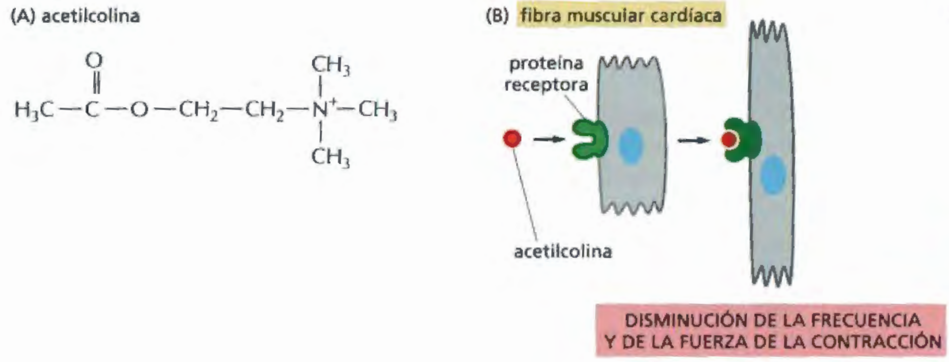
Figura 15–8 Dependencia de múltiples moléculas señalizadoras extracelulares de la célula animal. Cada tipo celular presenta un conjunto de receptores que le permite responder a un conjunto correspondiente de moléculas señal producidas por otras células. Estas moléculas señal actúan de forma combinada y regulan el comportamiento de la célula. Como se muestra aquí, una célula individual, a menudo requiere varias señales para sobrevivir (*flechas azules*) y señales adicionales para dividirse (*flechas rojas*) o diferenciarse (*flechas verdes*). Si se depriva a la célula de las señales de supervivencia apropiadas, inicia una forma de suicidio celular conocida como apoptosis o muerte celular programada. La situación real es incluso más compleja. Aunque no se muestra, algunas moléculas señalizadoras extracelulares actúan inhibiendo el comportamiento de éstas y otras células, y hasta pueden inducir la apoptosis.

un número relativamente pequeño de tipos de moléculas señalizadoras y de receptores. La complejidad radica en las maneras en las que las células responden a las combinaciones de señales que reciben.

Por lo general diferentes tipos de células responden de forma diferente a una misma molécula señal extracelular

La manera específica en la que una célula reacciona con su entorno depende no sólo de las proteínas receptoras que posee sino también de la maquinaria intracelular a través de la cual integra e interpreta las señales que recibe. Así, por lo general una misma molécula señal tiene efectos diferentes sobre diferentes tipos de células diana. Por ejemplo, el neurotransmisor acetilcolina (**Figura 15–9A**) disminuye la frecuencia y la fuerza de contracción de las fibras musculares del corazón (Figura 15–9B), pero estimula la contracción de las células del músculo esquelético (Figura 15–9C). En este caso, las proteínas receptoras de acetilcolina de las fibras musculares esqueléticas son diferentes de las de las fibras musculares cardíacas. Sin embargo, las diferencias entre los receptores casi nunca explica las diferencias de efectos, ya que la unión de una misma molécula señal a proteínas receptoras idénticas produce respuestas muy diferentes en diferentes tipos de células diana, como en el caso de la unión de la acetilcolina al músculo cardíaco y a células de las glándulas salivares (compárense las Figuras 15–9B y 15–9 D). En algunos casos, este fenómeno refleja diferencias en las proteínas señalizadoras activadas mientras que en otros refleja diferencias en las proteínas efectoras o en los genes activados. Por lo tanto, una molécula señal extracelular contiene en sí misma muy poca información; sencillamente induce a la célula a que responda de acuerdo con su estado predeterminado, que depende de la historia de su desarrollo y de los genes que expresa.

El reto de entender de qué forma las células integran, procesan y reaccionan a las diferentes entradas de información que reciben es análogo en muchos aspectos al reto de entender de qué forma el cerebro integra y procesa la información para controlar el comportamiento. En ambos casos para entender cómo funcionan los procesos no es suficiente conocer el listado de los componentes y de las conexiones que hay en el sistema. En primer lugar hemos de considerar algunos principios básicos relativos a la manera en la que una célula responde a una señal sencilla de un tipo determinado.



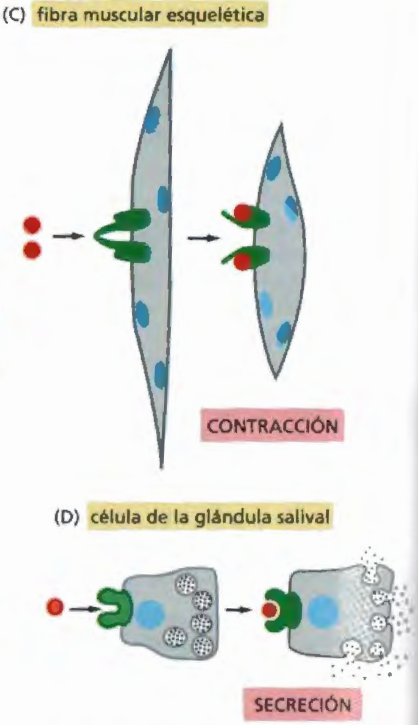


Figura 15–9 Diferentes respuestas inducidas por el neurotransmisor acetilcolina. (A) Estructura química de la acetilcolina. (B-D) Diferentes tipos celulares están especializados en responder a la acetilcolina de manera distinta. En algunos casos (B y C), los receptores son diferentes. En otros casos (B y D), la acetilcolina se une a proteínas receptoras similares, pero la señalización intracelular que produce se interpreta de manera diferente en células especializadas en realizar funciones diferentes.

El destino de algunas células en desarrollo depende de su posición en un gradiente de morfógeno

Una misma señal que actúa sobre un mismo tipo de células puede ejercer sobre ellas efectos cualitativamente diferentes, dependiendo de la concentración de la señal. Como se expone en el Capítulo 22, respuestas diferentes de este tipo de una célula a concentraciones diferentes de una misma molécula señal son cruciales en el desarrollo de los animales, cuando las células empiezan a diferenciarse unas de otras.

En estos casos, la molécula señalizadora extracelular se denomina **morfógeno** y, en los casos más sencillos, difunde a partir de una fuente celular localizada (un *centro señalizador*) generando un gradiente de concentración de la señal. Las células que responden adoptan diferentes destinos celulares de acuerdo con su posición en el gradiente: las células que están más cerca del centro señalizador y que, por tanto, estarán expuestas a las mayores concentraciones del morfógeno, tendrán un número mayor de receptores activados y seguirán un vía de desarrollo; las que están un poco más alejadas seguirán otra vía de desarrollo, y así sucesivamente (**Figura 15–10**). Como se describe más adelante (y en el Capítulo 22), el diferente nivel de receptores activados genera diferencias en la concentración o en la actividad de una o más proteínas reguladoras de genes en el núcleo de cada célula, lo cual a su vez genera diferencias en el patrón de la expresión génica. Además, por lo general las interacciones de señalización local entre las células de un gradiente facilitan la determinación y estabilizan los diferentes destinos de estas células.

Una célula sólo modifica rápidamente la concentración de una molécula intracelular si la vida media de esta molécula es corta

Es natural pensar en los sistemas de señalización en términos de los cambios que se producen cuando se libera una señal extracelular. Pero también resulta importante considerar qué ocurre cuando esta señal se elimina. Durante el desarrollo, a menudo ocurre que señales extracelulares transitorias producen efectos duraderos: pueden desencadenar un cambio en el desarrollo de la célula que persiste indefinidamente, a través de mecanismos de procesos de memoria celular como los que tratamos más adelante (y en los Capítulos 7 y 22). Sin embargo en la mayoría de los casos, especialmente en los tejidos adultos, la respuesta se desvanece cuando cesa la señal. A menudo el efecto es transitorio porque la señal ejerce sus efectos alterando la concentración de un conjunto de moléculas de vida media corta (inestables), que está en continuo recambio continuo. Así, cuando la señal cesa el recambio de las moléculas viejas por moléculas nuevas borra las trazas de la acción de la señal. De ello se deduce que la velocidad a la cual una célula responde a la eliminación de la señal depende de la velocidad de destrucción, o recambio, de las moléculas intracelulares a las que afecta la señal.

También es cierto, aunque puede no resultar tan obvio, que esta velocidad de recambio puede determinar la velocidad de la respuesta cuando llega una señal extracelular. Consideremos por ejemplo dos moléculas señalizadoras intracelulares X e Y, y que ambas se mantienen normalmente a una concentración de 1000 moléculas por célula. La célula sintetiza y degrada la molécula Y a una velocidad de 100 moléculas por segundo, de forma que cada molécula tiene una vida media de 10 segundos. A su vez, la molécula X tiene una velocidad

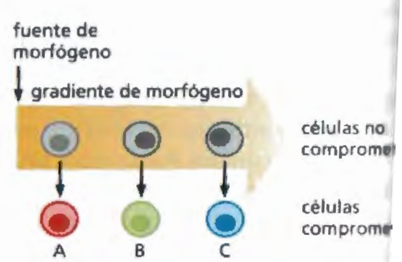


Figura 15–10 Las células adoptan diferent destinos dependiendo de su posición en un gradiente de morfógeno. Las diferentes concentraciones de morfógeno inducen la expresión de grupos de genes diferentes, lo cual da lugar a diferentes destinos celulare (indicado en colores diferentes).

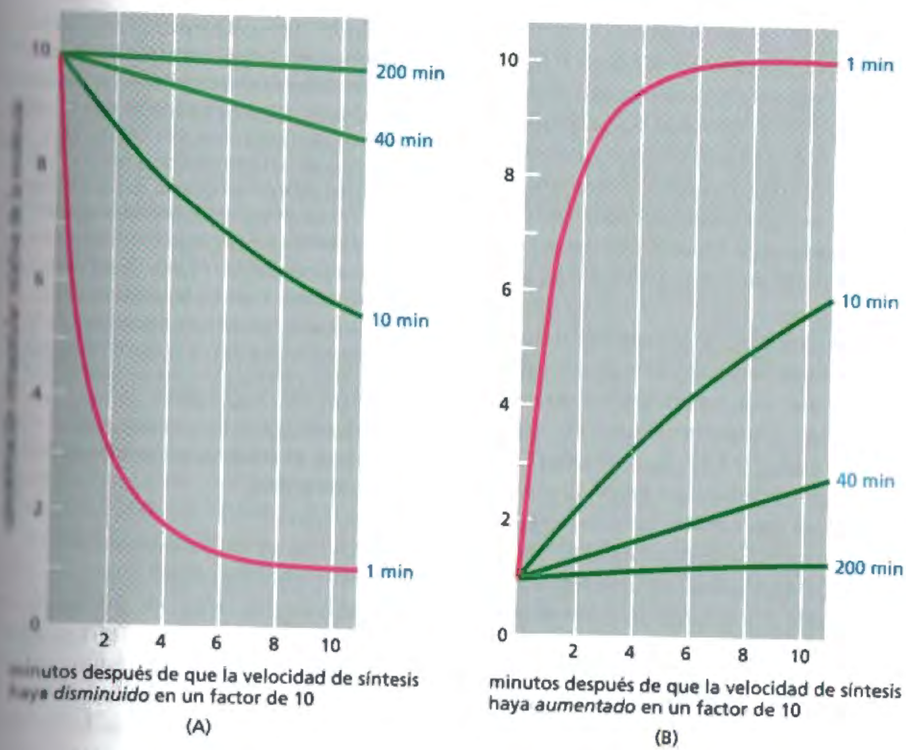


Figura 15–11 Importancia de un recambio rápido. La figura muestra predicciones de las velocidades relativas de cambio de las concentraciones intracelulares de moléculas que tienen diferentes velocidades de recambio, cuando sus velocidades de síntesis (A) disminuyen o (B) aumentan repentinamente en un factor de 10. En ambos casos, la concentración de las moléculas que normalmente son degradadas con rapidez en la célula (*línea roja*) cambia rápidamente mientras que la concentración de las moléculas que por lo general son degradadas de forma más lenta (*líneas verdes*) cambian en proporción más despacio. Los números (en *azul*) del lado derecho de las gráficas son las vidas medias asumidas para cada una de las diferentes moléculas.

de recambio 10 veces más lenta: se sintetiza y degrada a una velocidad de 10 moléculas por segundo, de forma que cada molécula tiene una vida media de 100 segundos. Si una señal que actúa sobre la célula genera un incremento de 10 veces en las velocidades de síntesis tanto de X como de Y sin alterar las vidas medias, al final del primer segundo la concentración de Y se habrá incrementado unas 900 moléculas en cada célula ($10 \times 100 - 100$) mientras que la concentración de X sólo se habrá incrementado 90 moléculas por célula. De hecho, después de que su velocidad de síntesis haya aumentado o disminuido de forma abrupta, el tiempo necesario para que una molécula llegue a medio camino entre su concentración antigua y su nueva concentración de equilibrio es igual a su vida media, es decir, al tiempo que sería necesario para que su concentración bajara a la mitad si se parara por completo su síntesis (**Figura 15–11**).

El mismo principio se aplica tanto a proteínas como a pequeñas moléculas, tanto si se encuentran en el espacio extracelular como si son intracelulares. Muchas proteínas intracelulares tienen vidas medias muy cortas; algunas de ellas sobreviven menos de 10 minutos. En la mayoría de los casos son proteínas que tienen un papel regulador clave y cuyas concentraciones celulares están reguladas rápidamente mediante cambios en la velocidad de su síntesis.

Más adelante veremos que muchas respuestas celulares a señales extracelulares dependen de la transformación de proteínas señalizadoras intracelulares de su estado inactivo a su estado activo y no de su síntesis o degradación. Por ejemplo, es habitual que la fosforilación o la unión de GTP activen proteínas señalizadoras. Sin embargo, incluso en estos casos la activación se puede revertir de forma rápida y continua (en estos ejemplos mediante la desfosforilación y la hidrólisis del GTP a GDP, respectivamente) para que el proceso de señalización sea lo más rápido posible. Estos procesos de inactivación desempeñan un papel crucial determinando la magnitud, la velocidad y la duración de la respuesta.

El óxido nítrico, un gas, actúa como una señal regulando directamente la actividad de determinadas proteínas en el interior de la célula diana

La mayor parte de este capítulo trata de vías de señalización activadas por receptores de superficie celular. Sin embargo, antes de estudiar estos receptores y sus vías de señalización, vamos a considerar brevemente algunas moléculas señalizadoras importantes que activan *re-*

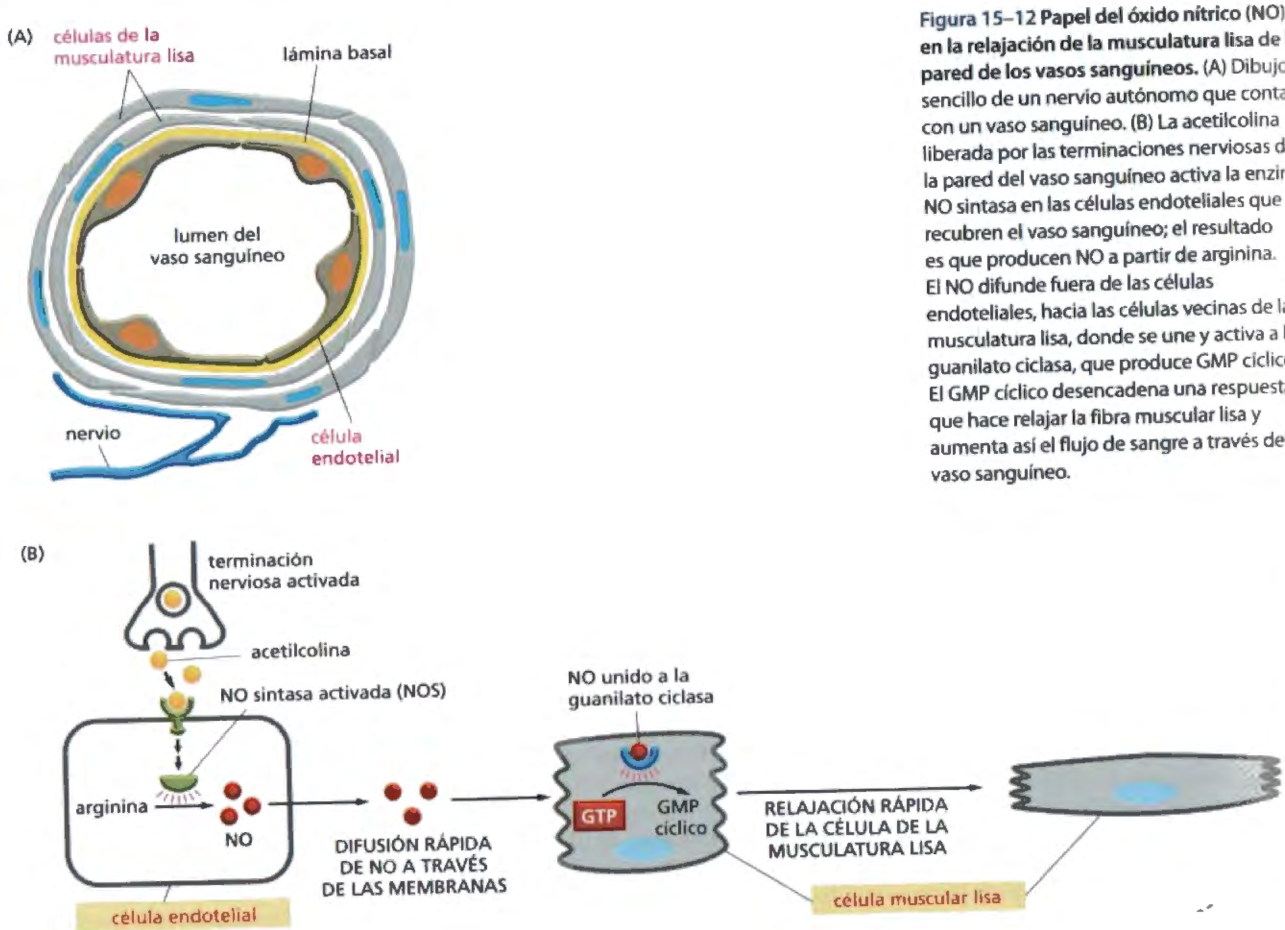


Figura 15–12 Papel del óxido nítrico (NO) en la relajación de la musculatura lisa de la pared de los vasos sanguíneos. (A) Dibujo sencillo de un nervio autónomo que contacta con un vaso sanguíneo. (B) La acetilcolina liberada por las terminaciones nerviosas de la pared del vaso sanguíneo activa la enzima NO sintasa en las células endoteliales que recubren el vaso sanguíneo; el resultado es que producen NO a partir de arginina. El NO difunde fuera de las células endoteliales, hacia las células vecinas de la musculatura lisa, donde se une y activa a la guanilato ciclasa, que produce GMP cíclico. El GMP cíclico desencadena una respuesta que hace relajar la fibra muscular lisa y aumenta así el flujo de sangre a través del vaso sanguíneo.

ceptores intracelulares. Entre estas moléculas se cuentan el óxido nítrico y las hormonas esteroideas, de las que trataremos por orden.

A pesar de que la mayoría de las moléculas señal extracelulares son hidrofílicas y se unen a receptores situados en la superficie de la membrana de la célula diana, algunas de ellas son lo bastante hidrofóbicas, o pequeñas o ambas cosas a la vez, para atravesar fácilmente la membrana plasmática de la célula diana. Una vez en el interior, regulan de forma directa la actividad de proteínas intracelulares determinadas. Un ejemplo importante y destacable lo constituye el gas **óxido nítrico (NO:** ***nitric oxide***), que actúa como una molécula señal tanto en animales como en plantas. Incluso algunas bacterias pueden detectar concentraciones muy bajas de NO y alejarse de él.

En mamíferos, una de las funciones del NO es relajar la musculatura lisa. Por ejemplo, esta función la realiza sobre las paredes de los vasos sanguíneos (**Figura 15–12A**). Las terminaciones nerviosas de los nervios autónomos en las paredes de los vasos sanguíneos liberan acetilcolina. La acetilcolina actúa sobre las células endoteliales vecinas, que recubren el interior de los vasos, y las células endoteliales responden liberando NO, que relaja las células musculares lisas de la pared y permite que el vaso se dilate. Este efecto del NO sobre los vasos sanguíneos proporciona una explicación del mecanismo de acción de la nitroglicerina, que ha sido utilizada durante más de 100 años para tratar pacientes con angina de pecho (dolor debido a un flujo sanguíneo inadecuado en el músculo cardíaco). La nitroglicerina es transformada en NO, el cual relaja los vasos sanguíneos. Este hecho reduce la carga de trabajo del corazón y, en consecuencia, reduce el requerimiento de oxígeno del músculo cardíaco.

Muchos tipos de células nerviosas utilizan gas NO más directamente para señalizar a sus células vecinas. Por ejemplo, el NO liberado por los nervios autónomos en el pene provoca la dilatación local de los vasos sanguíneos, que son responsables de la erección. Los macrófagos y los neutrófilos activados también producen NO como mediador local para colaborar en el proceso de eliminación de microorganismos invasores. En plantas, el NO está implicado en las respuestas defensivas al daño o a la infección.

El gas NO se sintetiza mediante la desaminación del aminoácido arginina, catalizada por enzimas denominadas **NO sintasas (NOS)** (Figura 15–12B). La NOS de las células endoteliales

se denomina *eNOS* mientras que la de las células nerviosas y musculares se denominan nNOS. Las células nerviosas y musculares sintetizan nNOS de forma constitutiva, la cual es activada a producir NO mediante un influjo de Ca^{2+} cuando las células son estimuladas. Por el contrario, los macrófagos sintetizan otra NOS, denominada NOS inducible (*iNOS*) ya que sólo la sintetizan cuando están activados, habitualmente en respuesta a una infección.

Dado que el NO disuelto atraviesa fácilmente las membranas, difunde con rapidez al exterior de la célula que lo sintetiza y entra de forma directa en las células vecinas (véase Figura 15–12B). Sólo actúa localmente debido a que en el espacio extracelular su vida media es muy corta –entre 5 y 10 segundos– transformándose en nitratos y nitritos al combinarse con oxígeno y agua.

En algunas células diana, incluyendo las células musculares lisas, el NO se une de forma reversible a un átomo de hierro del lugar activo de la enzima *guanilato ciclasa*, estimulándola a producir la pequeña molécula señalizadora intracelular *GMP cíclico*, de la que trataremos más adelante. Así, la guanilato ciclasa actúa como un receptor intracelular de NO y como una proteína señalizadora intracelular (véase la Figura 15–12B). El NO puede incrementar los niveles de GMP cíclico en el citosol en cuestión de segundos, ya que la velocidad normal de recambio del GMP cíclico es alta: la rápida degradación a GMP por una *fosfodiesterasa* está compensada por la rápida producción de GMP cíclico a partir de GTP por la guanilato ciclasa. El fármaco Viagra y los nuevos fármacos relacionados con ella inhiben la fosfodiesterasa de GMP cíclico en el pene, por lo que aumenta el tiempo durante el cual los niveles de GMP cíclico se mantienen elevados en las células musculares lisas de los vasos sanguíneos del pene después de que la producción de NO sea inducida por las terminaciones nerviosas locales. El GMP cíclico, a su vez, mantiene los vasos sanguíneos relajados y, por tanto, el pene en erección.

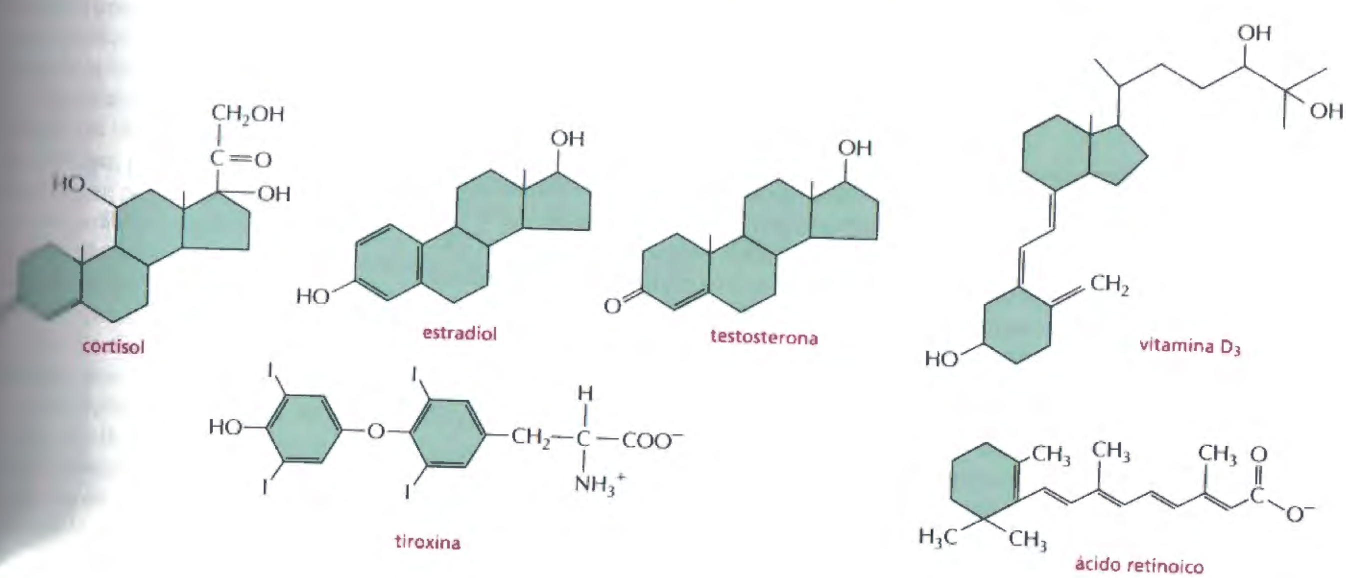
El NO también puede señalizar de forma independiente del GMP cíclico. Por ejemplo, puede alterar la actividad de una proteína intracelular mediante la nitrosilación covalente de grupos tiol (–SH) de determinadas cisteínas de la proteína.

El *monóxido de carbono (CO)* es otro gas que también se utiliza como una molécula señalizadora extracelular semejante al NO. Puede actuar estimulando la guanilato ciclasa. Sin embargo, estos gases no son las únicas moléculas señal que pueden pasar directamente a través de la membrana plasmática de la célula diana, como describimos a continuación.

Los receptores nucleares son proteínas reguladoras de la expresión génica moduladas por ligando

Ciertas moléculas pequeñas e hidrofóbicas difunden de forma directa a través de la membrana plasmática de las células diana y se unen a proteínas receptoras intracelulares que son proteínas reguladoras de genes. Estas moléculas señal incluyen las hormonas esteroideas, las hormonas tiroideas, los retinoides y la vitamina D. Aunque son moléculas muy diferentes tanto en estructura química (**Figura 15–13**) como en función, todas ellas actúan a

Figura 15–13 Algunas de las moléculas señalizadoras no gaseosas que se unen a receptores intracelulares. Nótese que todas ellas son pequeñas e hidrofóbicas. Se muestra la forma activa, hidroxilada, de la vitamina D_3. El estradiol y la testosterona son hormonas esteroideas sexuales.



través de un mecanismo similar. Se unen a sus receptores intracelulares respectivos alterando la capacidad que tienen estas proteínas de controlar la transcripción de determinados genes. Así, estas proteínas actúan como receptores intracelulares y como efectores intracelulares de la señal.

Todos estos receptores tienen estructuras relacionadas entre sí y constituyen la enorme **superfamilia de receptores nucleares**. Muchos de los miembros de esta superfamilia sólo han sido identificados por secuenciación del DNA, y todavía no se conocen sus ligandos; por lo tanto, a estas proteínas se les conoce como *receptores nucleares huérfanos*. En la actualidad más de la mitad de los 48 receptores nucleares codificados en el genoma humano son huérfanos, como también lo son 17 de los 18 de *Drosophila* y los 278 del nematodo *C. elegans* (véase Figura 4–85). Algunos receptores nucleares de mamíferos no están regulados por moléculas señal secretadas sino por metabolitos intracelulares; por ejemplo, los *receptores activadores de la proliferación de los peroxisomas* (*PPAR: peroxisome proliferation-activated receptors*) se unen a metabolitos lipídicos intracelulares y regulan la transcripción de genes involucrados en el metabolismo lipídico y en la diferenciación de las células adiposas (se trata en el Capítulo 23). Parece probable que los receptores nucleares de las hormonas evolucionaran a partir de estos receptores para metabolitos intracelulares, lo cual ayudaría a explicar su localización intracelular.

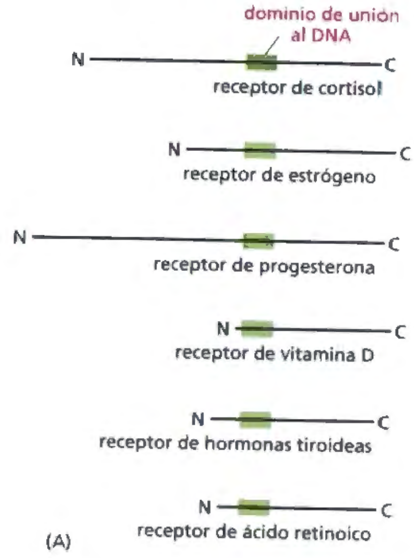
Las **hormonas esteroideas** –incluyendo el cortisol, las hormonas esteroideas sexuales, la vitamina D (en los vertebrados) y la hormona de la muda *ecdisona* (en los insectos)– se sintetizan a partir del colesterol. El *cortisol* se produce en el córtex de las glándulas adrenales y afecta el metabolismo de muchos tipos celulares. Las *hormonas esteroideas sexuales* se sintetizan en los testículos y en los ovarios y son responsables de los caracteres sexuales secundarios que distinguen los machos de las hembras. La *vitamina D* se sintetiza en la piel en respuesta a la luz solar; después de transformarse en una forma activa en el riñón o en el hígado, regula el metabolismo del Ca^{2+}, favoreciendo la captación de Ca^{2+} en el intestino y reduciendo su excreción por el riñón. Las *hormonas tiroideas*, que son sintetizadas a partir del aminoácido tirosina, incrementan el metabolismo de muchos tipos celulares, mientras que los *retinoides*, como el ácido retinoico, se sintetizan a partir de la vitamina A y desempeñan importantes papeles como mediadores locales durante el desarrollo de los vertebrados. A pesar de que todas estas moléculas señal son relativamente insolubles en agua, se hacen solubles para su transporte por el torrente sanguíneo y otros líquidos extracelulares mediante su unión a proteínas transportadoras específicas, de las que se disocian antes de entrar en la célula diana (véase la Figura 15–3B).

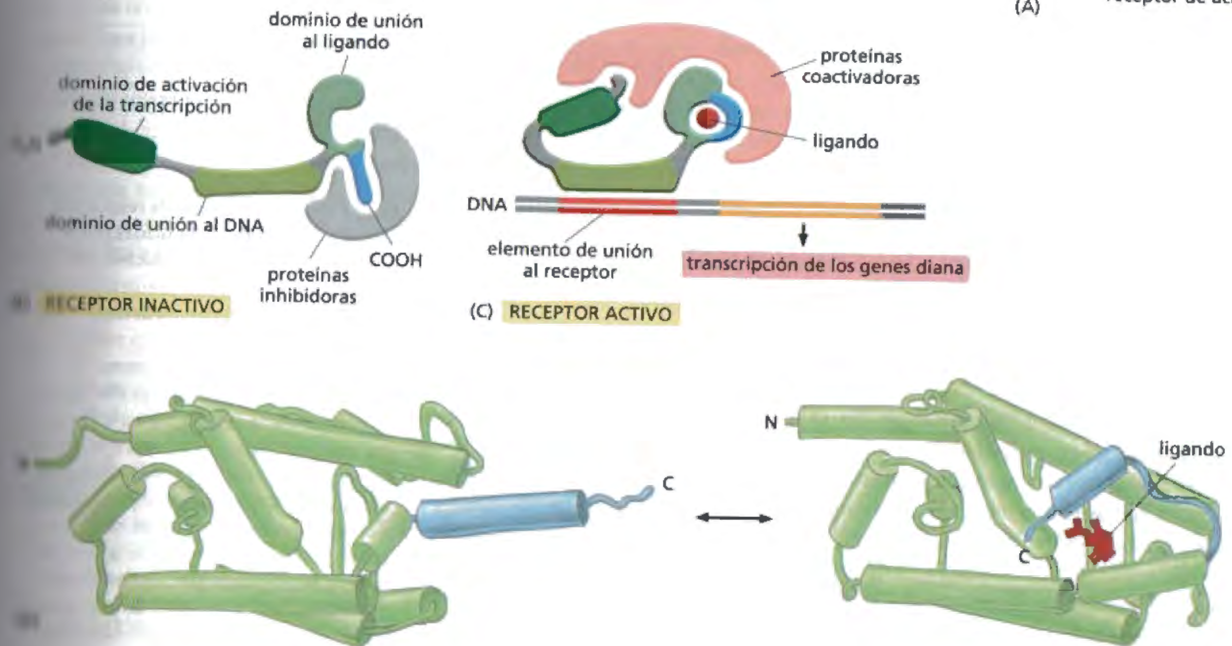
Los receptores nucleares se unen a secuencias específicas del DNA adyacentes a los genes que son regulados por el ligando correspondiente. Algunos de los receptores, como los del cortisol, se localizan principalmente en el citosol y sólo entran en el núcleo después de unirse al ligando; otros, como los de las hormonas tiroideas y de los retinoides, se localizan sobre todo en el núcleo y se unen al DNA incluso en ausencia de ligando. En cualquier caso, los receptores inactivos están unidos por lo general a complejos proteicos inhibidores. La unión del ligando altera la conformación de la proteína receptora, provocando la disociación del complejo inhibidor y haciendo que el receptor se una a proteínas coactivadoras que estimulan la transcripción génica (**Figura 15–14**). En otros casos, sin embargo, la unión del ligando a un receptor nuclear inhibe la transcripción: por ejemplo, algunos receptores de hormonas tiroideas actúan como activadores transcripcionales en ausencia de la hormona y se transforman en represores de la transcripción cuando se unen a la hormona.

La respuesta transcripcional tiene lugar generalmente en varias etapas. Por ejemplo, en el caso en el que la unión del ligando activa la transcripción, en cuestión de 30 minutos se produce la estimulación directa de un pequeño número de determinados genes, lo cual se conoce como la *respuesta primaria*; a su vez, los productos proteicos de estos genes activan a otros genes, produciendo una respuesta retrasada, denominada *respuesta secundaria*, y así sucesivamente. Además, algunas de las proteínas producidas en la respuesta primaria pueden actuar inhibiendo la transcripción de genes de la respuesta primaria, limitando así esta respuesta –un ejemplo de retroalimentación negativa, de la que trataremos más adelante. De esta forma, un simple incremento hormonal genera un cambio muy complejo del patrón de expresión génica (**Figura 15–15**).

Las respuestas a las hormonas esteroideas y tiroideas, a la vitamina D y a los retinoides están determinadas tanto por la naturaleza de la célula diana como por la naturaleza de la molécula señal. A pesar de que diferentes tipos celulares tengan receptores intracelulares idénticos, el conjunto de genes que regula el receptor es diferente en cada tipo celular. Ello es

Figura 15–14 La superfamilia de receptores nucleares. Todos los receptores nucleares se unen al DNA en forma de homodímeros o de heterodímeros, pero para simplificar, aquí sólo se muestran en forma de monómeros. (A) Todos los receptores tienen una estructura similar. Se señalan en *verde claro* los cortos dominios de unión al DNA de cada receptor. (B) El receptor inactivo se encuentra unido a proteínas inhibidoras. Experimentos de intercambio de dominios sugieren que en estos receptores la mayoría de dominios de unión al ligando, de activación transcripcional y de unión al DNA pueden actuar como módulos intercambiables. (C) Activación del receptor. Habitualmente, la unión del ligando al receptor provoca que el dominio de unión al ligando se cierre envolviendo al ligando, que las proteínas inhibidoras se disocien y que las proteínas coactivadoras se unan al dominio de activación de la transcripción del receptor, con lo cual se incrementa la transcripción del gen. En otros casos, la unión del ligando tiene el efecto contrario, provocando que la proteínas correpresoras se unan al receptor y disminuya de este modo la transcripción (no mostrado). Aunque no se muestra aquí, la actividad también se controla mediante un cambio en la localización del receptor: cuando está en su forma inactiva, puede estar retenido en el citoplasma; la unión del ligando puede entonces dejar al descubierto la señal de localización nuclear que provoca que sea importado al núcleo para actuar sobre el DNA. (D) Estructura tridimensional de un dominio de unión a ligando con (*derecha*) o sin (*izquierda*) el ligando unido. Obsérvese que la hélice α *azul* actúa como una tapa que se cierra cuando se une el ligando (mostrado en *rojo*) y que atrapa en el sitio al ligando.





Debido a que generalmente, para que se active la transcripción de cada gen eucariota, es necesaria la unión de más de un tipo de proteína reguladora. Por ello, un receptor intracelular puede activar un gen sólo si se produce la combinación adecuada de otras proteínas reguladoras de la expresión génica, siendo algunas de ellas específicas del tipo celular.

En resumen, existen dos razones principales por las que cada una de estas moléculas señalizadoras hidrofóbicas induce un conjunto característico de respuestas en los animales. En primer lugar, porque únicamente ciertos tipos celulares tienen receptores para ellas. En segundo lugar, porque cada uno de estos tipos celulares contienen una combinación diferente de otras proteínas reguladoras de la expresión génica, que colaboran con el receptor activado modulando la transcripción de conjuntos específicos de genes. Este principio también es válido para todas las respuestas señalizadoras que dependen de proteínas reguladoras de genes, incluyendo la gran cantidad de ejemplos que describimos en este capítulo.

Los detalles moleculares sobre cómo los receptores intracelulares y otras proteínas reguladoras controlan la transcripción de genes de forma específica, se tratan en el Capítulo 7.

Las proteínas receptoras nucleares a veces también están presentes en la superficie celular, donde actúan a través de mecanismos completamente diferentes de los que acabamos de describir. En lo que queda de capítulo consideraremos diferentes vías a través de las cuales los receptores de superficie celular transforman las señales extracelulares en señales intracelulares, un proceso denominado *transducción de señal*.

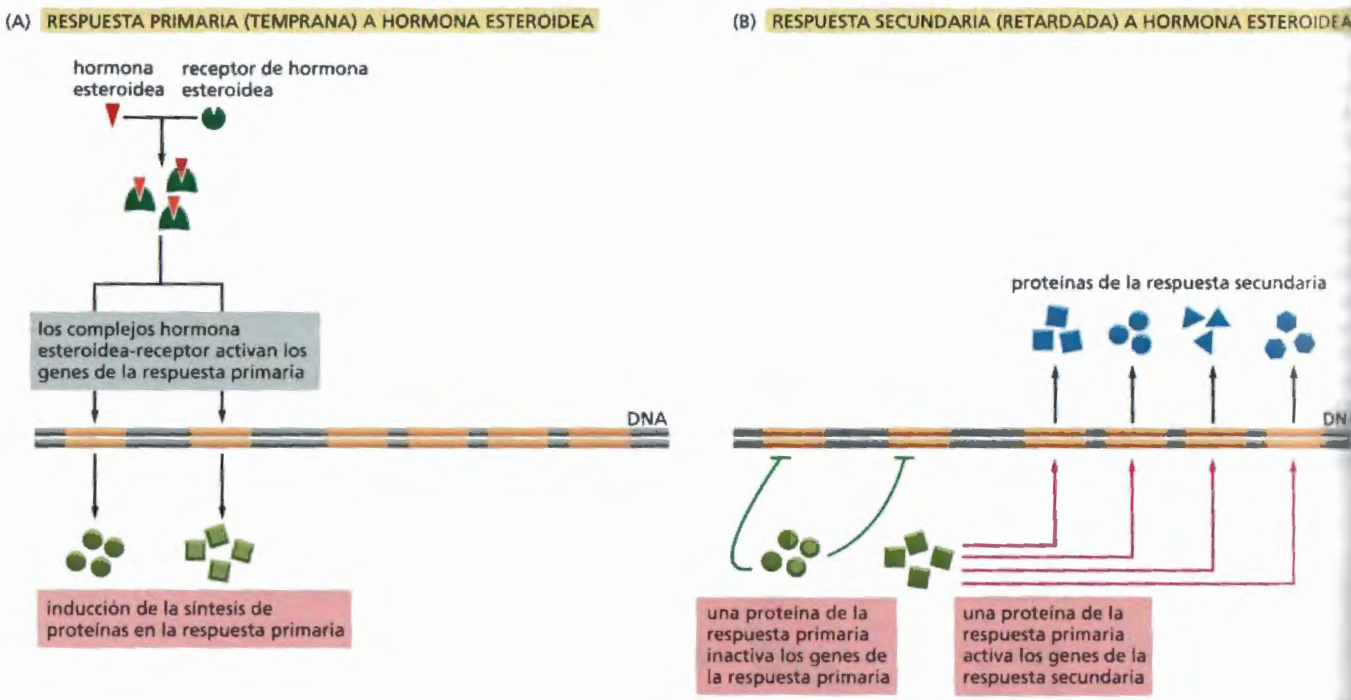


Figura 15–15 Un ejemplo de respuestas primaria y secundaria inducidas por la activación de un receptor nuclear de hormonas. (A) Respuesta primaria temprana y (B) respuesta secundaria retardada. Algunas de las proteínas de la respuesta primaria activan a los genes de la respuesta secundaria, mientras que otras inactivan a los genes de la respuesta primaria. El número real de genes involucrados en las respuestas primaria y secundaria es mayor del que se indica. Los fármacos que inhiben la síntesis proteica suprimen la transcripción de los genes de la respuesta secundaria pero no los de la respuesta primaria, permitiendo distinguir así estos dos tipos de respuesta. La figura ilustra la respuesta a una hormona esteroidea, pero estos mismos principios se pueden aplicar a muchos otros ligandos que activan proteínas receptoras nucleares.

Las tres clases principales de proteínas receptoras de superficie celular son los receptores acoplados a canales iónicos, los acoplados a proteínas G y los acoplados a enzimas

En contraste con las pequeñas moléculas señalizadoras hidrofóbicas de las que acabamos de tratar, que se unen a receptores intracelulares, la mayoría de las moléculas señalizadoras extracelulares se unen a proteínas receptoras específicas situadas en la superficie de las células diana a las que afectan y no entran ni en el citosol ni en el núcleo. Estos receptores de superficie actúan como *transductores de señal* transformando un evento de unión de la molécula señal extracelular en señales intracelulares que alteran el comportamiento de la célula diana.

La mayoría de los receptores de la superficie celular pertenecen a una de estas tres clases, que se definen en función del mecanismo de transducción que utilizan. Los **receptores acoplados a canales iónicos**, también conocidos como *canales iónicos regulados por transmisores* o *receptores ionotrópicos*, participan sobre todo en la rápida señalización sináptica entre células excitables eléctricamente (**Figura 15–16A**). Este tipo de señalización está mediada por un pequeño número de neurotransmisores que abren o cierran de forma transitoria un canal iónico formado por una proteína a la cual están unidos, alterando así brevemente la permeabilidad iónica de la membrana plasmática y, por lo tanto, modificando la excitabilidad de la célula postsináptica diana. La mayoría de estos receptores acoplados a canales iónicos pertenecen a una gran familia de proteínas que tienen varios dominios transmembrana y que son homólogas entre sí. En el Capítulo 11 se estudian estos receptores, por lo que aquí no los trataremos en mayor profundidad.

Los **receptores acoplados a proteínas G** actúan regulando de forma indirecta la actividad de una proteína diana ligada a la membrana plasmática, que por lo general es una enzima o un canal iónico. La interacción entre el receptor y la proteína diana está mediada por una tercera proteína, denominada *proteína trimérica de unión a GTP* (o *proteína G*) (Figura 15–16B). La activación de la proteína diana modifica la concentración de una o más pequeñas moléculas señalizadoras intracelulares (si la proteína diana es una enzima) o la permeabilidad iónica de la membrana plasmática (si la proteína diana es un canal iónico). A su vez, los pequeños mediadores intracelulares alteran el comportamiento de otras proteínas de señalización de la célula. Todos los receptores acoplados con proteínas G pertenecen a una gran familia de proteínas homólogas que son proteínas transmembrana de multipaso.

Los **receptores acoplados a enzimas** actúan directamente como enzimas o están asociados a enzimas a las que activan (Figura 15–16C). Por lo general son proteínas transmembrana de un solo paso que tienen el dominio de unión al ligando situado fuera de la célula y el lugar catalítico en el interior de la célula. Comparados con las otras dos clases de recepto-

…, los receptores acoplados a enzimas son de estructuras heterogéneas. La gran mayoría de ellos son proteínas quinasa o están asociados con proteínas quinasa, que cuando están activados fosforilan específicamente conjuntos de proteínas de la célula diana.

También existen algunos tipos de receptores de superficie celular que no son fáciles de clasificar en ninguna de las clases anteriores pero que ejercen importantes funciones controlando la especialización de diferentes tipos celulares durante el desarrollo y que participan en la renovación y la reparación de los tejidos. Trataremos de ellos en la última sección del capítulo, después de explicar cómo actúan los receptores acoplados a proteínas G y los receptores acoplados a enzimas. Sin embargo, en primer lugar se considerarán algunos principios generales de la señalización mediante receptores de superficie celular, con la intención de preparar la descripción detallada de las principales clases de receptores asociados a la superficie celular.

La mayoría de los receptores de superficie celular transmiten las señales a través de pequeñas moléculas y de una red de proteínas de señalización intracelulares

Las señales recibidas en la superficie de la célula tanto por receptores asociados a proteínas G como asociados a enzimas son transmitidas hacia el interior de la célula mediante una combinación de *moléculas de señalización intracelular* de pequeño y de gran tamaño. La cascada de señalización intracelular resultante finalmente modifica proteínas efectoras que son responsables de la modificación del comportamiento de la célula (véase la Figura 15–1).

Las moléculas señalizadoras intracelulares de pequeño tamaño se denominan **mediadores intracelulares pequeños** o **segundos mensajeros** (siendo los "primeros mensajeros" las señales extracelulares). Estos segundos mensajeros se generan en gran cantidad en respuesta a la activación del receptor y, a menudo, difunden rápidamente alejándose de

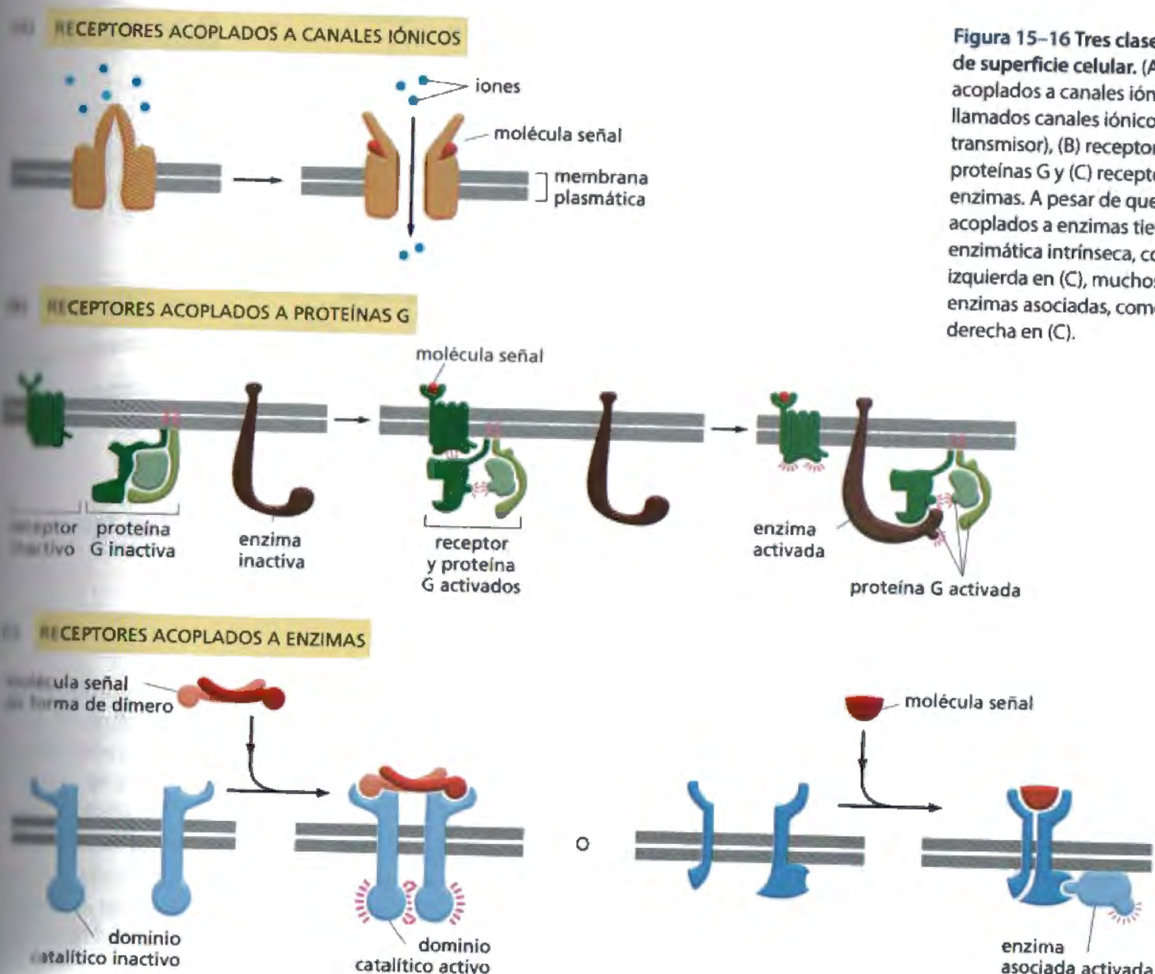


Figura 15–16 Tres clases de receptores de superficie celular. (A) Receptores acoplados a canales iónicos (también llamados canales iónicos regulados por transmisor), (B) receptores acoplados a proteínas G y (C) receptores acoplados a enzimas. A pesar de que muchos receptores acoplados a enzimas tienen una actividad enzimática intrínseca, como se muestra a la izquierda en (C), muchos otros actúan sobre enzimas asociadas, como se muestra a la derecha en (C).

su fuente transmitiendo la señal hacia otras partes de la célula. Algunos, como el *AMP cíclico* y el *Ca^{2+}* son solubles en agua y difunden por el citosol, mientras que otros, como el *diacilglicerol*, son solubles en lípidos y difunden por el plano de la membrana plasmática. En ambos casos, transmiten la señal uniéndose o modificando la conformación y el comportamiento de determinadas proteínas señalizadoras o proteínas efectoras.

Las moléculas señalizadoras intracelulares de gran tamaño son **proteínas señalizadoras intracelulares**, que participan en la liberación de la señal dentro de la célula generando pequeños mediadores intracelulares o activando la proteína señalizadora o efectora siguiente de la vía. Estas proteínas forman una red funcional en la que cada proteína colabora en el procesamiento de la señal de una u otra de las siguientes maneras, de forma que difunden la influencia de la señal por toda la célula (**Figura 15–17**):

1. Las proteínas pueden *transmitir* la señal al siguiente componente de la cadena.
2. Pueden actuar como un *armazón* uniendo y juntando dos o más proteínas señalizadoras de forma que puedan interactuar de una forma más rápida y eficiente.
3. Pueden transformar, o *transducir*, la señal a una forma diferente, que es susceptible de transmitir la señal o estimular una respuesta celular.
4. Pueden *amplificar* la señal que reciben y producir grandes cantidades de pequeños mediadores intracelulares o activar un gran número de copias de una proteína señalizadora corriente abajo. De esta forma, un pequeño número de moléculas señalizadoras extracelulares pueden provocar una gran respuesta intracelular. Cuando una cadena de transmisión tiene múltiples etapas de amplificación generalmente se la denomina **cascada de señalización**.
5. Pueden recibir señales procedentes de dos o más vías de señalización e *integrarlas* antes de transmitir una señal hacia delante. Una proteína que para activarse requiere la llegada de dos o más vías de señalización, a veces se denomina detector de coincidencia.
6. Pueden *difundir* la señal desde una vía de señalización a otra, generando ramas en el flujo de señalización e incrementando así la complejidad de la respuesta.
7. Pueden *anclar* una o más proteínas señalizadoras de una vía a una estructura particular de la célula donde se requiere la proteína señalizadora.
8. Pueden *modular* la actividad de otras proteínas señalizadoras y, por tanto, regular la fuerza de la señal a lo largo de una vía de señalización.

Vamos a considerar con más detalle algunas de las estrategias que utilizan las proteínas señalizadoras intracelulares para procesar la señal a medida que va pasando a lo largo de la vía de señalización. Vamos a encontrar de nuevo estas estrategias generales en secciones posteriores del capítulo, cuando se describan las clases de receptores específicos y las vías de señalización que activan.

Muchas proteínas de señalización intracelulares actúan como interruptores moleculares que se activan por fosforilación o por unión a GTP

Muchas proteínas señalizadoras intracelulares se comportan como *interruptores moleculares*. Al recibir una señal, cambian de una forma inactiva a una conformación activa, hasta que otro proceso las "apague" (las devuelva a su conformación inactiva). Como ya hemos mencionado, el proceso de "apagado" (mecanismo de inactivación) es tan importante como el proceso de "encendido" (mecanismo de activación). Una vía de señalización tiene que recuperarse después de transmitir una señal de manera que esté a punto para transmitir otra señal, por lo que cada molécula activada de la vía debe volver a su estado inactivo original.

En dos importantes clases de interruptores moleculares que actúan en procesos de señalización intracelular, su activación o inactivación dependen de la ganancia o pérdida de grupos fosfato, a pesar de que el sistema de ganancia o pérdida de estos grupos fosfato es muy diferente en ambas clases. La clase mayoritaria la forman proteínas que se activan o inactivan por **fosforilación** (tratado en el Capítulo 3). En estas proteínas, el cambio se dirige en uno de los sentidos por una **proteína quinasa**, que añade covalentemente uno o más grupos fosfato a la proteína señalizadora, y hacia el otro sentido por una **proteína fosfatasa**, que elimina los grupos fosfato unidos a la proteína (**Figura 15–18A**). La actividad de cualquier proteína regulada por fosforilación depende del equilibrio en cualquier instante entre las ac-

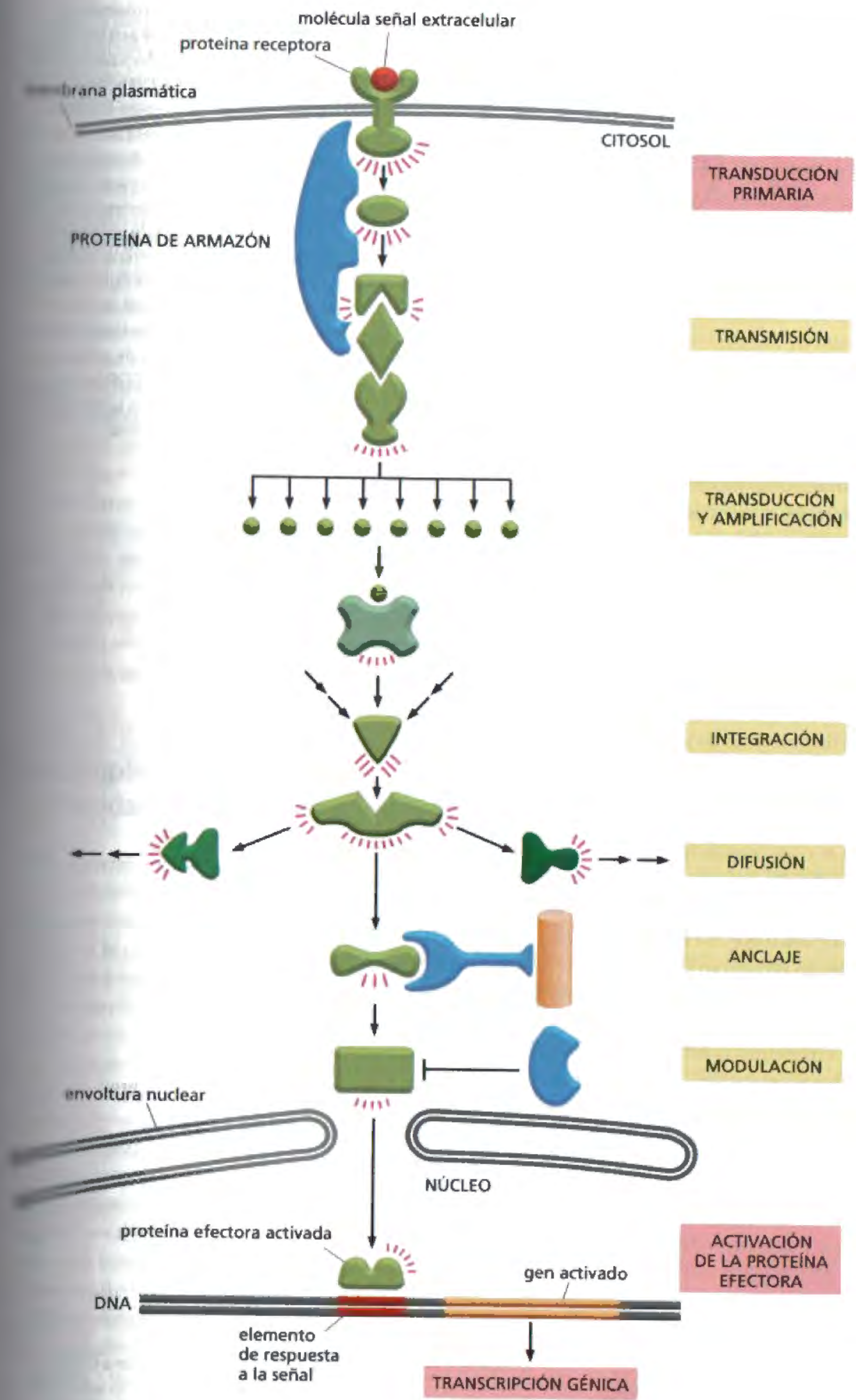


Figura 15–17 Vía hipotética de señalización intracelular desde un receptor situado en la superficie celular hasta el núcleo. En este ejemplo, una serie de proteínas señalizadoras y mediadores intracelulares pequeños transmiten la señal extracelular al núcleo de la célula, provocando un cambio en la expresión génica. La señal es modificada (transducida), amplificada, distribuida y modulada *en ruta*. Puesto que muchos de los pasos pueden ser afectados por otras señales extracelulares o intracelulares, el efecto final de una señal extracelular depende de muchos factores que afectan a la célula (véase la Figura 15–8). Finalmente, la cascada de señalización activa (o inactiva) a proteínas efectoras que modifican el comportamiento celular. En este ejemplo, el efector es una proteína reguladora de la expresión génica que activa la transcripción génica. Aunque la figura muestra proteínas señalizadoras individuales que realizan una sola función en realidad a menudo desempeñan más de una función; las proteínas de armazón, por ejemplo, a menudo también actúan anclando varias proteínas señalizadoras a una estructura intracelular particular.

La mayoría de las vías de señalización que van al núcleo son más directas que la que se muestra, que no está basada en ninguna vía conocida.

actividades de las quinasas que la fosforilan y de las fosfatasas que las desfosforilan. Cerca del 30% de las proteínas humanas tienen fosfatos unidos de forma covalente; el genoma humano codifica cerca de 520 proteínas quinasa y unas 150 proteína fosfatasas. Parece que una célula típica de mamífero utiliza en cualquier momento centenares de tipos diferentes de proteínas quinasa.

Muchas de las proteínas de señalización controladas por fosforilación son, en sí mismas, proteínas quinasa y, por lo general, se organizan en **cascadas de fosforilación**. En una cascada de este tipo, una proteína quinasa, activada por fosforilación, fosforila la proteína quinasa siguiente en la secuencia, y así sucesivamente; transmitiendo la señal hacia delante y, durante este proceso, amplificándola y a veces propagándola a otras vías de señalización. Existen dos

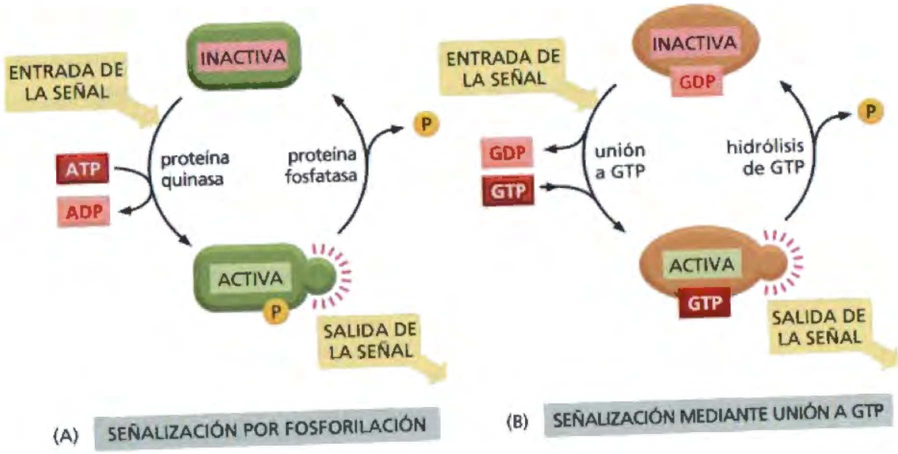


Figura 15–18 Dos tipos de proteínas de señalización intracelular que actúan como interruptores moleculares. Aunque uno de los tipos es activado por fosforilación y el otro por unión a GTP, en ambos casos la adición de un grupo fosfato cambia el estado de activación de la proteína y la eliminación del fosfato la vuelve al estado inicial. (A) Una proteína quinasa añade covalentemente un fosfato del ATP a la proteína de señalización y una proteína fosfatasa elimina el fosfato. Aunque no se muestra en esta figura, algunas proteínas señalizadoras son activadas por desfosforilación en lugar de serlo mediante fosforilación. (B) Una proteína de unión a GTP es inducida a cambiar el GDP que tiene unido por un GTP, lo que activa la proteína; la proteína activada se autoinactiva hidrolizando su GTP a GDP.

tipos principales de proteínas quinasa que actúan como proteínas señalizadoras intracelulares. La gran mayoría son **serinas/treoninas quinasa**, que fosforilan proteínas en residuos de serina y (menos a menudo) de treonina. Las otras son **tirosinas quinasa**, que fosforilan proteínas en residuos de tirosina. En ocasiones, alguna quinasa puede hacer ambas cosas.

La otra clase principal de interruptores moleculares que actúan ganando o perdiendo grupos fosfato son las **proteínas de unión a GTP** (descritas en el Capítulo 3). Estas proteínas alternan entre un "estado activo", cuando tienen unida una molécula de GTP, y un "estado inactivo", cuando están unidas a GDP. En el estado activo tienen una actividad intrínseca GTPasa por lo que se inactivan a sí mismas al hidrolizar el GTP que llevan unido hasta GDP (Figura 15–18B). Existen dos tipos principales de proteínas de unión a GDP. Las grandes *proteínas triméricas de unión a GTP* (también denominadas *proteínas G*), que participan en la transmisión de la señal desde los receptores acoplados a proteínas G que las activan (véase la Figura 15–16B). Las pequeñas **GTPasas monoméricas** (también denominadas *proteínas monoméricas de unión a GTP*) participan en la transmisión de señales a partir de muchas clases de receptores de superficie celular.

Existen proteínas reguladoras específicas que controlan ambos tipos de proteínas de unión a GTP. Las **proteínas activadoras de GTPasa** (**GAP**: *GTPase-activating proteins*) conducen las proteínas a su estado inactivo, ya que incrementan la velocidad de la hidrólisis del GTP que tienen unido estas proteínas; las GAP que actúan de esta forma también se denominan *reguladoras de las proteínas G señalizadoras* (*RGS*: *regulators of G-protein signaling*). En contraposición, los receptores acoplados a proteínas G activan proteínas G triméricas y los **factores intercambiadores de nucleótidos de guanina** (**GEF**: *guanine nucleotide exchange factors*) activan GTPasas monoméricas favoreciendo la liberación del GDP unido al intercambiarlo por GTP. La **Figura 15–19** ilustra la regulación de las GTPasa monoméricas.

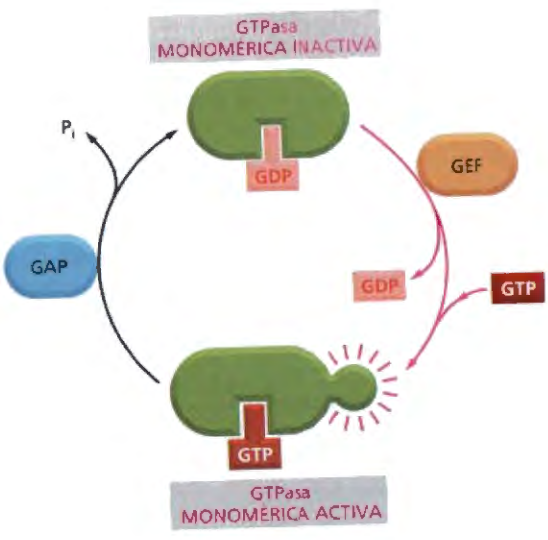


Figura 15–19 Regulación de una GTPasa monomérica. Las proteínas activadoras de GTPasa (GAP: *GTPase-activating proteins*) inactivan la proteína al estimularla a que hidrolice el GTP que lleva unido para transformarlo en GDP, que permanece fuertemente unido a la GTPasa inactivada. Los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF: *guanine nucleotide exchange factors*) activan la proteína inactiva al estimularla a que libere el GDP que lleva unido; puesto que la concentración de GTP en el citosol es 10 veces mayor que la de GDP, la proteína unirá rápidamente GTP cuando haya liberado su GDP, y así quedará activada.

Tanto las proteínas G triméricas como las GTPasa monoméricas también participan en muchos otros procesos en las células eucariotas, como la regulación del tráfico vesicular y aspectos de la división celular.

Como hemos tratado previamente, los comportamientos celulares complejos, como la supervivencia, el crecimiento celular o la proliferación, no están estimulados por una sola señal extracelular que actúa de forma individual sino que por lo general requieren combinaciones específicas de señales (véase la Figura 15–8). Por tanto, la célula debe integrar la información que procede de varias señales, si es el caso, generando una respuesta apropiada; por ejemplo, muchas células de mamífero para poder crecer y proliferar requieren tanto señales solubles como señales procedentes de la matriz extracelular (se describe en el Capítulo 19). La integración depende en parte de *detectores de coincidencia* intracelulares que son equivalentes a las *puertas AND* de los microprocesadores de los ordenadores, ya que únicamente se activan si reciben varias señales convergentes (véase la Figura 15–17). En la **Figura 15–20** se ilustra un ejemplo hipotético sencillo de una de estas proteínas.

Sin embargo, no todos los interruptores moleculares de las vías de señalización dependen de fosforilación o de unión a GTP. Veremos más adelante algunas proteínas señalizadoras que pasan del estado activo al inactivo o viceversa mediante la unión de otras proteínas señalizadoras o de algún mediador intracelular pequeño, como puede ser el AMP cíclico o el Ca^{2+} o mediante modificaciones covalentes diferentes de la fosforilación o la desfosforilación, como por ejemplo la ubiquitinación. Además, no todas las proteínas señalizadoras intracelulares actúan como interruptores cuando se fosforilan o se modifican reversiblemente de alguna otra forma. Como se explicará más adelante, en muchos casos el grupo añadido de forma covalente simplemente marca la proteína de forma que puede interactuar con otras proteínas señalizadoras que reconocen esta modificación.

Los complejos de señalización intracelular incrementan la velocidad, eficiencia y especificidad de la respuesta

Por lo general, incluso un solo tipo de señal extracelular activando un solo tipo de receptor de superficie celular activa paralelamente varias vías de señalización e influye en varios aspectos del comportamiento celular –como por ejemplo, la forma, el movimiento, el metabolismo y la expresión génica. Dada la complejidad de los sistemas de respuesta a señales, en los que a menudo participan varias cadenas de transmisión de proteínas de señalización que interactúan, ¿cómo se las arregla cada célula para fabricar respuestas específicas a tan posibles combinaciones de señales extracelulares? La cuestión es especialmente complicada porque muchas de las señales están relacionadas entre sí y se unen a tipos de receptores íntimamente relacionados. Un mismo tipo de proteína liberadora intracelular puede acoplar un subtipo de receptor a un conjunto de efectores y otro subtipo de receptor a otro conjunto de efectores.

En estos casos, ¿cómo es posible conseguir que la respuesta sea específica y evitar los entrecruzamientos? Una estrategia utiliza las **proteínas de armazón o de agregación** (*scaffold proteins*) (véase Figura 15–17), las cuales organizan grupos de proteínas señalizadoras que interactúan entre sí formando *complejos de señalización* a menudo antes de que se haya recibido la señal (**Figura 15–21**A). Dado que la proteína de agregación mantiene unidas las proteínas señalizadoras, los componentes pueden interactuar a concentraciones locales muy elevadas y ser rápidamente activadas de forma secuencial, eficiente y selectiva en respuesta a una señal extracelular apropiada, e impidiendo los entrecruzamientos de señales con otras vías de señalización.

En otros casos, los complejos de señalización sólo se forman transitoriamente en respuesta a una señal extracelular y cuando la señal decae con rapidez se desmontan. A menudo estos complejos transitorios se ensamblan alrededor de un receptor después de que una molécula señal extracelular lo haya activado. En muchos de estos casos, el dominio citosólico del receptor activado se fosforila durante el proceso de activación y los aminoácidos fosforilados actúan como sitios de unión para el ensamblaje de otras proteínas señalizadoras (Figura 15–21B). En otros casos, la activación del receptor conduce a la producción de moléculas de fosfolípido modificados (denominados fosfoinositoles) en la membrana plasmática adyacente, que reclutan proteínas señalizadoras intracelulares específicas en esta región de la membrana, donde se han activado (Figura 15–21C). En el Capítulo 13 se trata el papel de los fosfoinositoles en el tráfico a través de la membrana.

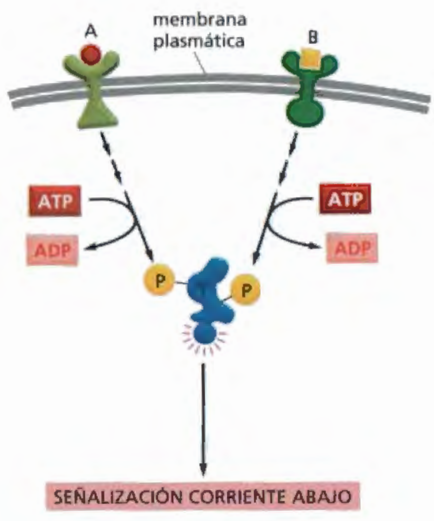


Figura 15–20 Integración de señales. Las señales extracelulares A y B activan diferentes vías de señalización intracelular, cada una de las cuales produce la fosforilación de la proteína Y, pero en diferentes sitios de la proteína. La proteína Y sólo se activa cuando ambos lugares están fosforilados, por lo que su activación se produce cuando las señales A y B se hallan presentes simultáneamente. Las proteínas de este tipo se suelen denominar detectores de coincidencia.

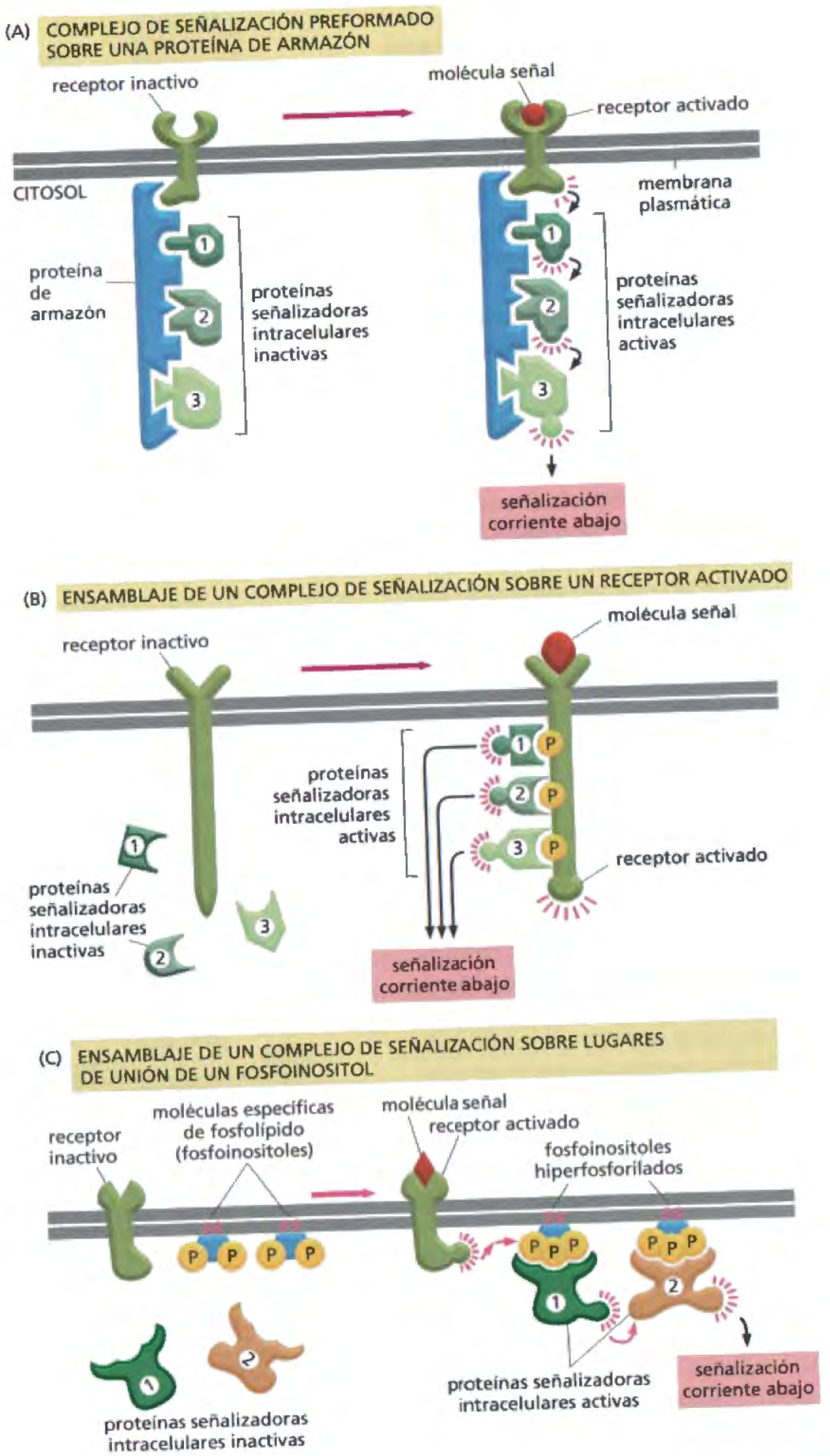


Figura 15-21 Tres tipos de complejos de señalización intracelular. (A) Un receptor y algunas de las proteínas señalizadoras intracelulares que se activan de forma secuencial están preensambladas por una proteína de armazón de gran tamaño y forman un complejo de señalización unido al receptor inactivo. En otros casos, el complejo preensamblado se une al receptor sólo después de que este haya sido activado. (B) Complejo de señalización que se ensambla a un receptor tras la unión de una molécula señal extracelular que activa al receptor; en este caso, el receptor activado se autofosforila en varios sitos, los cuales actúan como lugares de unión para proteínas señalizadoras intracelulares. (C) Activación de un receptor como respuesta al aumento de fosforilación de un fosfolípido determinado (un fosfoinositol) de la membrana adyacente, que entonces actúa como lugar de unión de determinadas proteínas señalizadoras intracelulares, las cuales ahora pueden interactuar entre sí.

Las interacciones entre las proteínas de señalización intracelulares están mediadas por dominios de interacción modulares

A veces resulta suficiente unir las proteínas señalizadoras intracelulares para activarlas. Así, la *proximidad inducida*, en la que una señal provoca el ensamblaje del complejo de señalización, se utiliza habitualmente para transmitir señales de una proteína a otra a lo largo de una vía de señalización. El ensamblaje de estos complejos depende de varios **dominios de interacción**, pequeños y muy conservados que se hallan en muchas proteínas señalizadoras intracelulares. Cada uno de estos módulos proteicos compactos se une a un motivo estructural específico de otra molécula proteica (o lipídica) con el cual interactúa la proteína seña-

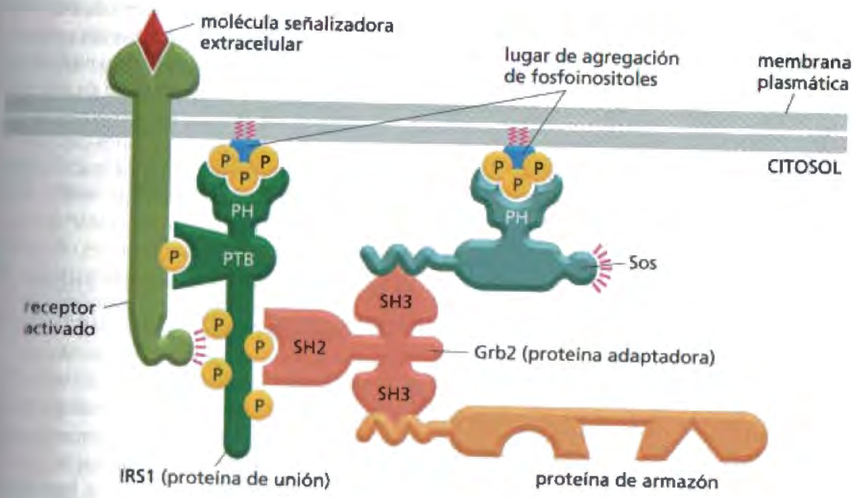


Figura 15–22 Un complejo de señalización específico formado utilizando dominios modulares de interacción. Este ejemplo está basado en el receptor de la insulina, que es un receptor acoplado a enzima (un receptor tirosina quinasa, se explica más adelante). Primero, el receptor activado se autofosforila sobre tirosinas y una de las fosfotirosinas recluta una proteína de acoplamiento llamada IRS1 (*insulin receptor substrate*-1; sustrato 1 del receptor de insulina) a través de un dominio PTB de IRS1; el dominio PH de IRS1 también se une a fosfoinositoles específicos de la cara interna de membrana plasmática. Después, el receptor activado fosforila a IRS1 en tirosinas y una de estas fosfotirosinas recluta la proteína adaptadora (Grb2) a través del dominio SH2 de Grb2. Entonces, Grb2 utiliza uno de sus dos dominios SH3 para unir una región rica en prolinas de la proteína activadora de GTPasa monomérica denominada Sos (una Ras-EGF, se explica más adelante) que también se une a varios fosfoinositoles de la membrana plasmática a través de su dominio PH. Grb2 utiliza su otro dominio SH3 para unir una proteína de armazón rica en prolinas. Esta proteína de armazón une varias proteínas señalizadoras y las otras tirosinas fosforiladas de IRS1 reclutan otras proteínas señalizadoras que tienen dominios SH2 (no se muestra aquí).

estructura. El motivo reconocido en la proteína con la que interacciona puede ser una corta secuencia peptídica, una modificación covalente (como un aminoácido fosforilado o ubiquitinado) u otro dominio proteico. Probablemente la utilización de dominios modulares de interacción facilita la evolución de nuevas vías de señalización; dado que se pueden insertar casi en cualquier sitio de una proteína sin alterar ni su plegamiento ni su función, la adición de un nuevo dominio de interacción a una proteína señalizadora ya existente puede conectar esta proteína a una nueva vía de señalización.

Existen muchos tipos de dominios de interacción en las proteínas señalizadoras. Por ejemplo, los *dominios de homología Src2* (*SH2*: *Src* ***homology 2***) y los *dominios de unión a fosfotirosinas* (*PTB*: ***phosphotyrosine binding***) se unen a tirosinas fosforiladas de una determinada secuencia peptídica de receptores activados o de proteínas señalizadoras intracelulares. Los *dominios de homología Src3 (SH3)* se unen a cortas secuencias de aminoácidos ricas en prolina. Algunos dominios de *homología a Plecstrina* (*PH*: ***Pleckstrin homology***) se unen a los grupos cabeza cargados eléctricamente de fosfoinositoles que se producen en la membrana plasmática en respuesta a una señal extracelular, facilitando que la proteína de la que forman parte se fije en la membrana y que pueda interactuar con otras proteínas de señalización reclutadas de forma similar (véase Figura 15–21C). Algunas proteínas señalizadoras únicamente están formadas por dos o más dominios de interacción y sólo funcionan como adaptadores que mantienen juntas a otras dos proteínas de una vía de señalización.

Algunos receptores de superficie celular y algunas proteínas señalizadoras intracelulares se agrupan de forma transitoria y forman microdominios específicos de la bicapa lipídica de la membrana plasmática, enriquecidos en colesterol y glucolípidos (véase Figura 10-13). Estas *balsas lipídicas* pueden promover una señalización eficiente al actuar como lugares donde las moléculas de señalización pueden ensamblarse e interaccionar pero su importancia en la señalización sigue siendo controvertida.

Otro sistema de unir receptores y proteínas señalizadoras intracelulares consiste en concentrarlas en regiones específicas de la célula. Un importante ejemplo es el **cilio primario** que se proyecta como una antena desde la superficie de varios tipos celulares de vertebrados (se describe en el Capítulo16). Es muy corto y no es móvil, y tiene microtúbulos en su interior y sobre él se concentran varios receptores de superficie y proteínas de señalización. Veremos más adelante que en cilios especializados se presentan elevadas concentraciones de receptores a la luz y a los olores.

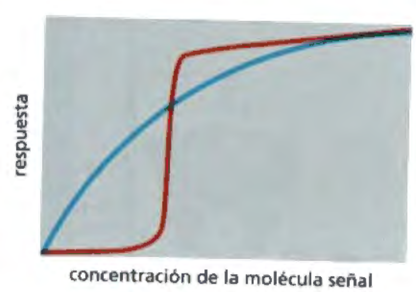


Figura 15–23 Respuestas graduales de señalización y respuestas semejantes a un interruptor. Algunas respuestas celulares aumentan de forma gradual con el incremento de la concentración de una molécula señal extracelular (*línea azul*). En otros casos, cuando la señal aumenta más allá de cierto valor crítico, la respuesta celular cambia bruscamente a un estado diferente (*línea roja*).

Las células pueden utilizar varios mecanismos para responder de forma súbita a incrementos graduales de la concentración de una señal extracelular

Algunas respuestas celulares a moléculas señal extracelulares aumentan gradualmente de acuerdo con la concentración de la molécula señal. En otros casos la relación entre la señal y la respuesta puede ser discontinua, o del tipo "todo o nada", con un cambio súbito de la respuesta cuando la concentración de la señal sobrepasa un cierto valor umbral (**Figura 15–23**).

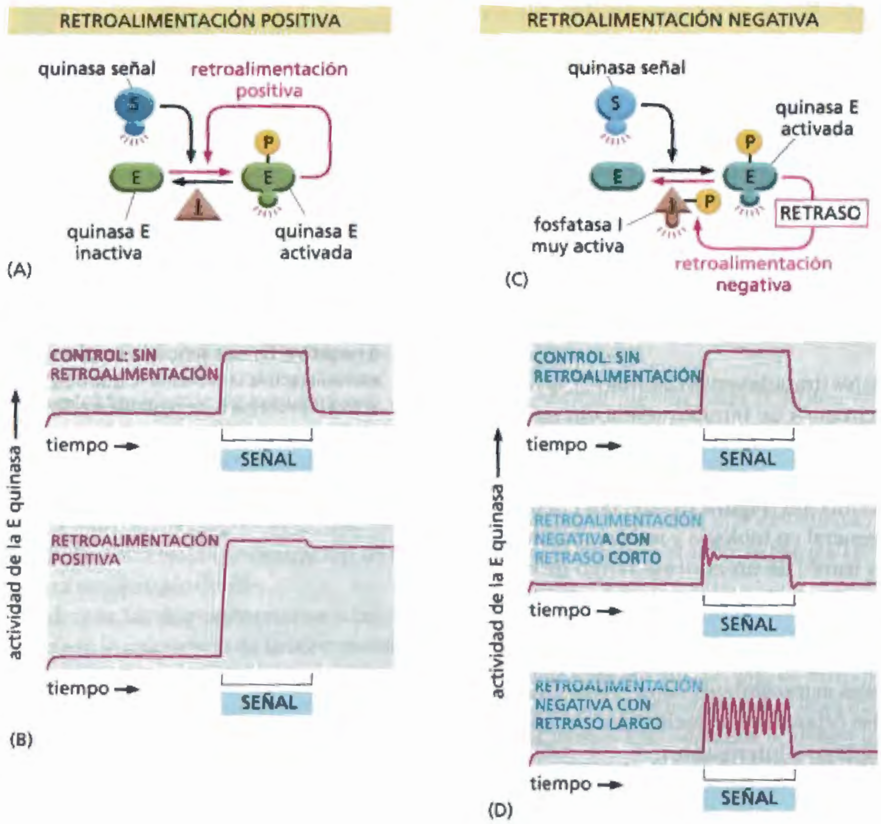


Figura 15–28 Algunos de los efectos de una retroalimentación sencilla. Las gráficas muestran los efectos de circuitos sencillos de retroalimentación positiva o negativa. En cada caso la señal de entrada es una proteína quinasa (S) activada, que fosforila y, por tanto, activa a otra proteína quinasa (E); una proteína fosfatasa (I) desfosforila, e inactiva, a la quinasa E activa. En las gráficas, la línea *roja* indica la actividad de la quinasa E a lo largo del tiempo; la barra *azul* horizontal indica el tiempo durante el cual está presente la señal de entrada (la quinasa S activada). (A) Diagrama del circuito de retroalimentación positiva en el que la quinasa activada E actúa sobre la reacción anterior estimulando su propia fosforilación y activación; la actividad basal de la fosfatasa I desfosforila la quinasa E activada a una baja velocidad. (B) La gráfica superior muestra que sin retroalimentación la actividad de la quinasa E es sencillamente proporcional (con un intervalo de tiempo corto) al nivel de estimulación por la quinasa S. La gráfica inferior muestra que con el circuito de retroalimentación negativa el sistema es biestable (es decir, es capaz de existir en dos estados diferentes): la estimulación transitoria por la quinasa S cambia el sistema del estado "no" al estado "sí", el cual entonces se mantiene después de que el estímulo se haya eliminado. (C) Diagrama del circuito de retroalimentación negativa en el que la quinasa E activada fosforila y activa la fosfatasa I, incrementando así la velocidad a la que la fosfatasa desfosforila e inactiva la quinasa E fosforilada. La gráfica superior muestra de nuevo la respuesta de la actividad de la quinasa E sin retroalimentación. Las otras dos gráficas muestran el efecto sobre la actividad de la quinasa E de una retroalimentación negativa que actúa con un retraso corto o largo. En el caso de un retraso corto, el sistema da una respuesta fuerte pero corta cuando la señal cambia de forma abrupta; entonces, la retroalimentación dirige la respuesta de nuevo hacia abajo hasta un nivel menor. Tras un corto retraso, la retroalimentación produce una serie de oscilaciones mantenidas mientras esté presente el estímulo.

Pequeños cambios en los detalles de la retroalimentación pueden alterar de forma radical el modo en el que responde el sistema, incluso en este ejemplo tan sencillo; la figura únicamente muestra un pequeño ejemplo de posibles comportamientos.

sufrir ninguna alteración en la secuencia de su DNA; esta alteración de su estado se transmite a las células hijas. Este tipo de mecanismos de herencia se denominan *epigenéticos*, en contraposición con los mecanismos genéticos, en los que participan mutaciones del DNA. De ellos tratamos con más detalle en el Capítulo 7 (véase Figura 7–86).

En contraposición con la retroalimentación positiva, un **circuito de retroalimentación negativa** contrarresta el efecto del estímulo y, por tanto, abrevia y limita el nivel de respuesta, haciendo que el sistema sea menos sensible a las perturbaciones. Sin embargo, como en el caso de la retroalimentación positiva, cuando la retroalimentación actúa de forma potente se pueden obtener fenómenos cualitativamente diferentes. Una retroalimentación negativa retrasada con un periodo de retraso suficiente puede producir respuestas oscilatorias. Las oscilaciones pueden persistir mientras dure el estímulo (Figura 15–28C) o, incluso, pueden generarse espontáneamente sin necesidad de que ninguna señal externa las inicie (véase Figura 22–82). Al final de este capítulo encontraremos varios ejemplos de comportamientos oscilatorios de este tipo en respuestas intracelulares a señales extracelulares; todos ellos dependen de retroalimentaciones negativas.

Si la retroalimentación negativa actúa con un retraso breve, el sistema se comporta como un detector de cambios. Genera una amplia respuesta a un estímulo, pero la respuesta decae con rapidez aunque el estímulo persista; sin embargo, si el estímulo aumenta abruptamente el sistema vuelve a responder de forma amplia y, de nuevo, la respuesta volverá a decaer. Se trata del fenómeno de la *adaptación*, del que hablaremos a continuación.

Las células pueden ajustar su sensibilidad frente a una señal

En respuesta a muchos tipos de estímulos, las células y los organismos tienen la capacidad de detectar el mismo porcentaje de cambio en una señal sobre un rango muy amplio de intensidades de dichos estímulos. Las células diana consiguen hacerlo a través de un proceso reversible de **adaptación**, o **desensibilización**, mediante el cual una exposición prolongada a un estímulo disminuye la respuesta de las células a este nivel de estímulo. En la señalización química, esta adaptación permite a las células responder a *cambios* en la concentración de una molécula señalizadora extracelular (y no a una concentración absoluta de esta molécula) dentro de un amplio rango de concentraciones de señalización. El mecanismo

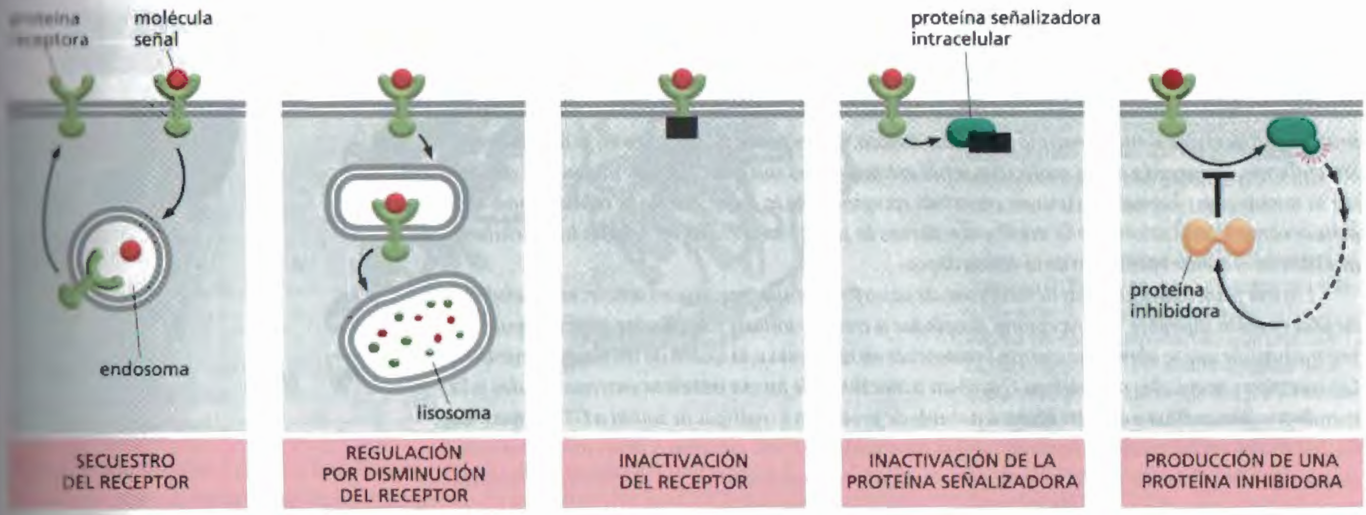


Figura 15–29 Algunos mecanismos que permiten la desensibilización (adaptación) de las células diana a una molécula señal extracelular. Los mecanismos que se muestran, que actúan a nivel de receptor, a menudo implican la fosforilación o ubiquitinización de la proteína receptora. Sin embargo, en la quimiotaxis bacteriana, como se analizará posteriormente, la adaptación depende de la metilación de las proteínas receptoras.

subyacente consiste en una retroalimentación negativa que actúa con un retraso corto. Una respuesta intensa modifica la maquinaria responsable de dicha respuesta, de manera que la maquinaria se vuelve menos sensible a este mismo nivel de señal (véase Figura 15–28D, gráfica central). Sin embargo, debido al retraso, un incremento súbito de la señal es capaz de estimular la célula de nuevo durante un breve periodo de tiempo antes de que la retroalimentación negativa tenga tiempo de actuar.

La desensibilización a una molécula señal ocurre de diversas maneras. Puede producirse debido a una inactivación de los propios receptores. Por ejemplo, la unión de moléculas señalizadoras a receptores de la superficie celular induce su endocitosis y el secuestro temporal de los receptores en endosomas. En algunos casos, esta endocitosis del receptor inducida por su ligando puede llevar a la destrucción de los receptores en los lisosomas, un proceso denominado *regulación por disminución (down-regulation) del receptor*; en otros casos, sin embargo, los receptores activados continúan la señalización después de haber sido endocitados, como se describirá más adelante. Los receptores también se desensibilizan (inactivan) sobre la propia superficie celular, por ejemplo como consecuencia de una fosforilación o metilación del receptor que ocurra de manera retardada tras su activación. La desensibilización también se produce en lugares corriente abajo del receptor, tanto por cambios en las proteínas señalizadoras intracelulares que participan en la transducción de la señal extracelular, como por la producción de una proteína inhibidora que bloquea el proceso de transducción de la señal. En la **Figura 15–29** se comparan estos diferentes mecanismos de desensibilización.

Después de explicar los principios generales de la señalización celular, a continuación se tratarán los receptores acoplados a proteína G, que son con diferencia la clase más abundante de receptores de superficie y median respuestas a los más diversos tipos de señales extracelulares.

Resumen

Cada una de las células de un animal pluricelular está programada durante el desarrollo para responder a un conjunto específico de moléculas señal extracelulares producidas por otras células. Estas moléculas señalizadoras actúan en varias combinaciones regulando el comportamiento de la célula. La mayoría de las moléculas señalizadoras actúan como mediadores locales que son secretados y rápidamente captados, destruidos o inmovilizados, de forma que sólo pueden actuar sobre las células vecinas. Otras moléculas señalizadoras se mantienen unidas a la cara externa de la célula señalizadora, mediando así una señalización dependiente de contacto. Existen además dos tipos diferentes de señalización a larga distancia. En la señalización endocrina, las hormonas secretadas por las células endocrinas son transportadas por la sangre hasta las células diana de todo el cuerpo. En la señalización sináptica, los neurotransmisores secretados por los axones de las células nerviosas actúan localmente sobre las células postsinápticas con las que los axones han entrado en contacto.

La señalización celular requiere no sólo moléculas señal extracelulares sino también un conjunto complementario de proteínas receptoras expresadas por las células diana que unen de forma específica las moléculas señalizadoras. Algunas pequeñas moléculas hidrofóbicas, incluyendo las

hormonas esteroideas y tiroideas, difunden a través de la membrana plasmática de la célula diana y activan proteínas receptoras intracelulares, que regulan directamente la transcripción de genes diana específicos. Algunos gases en solución, como el óxido nítrico y el monóxido de carbono, actúan como mediadores locales difundiendo a través de la membrana de la célula diana y activando una proteína intracelular como la enzima guanilato ciclasa, que produce GMP cíclico en la célula diana. Sin embargo, la mayoría de las moléculas señal extracelulares son hidrofílicas y no pueden atravesar la membrana plasmática. Activan proteínas receptoras de la superficie de la célula diana, que actúan como transductores de la señal y convierten la señal extracelular en señales intracelulares que alteran el comportamiento de la célula diana.

Las tres principales familias de receptores de superficie celular transducen señales extracelulares de una manera diferente. Los receptores acoplados a canales iónicos son canales iónicos regulados por transmisor que se abren o se cierran brevemente en respuesta a la unión de un neurotransmisor. Los receptores acoplados a proteínas G activan o inactivan de forma indirecta enzimas unidas a la membrana plasmática o canales iónicos, a través de proteínas triméricas de unión a GTP (proteínas G). Los receptores acoplados a enzimas actúan directamente como enzimas o están asociados a enzimas; estas enzimas son por lo general proteínas quinasa que fosforilan los receptores y proteínas señalizadoras específicas de la célula diana.

Una vez activados, los receptores acoplados a proteínas G y los receptores acoplados a enzimas transmiten la señal por el interior de la célula activando cadenas de proteínas intracelulares de señalización. Algunas de ellas actúan como interruptores que son transitoriamente activados par fosforilación o por unión a GTP. Se forman grandes complejos de señalización funcionales mediante dominios modulares de interacción presentes en las proteínas señalizadoras; estos dominios permiten que las proteínas formen complicadas redes funcionales de señalización.

Las células diana pueden utilizar una gran variedad de mecanismos intracelulares, incluyendo los circuitos de retroalimentación, para ajustar la forma en la que responden a señales extracelulares. Los circuitos de retroalimentación positiva pueden ayudar a la célula a responder de forma todo o nada a un incremento gradual en la concentración de una señal extracelular o a convertir una señal de corta duración en una respuesta de larga duración o incluso irreversible. La retroalimentación negativa retrasada permite a la célula desensibilizarse a una molécula señal, lo cual posibilita responder a pequeñas variaciones de la concentración de la molécula señal en un amplio rango de concentraciones.

SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DE RECEPTORES DE SUPERFICIE CELULAR ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCR) Y MEDIADORES INTRACELULARES PEQUEÑOS

Todos los eucariotas utilizan **receptores acoplados a proteínas G** (**GPCR**: *G-protein-coupled receptors*). Constituyen la mayor familia de receptores de superficie celular y median la mayoría de las respuestas celulares a señales del mundo exterior así como a señales procedentes de otras células incluyendo hormonas, neurotransmisores y mediadores locales. Nuestros sentidos de la vista, el olfato y el gusto (con la posible excepción del gusto ácido) dependen de ellos. En humanos existen más de 700 GPCR y en el ratón más de 1000 únicamente relacionados con el sentido del olfato. Las moléculas señal que actúan sobre GPCR son de estructura tan variada como lo es su función, e incluyen: proteínas y pequeños péptidos así como derivados de aminoácidos y de ácidos grasos, para no mencionar los fotones de la luz y todas las moléculas que podemos oler y degustar. Una misma molécula señalizadora puede activar muchos miembros diferentes de la familia GPCR; por ejemplo, la adrenalina activa al menos 9 GPCR diferentes, la acetilcolina a otros 5 y el neurotransmisor serotonina al menos a 14. Por lo general, los diferentes receptores para una misma señal se expresan en tipos celulares diferentes y provocan respuestas diferentes.

Figura 15–30 Dibujo esquemático de un receptor acoplado a una proteína G (GPCR: ***G-protein-coupled receptors***). Los GPCR que unen ligandos proteicos tienen un gran dominio extracelular de unión formado por la parte de la cadena polipeptídica que se muestra en *verde claro*. Este dominio junto con algunos de los segmentos transmembrana une al ligando proteico. Los receptores para ligandos pequeños, como es la adrenalina, tienen dominios extracelulares pequeños y por lo general el lugar de unión se halla incrustado en el plano de la membrana, formado por aminoácidos de varios de los segmentos transmembrana

A pesar de la diversidad química y funcional de las moléculas señal que los activan, todos los GPCR tienen una estructura similar. Están formados por una sola cadena polipeptídica que atraviesa siete veces, arriba y abajo, la bicapa lipídica (**Figura 15–30**). Además de su orientación característica en la membrana plasmática, todos ellos utilizan las proteínas G para transmitir la señal hacia el interior de la célula.

La superfamilia GPCR incluye la *rodopsina*, la proteína localizada en la retina de los ojos de los vertebrados y que es activada por la luz, así como una gran cantidad de receptores olfativos localizados en la nariz de los vertebrados. En los organismos unicelulares también se

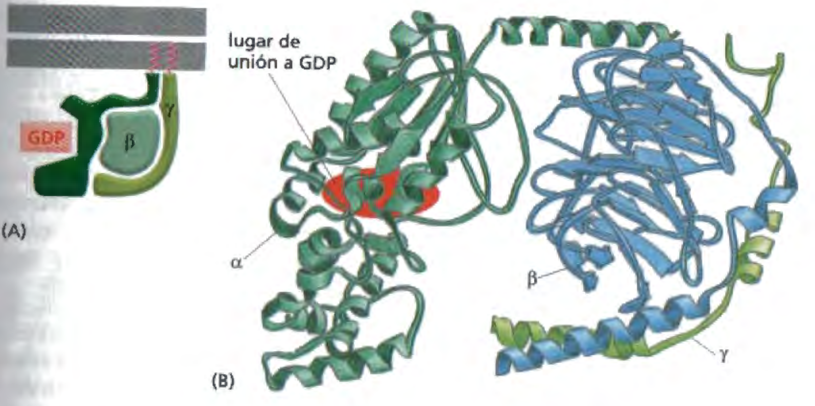


Figura 15–31 Estructura de una proteína G inactiva. (A) Nótese que tanto la subunidad α como la γ están unidas covalentemente a moléculas lipídicas (en *rojo*) que contribuyen a unirlas a la membrana plasmática y que la subunidad α une GDP. (B) Estructura tridimensional de una proteína G inactiva, basada en la transducina, la proteína G implicada en la transducción visual (se tratará más adelante). La subunidad α contiene el dominio GTPasa, y se une a un extremo de la subunidad β, la cual fija el dominio GTPasa en una conformación inactiva que une GDP. La subunidad γ se une al lado opuesto de la subunidad β, y las subunidades β y γ forman una unidad funcional. (B, basado en D.G. Lombright et al., *Nature* 379:311-319, 1996. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

encuentran miembros de esta familia: un ejemplo de ellos son los receptores de las levaduras que reconocen los factores de acoplamiento. Es probable que los GPCR que median la señalización célula-célula en los organismos pluricelulares hayan evolucionado a partir de receptores sensoriales de sus antepasados unicelulares.

Cabe destacar que cerca de la mitad de los fármacos conocidos actúan a través de GPCR o de las vías de señalización que activan los GPCR. De entre los varios cientos de genes que en el genoma humano codifican GPCR, unos 150 codifican receptores huérfanos, es decir, de los que todavía se desconoce su ligando. Muchos son susceptibles de ser diana de nuevos fármacos aún sin identificar.

Las proteínas G triméricas transmiten señales intracelulares desde GPCR

Cuando una molécula señalizadora extracelular se une a un GPCR, el receptor sufre un cambio conformacional que le permite activar una **proteína trimérica de unión a GTP (proteína G)**. La proteína G está unida a la cara citoplasmática de la membrana plasmática, donde acopla funcionalmente el receptor a enzimas o a canales iónicos de esta membrana. En algunos casos la proteína G está asociada de forma física con el receptor antes de que el receptor sea activado, mientras que en otros sólo se une después de la activación del receptor. Existen diversos tipos de proteínas G, cada una de las cuales es específica de un conjunto determinado de GPCR y de un conjunto particular de proteínas diana de la membrana plasmática. Sin embargo, todos ellos tienen una estructura similar y funcionan de una manera similar.

Las proteínas G están compuestas por tres subunidades proteicas diferentes: α, β y γ. En el estado no estimulado, la subunidad α une GDP y la proteína G en cambio está inactiva (**Figura 15–31**). Cuando un GPCR es activado, actúa como un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF: ***guanine nucleotide exchange factor***) e induce a la subunidad α a que libere el GDP al que está unido permitiendo que en su lugar se una un GTP. Este intercambio provoca un gran cambio conformacional en la proteína G, que se activa. Al principio se creyó que la activación siempre producía que el trímero se disociara en dos componentes activados: una *subunidad α* y un *complejo βγ*. Sin embargo hoy tenemos evidencias de que, al menos en algunos casos, el cambio de conformación expone superficies que antes estaban escondidas entre la subunidad α y el complejo βγ de forma que ahora tanto la subunidad α como el complejo βγ pueden interactuar con sus dianas sin que sea necesario que las subunidades se disocien (**Figura 15–32**). Estas dianas pueden ser enzimas o canales iónicos de la membrana plasmática, que transmiten la señal siguiendo la vía de señalización.

La subunidad α es una GTPasa, que cuando hidroliza el GTP que lleva unido hasta GDP, se inactiva. El tiempo durante el cual la proteína G permanece activa depende la velocidad a la que la subunidad α hidroliza el GTP que lleva unido. Por lo general este intervalo es muy corto porque la actividad GTPasa aumenta mucho debido a la unión de una segunda proteína que puede ser su proteína diana o **regulador de la señalización de proteínas G (RGS**: ***regulator of G protein signaling***). Las proteínas RGS actúan como proteínas activadoras de GTPasa (GAP: ***GTPase-activating protein***) específicas de la subunidad α (véase Figura 15–19), y ayudan a "apagar" las respuestas mediadas por proteínas G en todos los eucariotas. En el genoma humano existen unas 25 RGS, cada una de las cuales interacciona con un conjunto determinado de proteínas G.

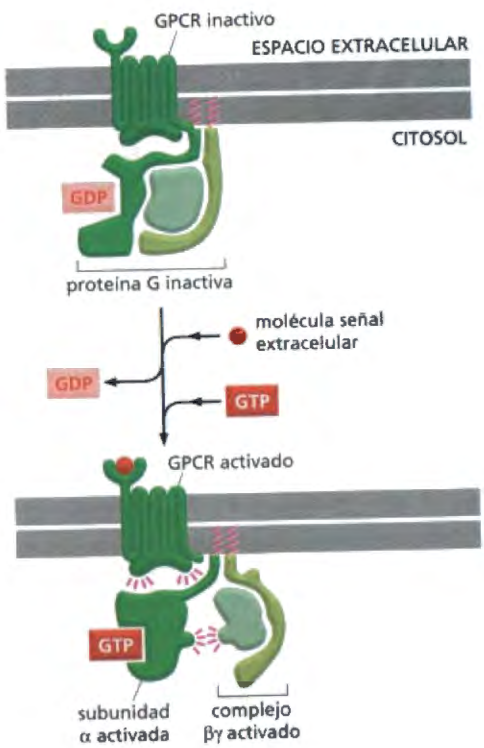


Figura 15-32 Activación de una proteína G mediante un GPCR activado. La unión de una señal extracelular a un GPCR cambia la conformación del receptor, lo que a su vez altera la conformación de la proteína G. La alteración de la subunidad α de la proteína G permite que intercambie su GDP por un GTP, activando tanto la subunidad α, como el complejo βγ, y ambos puedan regular la actividad de proteínas diana en la membrana plasmática. El receptor permanece activo mientras la molécula señal externa se mantenga unida a él, de forma que puede catalizar la activación de muchas moléculas de proteínas G, que una vez activadas se disocian del receptor (no mostrado aquí). En algunos casos, cuando la proteína G está activada, la subunidad α y el complejo βγ se disocian una de otra.

Las GPCR activan varias vías de señalización intracelular, incluyendo algunas que también están activadas por receptores acoplados a enzimas. En esta sección, sin embargo, nos centraremos sobre las vías activadas por GPCR que utilizan mediadores intracelulares pequeños.

Algunas proteínas G regulan la producción de AMP cíclico

El **AMP cíclico** (**cAMP**: *cyclic AMP*) es un pequeño mediador intracelular de todas las células procariotas y de todos los animales en los que se ha estudiado. La concentración intracelular normal de AMP cíclico es de alrededor de 10^{-7} M, pero una señal extracelular puede incrementarla más de veinte veces en cuestión de segundos (**Figura 15-33**). Como hemos explicado antes (véase la Figura 15-11), una respuesta tan rápida como ésta requiere que la molécula se sintetice rápidamente y que esta alta velocidad de síntesis esté compensada por una rápida degradación o eliminación de ella. El AMP cíclico se sintetiza a partir de ATP mediante una enzima unida a la membrana plasmática, la **adenilato ciclasa** y es rápida y continuamente destruido mediante varias **fosfodiesterasas de AMP cíclico**, que hidrolizan el AMP cíclico a adenosina 5´-monofosfato (5´-AMP) (**Figura 15-34**).

Muchas moléculas señalizadoras extracelulares actúan controlando la concentración de AMP cíclico mediante el aumento de la actividad de la adenilato ciclasa sin variar la actividad de la fosfodiesterasa. La adenilato ciclasa es una gran proteína transmembrana multipaso con el dominio catalítico en la cara citosólica de la membrana plasmática. En mamíferos al menos

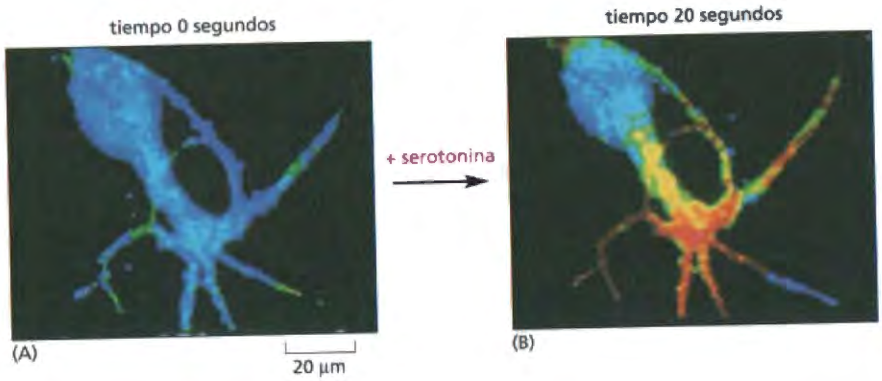


Figura 15-33 Aumento de AMP cíclico en respuesta a una señal extracelular. Esta célula nerviosa en cultivo responde a la unión del neurotransmisor serotonina a un GPCR, aumentando los niveles intracelulares de AMP cíclico. El nivel de AMP cíclico intracelular fue registrado mediante la administración a la célula de una proteína fluorescente cuya fluorescencia varía cuando se une a AMP cíclico. El color *azul* indica niveles bajos de AMP cíclico; el *amarillo* niveles intermedios, y el *rojo*, niveles altos. (A) En la célula en reposo, el nivel de AMP cíclico es de 5×10^{-8} M. (B) Veinte segundos después de la adición de serotonina al medio de cultivo, el nivel intracelular de AMP cíclico en algunas zonas relevantes de la célula ha aumentado a más de 10^{-6} M, un aumento de más de veinte veces. (De Brian J. Bacskai et al., *Science* 260:222-226, 1993. Con la autorización de AAAS.)

Hay ocho isoformas, muchas de las cuales están reguladas tanto por proteínas G como por Ca^{2+}. Los GPCR que actúan aumentando el AMP cíclico están acoplados a una **proteína G estimuladora (G_s**: *stimulatory G protein*), que activa la adenilato ciclasa con lo que aumenta la concentración de AMP cíclico. Otra proteína G, denominada **proteína G inhibidora (G_i**: *inhibitory G protein*), inhibe la adenilato ciclasa, pero actúa sobre todo regulando de forma directa canales iónicos (como describiremos posteriormente).

Tanto G_s como G_i son diana de diversas toxinas bacterianas de importancia médica. La *toxina colérica*, producida por la bacteria que causa el cólera, es una enzima que cataliza la transferencia de ADP-ribosa procedente de NAD^+ intracelular a la subunidad α de G_s. Esta ADP-ribosilación altera la subunidad α de G_i haciendo que pierda la capacidad de hidrolizar el GTP que tiene unido. Las moléculas de adenilato ciclasa activadas por estas subunidades α alteradas permanecen activas indefinidamente. La elevación prolongada de la concentración de AMP cíclico en las células epiteliales intestinales provoca un gran eflujo de Cl^- y de agua en el intestino que es responsable de la grave diarrea característica del cólera. La *toxina pertussis*, sintetizada por la bacteria que causa la tos ferina, cataliza la ADP-ribosilación de la subunidad α de G_i impidiendo que la proteína pueda interaccionar con los receptores; como resultado de ello, la proteína G retiene el GDP que lleva unido y pierde la capacidad de regular sus proteínas diana. Ambas toxinas son herramientas muy utilizadas experimentalmente para determinar si una respuesta celular a una señal dependiente de GPCR de una célula está mediada por G_s o por G_i.

En la **Tabla 15–1** se listan algunas de las respuestas mediadas por un incremento de la concentración de AMP cíclico estimulado por G_s. Como muestra la tabla, diferentes células diana responden de forma muy diferente a un incremento de la concentración de AMP cíclico. Sin embargo, generalmente cada tipo determinado de célula diana siempre responde de la misma manera a este incremento con independencia de cuál sea la señal extracelular que lo cause. Por ejemplo, por lo menos cuatro hormonas activan la adenilato ciclasa en las células del tejido adiposo y todas ellas estimulan la degradación de triacilglicéridos (la forma de almacenamiento de las grasas) hasta ácidos grasos (véase la Tabla 15–1)

Los individuos que son genéticamente deficientes en una determinada subunidad α de G_s presentan respuestas disminuidas a ciertas hormonas. Como consecuencia de ello, estas personas presentan trastornos metabólicos y en el desarrollo de los huesos y retraso mental.

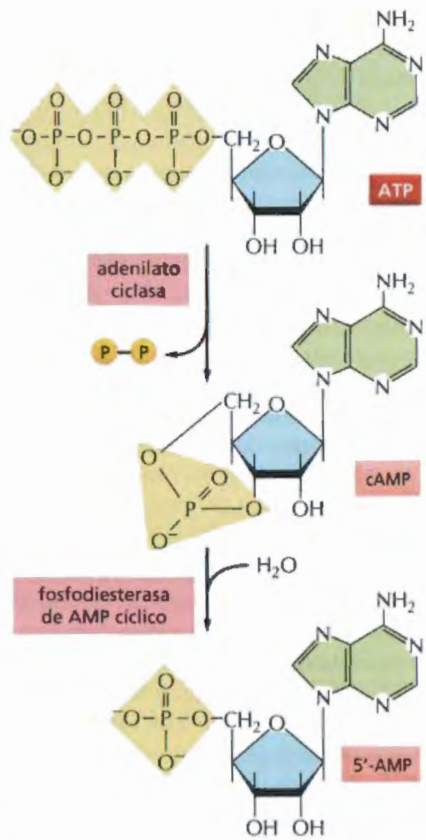


Figura 15–34 Síntesis y degradación del AMP cíclico. En la reacción catalizada por la adenilato ciclasa, el AMP cíclico (cAMP) se sintetiza a partir de ATP mediante una reacción de ciclación que elimina dos grupos fosfato en forma de pirofosfato (Ⓟ–Ⓟ). Una pirofosfatasa hidroliza el pirofosfato que se libera en esta reacción (no se muestra) haciendo que la síntesis de AMP cíclico sea un proceso irreversible. Como se indica en la figura, el AMP cíclico es una molécula de vida corta (inestable) en la célula porque es hidrolizado por fosfodiesterasas específicas formando 5´-AMP.

La proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) media la mayoría de los efectos del AMP cíclico

En la mayoría de las células animales, el AMP ejerce sus efectos principalmente activando la enzima **proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA)**. Esta quinasa fosforila serinas y treoninas de determinadas proteínas diana, incluyendo proteínas señalizadoras intracelulares y proteínas efectoras, regulando así su actividad.

Tabla 15–1 Algunas respuestas celulares inducidas por hormonas, que son mediadas por AMP cíclico

TEJIDO DIANA	HORMONA	RESPUESTA PRINCIPAL
Glándula tiroides	hormona estimuladora de la tiroides (TSH)	síntesis y secreción de hormonas tiroideas
Corteza adrenal	hormona adrenocorticotropa (ACTH)	secreción de cortisol
Ovario	hormona luteinizante (LH)	secreción de progesterona
Músculo	adrenalina	degradación de glucógeno
Hueso	parathormona	resorción del hueso
Corazón	adrenalina	incremento de la frecuencia cardíaca y de la fuerza de contracción del corazón
Hígado	glucagón	degradación de glucógeno
Riñón	vasopresina	reabsorción de agua
Tejido adiposo	adrenalina, ACTH, glucagón, TSH	degradación de triacilglicéridos

Las proteínas diana de la PKA son diferentes en diversos tipos celulares, lo cual explica por qué los efectos del AMP cíclico varían de forma tan marcada en función de las células diana de que se trate (véase Tabla 15–1).

En su estado inactivo, la PKA es un complejo formado por dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras. La unión de AMP cíclico a las subunidades reguladoras altera su conformación, haciendo que se disocien del complejo. Las subunidades catalíticas liberadas resultan activas para fosforilar de forma específica moléculas proteicas diana (**Figura 15–35**). Las subunidades reguladoras de la PKA (también denominadas quinasa-A) tienen un papel importante en la localización intracelular de la quinasa: unas *proteínas de anclaje de la quinasa-A* (*AKAP: **A**-**k**inase **a**nchoring **p**roteins*) especiales se unen tanto a las subunidades reguladoras como a una membrana de un orgánulo o a un componentes del citoesqueleto, secuestrando así al complejo enzimático en un determinado compartimiento celular. Algunas AKAP también se unen a otras proteínas señalizadoras formando un complejo que actúa como un módulo de señalización. Por ejemplo, una AKAP localizada alrededor del núcleo de las células musculares del corazón se une a PKA y a una fosfodiesterasa que hidroliza cAMP. En células no estimuladas, la fosfodiesterasa mantiene baja la concentración local de AMP cíclico de forma que la PKA unida es inactiva; en células estimuladas, la concentración de AMP cíclico aumenta rápidamente superando la actividad de la fosfodiesterasa y activando la PKA. Entre las proteínas diana que fosforila y activa la PKA en estas células, se encuentra la fosfodiesterasa adyacente, que hace disminuir de nuevo con rapidez la concentración de AMP cíclico. Esta distribución transforma lo que de otra manera sería una respuesta suave y prolongada de PKA en un pulso breve y local de actividad PKA.

Mientras que algunas respuestas mediadas por AMP cíclico ocurren en cuestión de segundos y no dependen de variaciones de la transcripción génica (véase la Figura 15–33), otras sí que dependen de variaciones de la transcripción génica y tardan horas en desarrollarse plenamente. Por ejemplo, en las células que secretan la hormona peptídica *somatostatina*, el AMP cíclico activa la expresión del gen que codifica esta hormona. La región reguladora del gen de la somatostatina tiene una corta secuencia de DNA, denominada *elemento de respuesta al AMP cíclico (CRE: **c**yclic AMP **r**esponse **e**lement)*, que también se encuentra en muchas otras zonas reguladoras de genes activados por AMP cíclico. Esta secuencia es reconocida por una proteína específica reguladora de la expresión génica denominada **proteína de unión a CRE** (**CREB**: ***CRE-binding** protein*). Cuando la PKA es activada por cAMP, fosforila CREB sobre una sola serina. Entonces, la CREB fosforilada recluta un coactivador transcripcional llamado *proteína de unión a CREB (CBP: **CREB-binding protein**)*, que estimula la transcripción de los genes diana (**Figura 15–36**). Así, CREB puede transformar una breve señal de AMP cíclico en un cambio a largo plazo de una célula, un proceso que, en el cerebro, parece que desempeña un importante papel en algunas formas de memoria y de aprendizaje.

La PKA no media todos los efectos celulares del AMP cíclico. Como se explicará después, en las neuronas olfativas (responsables del sentido del olfato), el AMP cíclico también activa de forma directa canales iónicos especiales de la membrana plasmática. Además, en algunas otras células activa sin mediación un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) que, a su vez, activa una GTPasa monomérica denominada *Rap1*, la cual a menudo provoca un incremento de la adhesión celular a través de la activación de las *integrinas* de la superficie celular (se trata en el Capítulo 19).

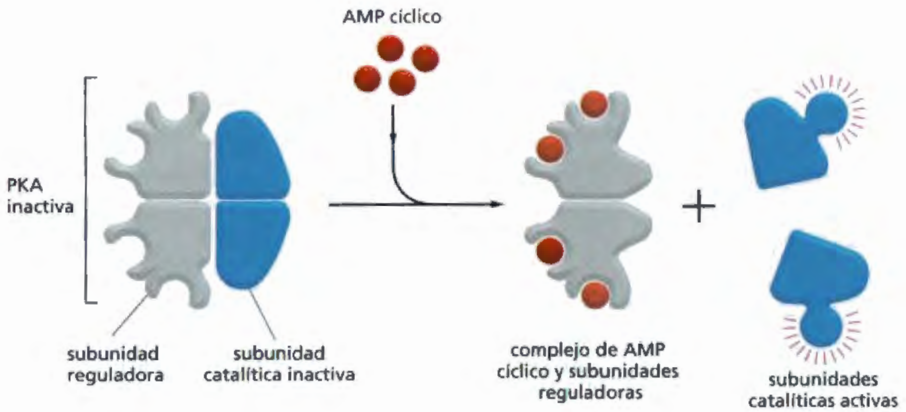


Figura 15–35 Activación de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA). La unión de AMP cíclico a las subunidades reguladoras del tetrámero PKA induce en ellas un cambio de conformación que las hace disociarse de las subunidades catalíticas, activando así la actividad quinasa de dichas subunidades catalíticas. La liberación de las subunidades catalíticas requiere la unión de más de dos moléculas de AMP cíclico al tetrámero. Este hecho hace que la respuesta de la quinasa a los cambios en la concentración de AMP cíclico sea aguda, como se indicó anteriormente (véase la Figura 15–25). En la mayoría de las células de mamífero existen al menos dos tipos de PKA: la de tipo I se halla sobre todo en el citosol, mientras que la de tipo II se halla unida a través de sus subunidades reguladoras y de proteínas de anclaje especiales a la membrana plasmática, a la membrana nuclear, a la membrana mitocondrial externa y a los microtúbulos. En ambos tipos de PKA, cuando las subunidades catalíticas son liberadas y activadas, pueden migrar al núcleo (donde pueden fosforilar proteínas reguladoras de la expresión génica), mientras que las subunidades reguladoras permanecen en el citoplasma. La estructura tridimensional del dominio proteína quinasa de la subunidad catalítica de la PKA se muestra en la Figura 3–65.

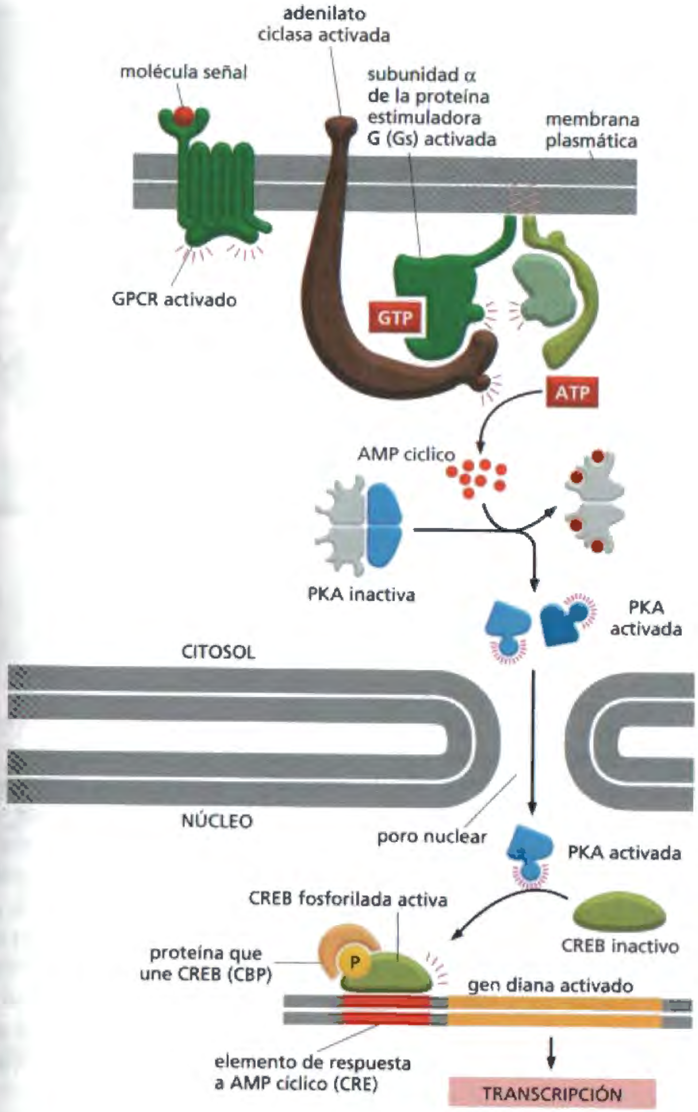


Figura 15–36 Cómo un aumento de la concentración de AMP cíclico intracelular puede alterar la transcripción de un gen. <AGAT> La unión de una molécula señal extracelular a sus GPCR provoca la activación de la adenilato ciclasa a través de G_s y, por tanto, un incremento de la concentración de AMP cíclico en el citosol. El aumento de la concentración de AMP cíclico activa la PKA y libera las subunidades catalíticas de PKA que pueden migrar al núcleo y fosforilar la proteína reguladora de la expresión génica CREB. Una vez fosforilada, CREB recluta al coactivador CBP, estimulando la transcripción génica. Al menos en algunos casos, la proteína CREB inactiva, antes de ser fosforilada, ya está unida al elemento de respuesta al AMP cíclico (CRE) sobre el DNA (no se muestra).

Esta vía de señalización controla muchos procesos de la célula, desde la síntesis de hormonas en las células endocrinas hasta la producción de las proteínas necesarias para la memoria a largo plazo en el cerebro. Veremos más adelante que algunas CREB también pueden ser activadas por otras vías de señalización, independientes de cAMP.

Una vez establecido de qué forma las proteínas G triméricas unen PGCR activadas a la adenil ciclasa, se considerará a continuación de qué forma acoplan GPCR a otra enzima crítica, la *fosfolipasa C*. La activación de esta enzima incrementa la concentración de varios mediadores intracelulares pequeños, incluyendo el Ca^{2+}, que participa en la transmisión de la señal. El Ca^{2+} es utilizado incluso más ampliamente que el AMP cíclico como mediador celular pequeño.

Algunas proteínas G activan una vía de señalización de fosfolípidos de inositol y activan la fosfolipasa C-β

Muchos GPCR ejercen sus efectos principalmente vía proteínas G que activan la enzima unida a membrana plasmática **fosfolipasa C-β** (**PLCβ**: *phospholipase C-β*). En la **Tabla 15–2** se presentan varios ejemplos de respuestas celulares activadas por esta vía. La fosfolipasa actúa sobre un fosfolípido de inositol fosforilado (un *fosfatidilinositol*) denominado **fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato** [**PI(4,5)P$_2$** o **PIP$_2$**], que está presente en bajas cantidades en la mitad interna de la bicapa lipídica de la membrana plasmática (**Figura 15–37**). Los receptores que activan esta mediante esta **vía de señalización por fosfolípidos de inositol** activan sobre todo una proteína G denominada **G$_q$**, la cual a su vez activa la fosfolipasa C-β, de la misma manera que la G_s activa la adenilato ciclasa. La fosfolipasa activada rompe el PIP_2 generando dos productos: *inositol 1,4,5-trisfosfato (IP$_3$)* y *diacilglicerol* (**Figura 15–38**). En este punto, el proceso de señalización se bifurca en dos ramas.

Tabla 15–2 Algunas respuestas celulares en las que GPCR activa PLCβ

TEJIDO DIANA	MOLÉCULA SEÑAL	RESPUESTA PRINCIPAL
Hígado	vasopresina	degradación del glucógeno
Páncreas	acetilcolina	secreción de amilasa
Músculo liso	acetilcolina	contracción muscular
Plaquetas sanguíneas	trombina	agregación plaquetaria

El **inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3)** es una molécula hidrosoluble que actúa como un mediador intracelular pequeño. Se libera de la membrana plasmática y difunde con rapidez por todo el citosol. Cuando llega al retículo endoplasmático (ER), se une y abre los **canales liberadores de Ca^{2+} sensibles a IP_3** (también denominados **receptores de IP_3**) de la membrana del ER. Entonces, el Ca^{2+} que está almacenado en el ER es liberado a través de los canales que se acaban de abrir, aumentando rápidamente la concentración de Ca^{2+} del citosol (**Figura 15–39**). Cuando las reservas de Ca^{2+} del ER se han vaciado, se vuelven a llenar mediante la activación de *canales de Ca^{2+} sensibles a almacenamiento* de la membrana plasmática y una proteína sensora de Ca^{2+} de la membrana del ER en regiones en las que ambas membranas están muy juntas.

Después se describirá cómo el incremento de la concentración de Ca^{2+} propaga la señal y afecta la actividad de proteínas intracelulares sensibles a Ca^{2+}. Para dar por finalizada la respuesta inicial de Ca^{2+} actúan varios mecanismos: (1) el IP_3 es rápidamente desfosforilado a IP_2 mediante una fosfatasa de lípidos específica; (2) el IP_3 es fosforilado a IP_4 mediante una quinasa de lípidos específica (que puede actuar como otro mediador intracelular pequeño); y (3) el Ca^{2+} que entra en el citosol es rápidamente bombeado hacia el exterior, sobre todo hacia el exterior de la célula (véase Figura 15–41).

Al mismo tiempo que el IP_3 producido por la hidrólisis del PIP_2 incrementa la concentración de Ca^{2+} en el citosol, el otro producto de hidrólisis del PIP_2 –el **diacilglicerol**– ejerce efectos bastantes diferentes. También actúa como un mediador intracelular pequeño, pero permanece imbricado en la membrana plasmática, donde ejerce algunas funciones señalizadoras potenciales. Puede ser degradado liberando ácido araquidónico que a su vez puede actuar como una señal o ser utilizado en la síntesis de otras pequeñas moléculas señal lipídicas denominadas *eicosanoides*. La mayoría de los tipos celulares de los vertebrados sintetizan eicosanoides, incluyendo las prostaglandinas, los cuales tienen una gran variedad de

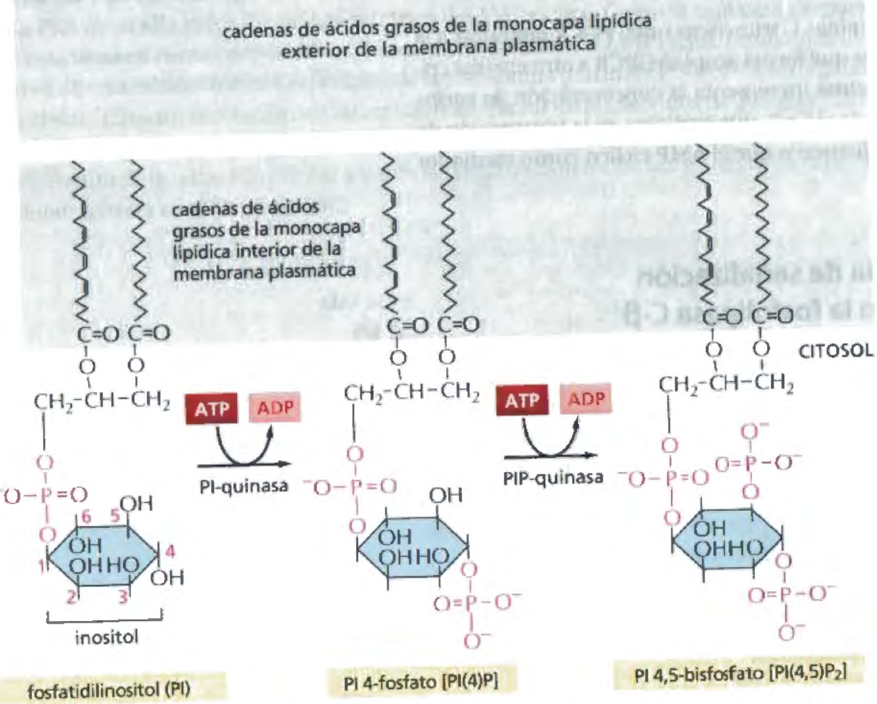


Figura 15–37 Esquema de la síntesis de $PI(4,5)P_2$. Los fosfoinositoles PI(4)P y $PI(4,5)P_2$ se producen mediante la fosforilación del fosfatidilinositol (PI) y PI(4)P, respectivamente. A pesar de que los tres fosfolípidos de inositol pueden romperse durante el proceso de respuesta a una señal, la degradación más predominante y más crítica es la de $PI(4,5)P_2$ porque genera dos mediadores intracelulares, como se muestra en las Figuras 15–38 y 15–39. Sin embargo, $PI(4,5)P_2$ es el menos abundante, ya que constituye menos del 10% del total de fosfolípidos de inositol y alrededor del 1% del total de lípidos en la membrana plasmática. La numeración convencional de los átomos de carbono en el anillo inositol se muestra con *números rojos* en la molécula de PI.

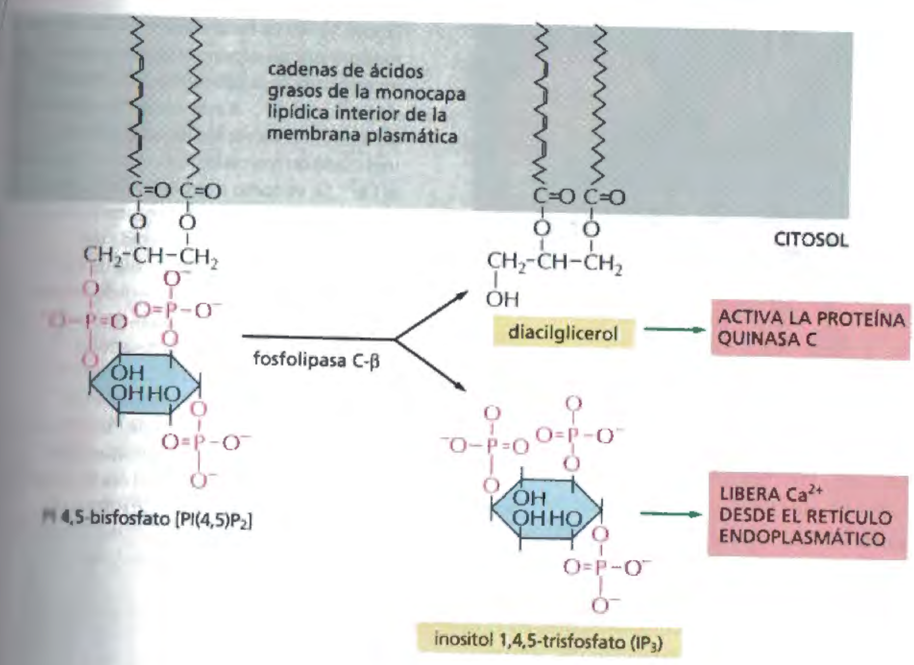


Figura 15–38 Hidrólisis de $PI(4,5)P_2$ por la fosfolipasa C-β. La hidrólisis de PIP_2 produce de forma directa dos pequeños mediadores intracelulares: el inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3), que difunde a través del citosol y provoca la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático, y el diacilglicerol, que permanece en la membrana y colabora en la activación de la enzima proteína quinasa C (PKC; véase Figura 15–39). Existen varias clases de fosfolipasas C; entre ellas se encuentra la clase β, que se activa por GPCR; como veremos más adelante, la clase γ es activada por otra clase de receptores unidos a enzima, denominados receptores tirosina quinasa (RTK).

actividades biológicas. Por ejemplo, participan en la respuesta inflamatoria y a las lesiones; la inhibición de su síntesis es el mecanismo de acción, al menos en parte, de la mayoría de fármacos antiinflamatorios (como la aspirina, el ibuprofeno y la cortisona).

Una segunda función del diacilglicerol consiste en activar una proteína serina/treonina quinasa clave, la **proteína quinasa C** (**PKC:** ***protein kinase C***), denominada así debido a que es dependiente de Ca^{2+}. El incremento inicial de la concentración citosólica de Ca^{2+} inducido por IP_3 altera la PKC, traslocándola desde el citosol hasta la cara citoplasmática de la membrana plasmática. Allí se activa por la combinación de Ca^{2+}, diacilglicerol y el fosfolípido de membrana cargado negativamente, fosfatidilserina (véase Figura 15–39). Una vez activada, la PKC fosforila proteínas diana que varían en función del tipo celular. Los principios son los mismos que los expuestos anteriormente para la PKA, aunque la mayoría de las proteínas diana son diferentes.

Existen diferentes clases de PKC, sólo algunas de las cuales (denominadas *PCK convencionales*) son activadas por Ca^{2+} y diacilglicerol; las otras se denominan *PKC atípicas*. Diferentes PKC fosforilan diferentes sustratos fundamentalmente porque diferentes proteínas de anclaje o de armazón mantienen las distintos PKC en diferentes compartimientos de la célula.

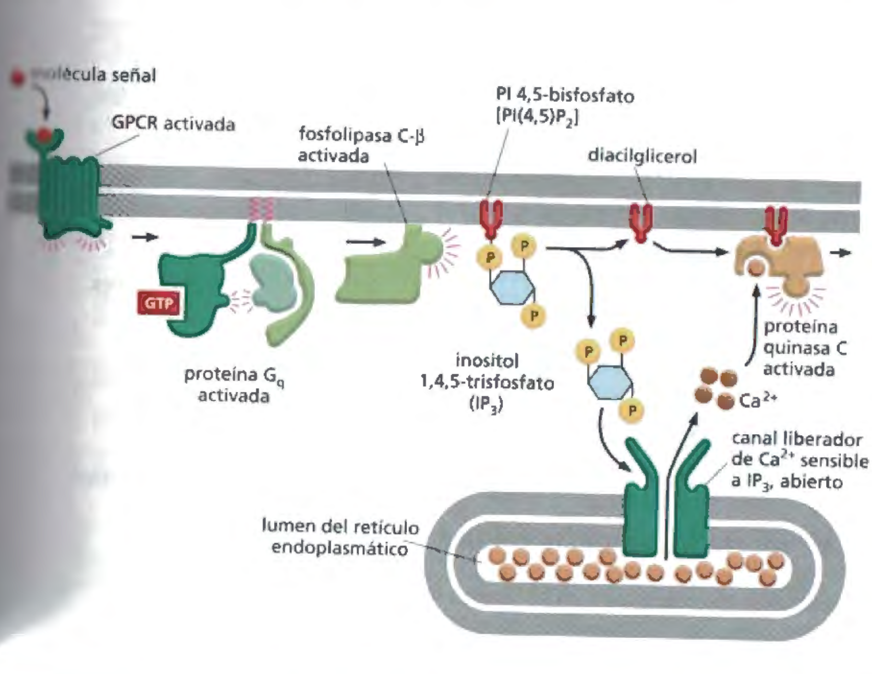
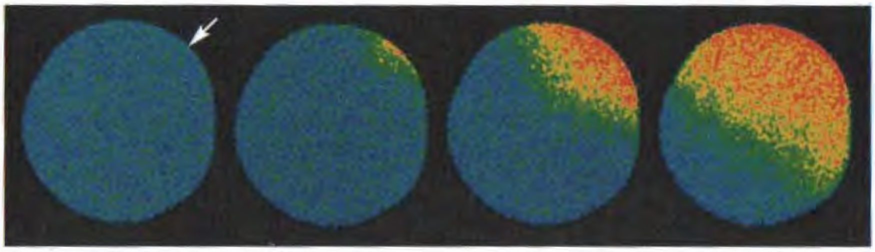


Figura 15–39 Cómo las GPCR incrementan el Ca^{2+} citosólico y activan la PKC. El GPCR activado estimula la fosfolipasa PLCβ ligada a la membrana plasmática a través de una proteína G. Dependiendo de la isoforma de la PLCβ, puede ser activada por la subunidad α de G_q, como se muestra, por las subunidades βγ de otra proteína G, o por ambas. Cuando la PLCβ activada hidroliza $PI(4,5)P_2$, se producen dos mensajeros intracelulares pequeños. El inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) difunde a través del citosol y libera Ca^{2+} del ER, al unirse y abrir los canales liberadores de Ca^{2+} sensibles a IP_3 (receptores IP_3) en la membrana del ER. El marcado gradiente electroquímico de Ca^{2+} a través de esta membrana, hace que el Ca^{2+} escape hacia el citosol cuando se abren los canales liberadores. El diacilglicerol permanece en la membrana plasmática y, junto con la fosfatidilserina (no mostrada) y el Ca^{2+}, contribuye a activar la proteína quinasa C (PKC), que migra desde el citosol hasta la cara citosólica de la membrana plasmática. De las 10 o más isoformas de PKC de humanos, al menos 4 se activan por diacilglicerol.



tiempo 0 segundos 10 segundos 20 segundos 40 segundos

Figura 15–40 La fecundación de un oocito maduro por un espermatozoide provoca un incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+}. <AGGA> A este oocito de estrella de mar, antes de ser fecundado, se le ha inyectado un marcador fluorescente sensible al Ca^{2+}. Se ve como una ola de Ca^{2+} citosólico (*rojo*), liberada desde el RE, recorre todo el oocito desde el punto de entrada del espermatozoide (*flecha*). Esta ola de Ca^{2+} provoca un cambio en la superficie celular del oocito, evitando la entrada de otro espermatozoide, e inicia el desarrollo embrionario (descrito en el Capítulo 21). Parece que el incremento inicial de Ca^{2+} está causado por una forma de PLC (PLCζ) específica del espermatozoide, que éste coloca sobre el citoplasma del oocito cuando se funde con el oocito; la PLCζ rompe el $PI(4,5)P_2$ en IP_3, que libera Ca^{2+} del ER del oocito. (Cortesía de Stephen A. Stricker.)

El Ca^{2+} actúa como un mediador intracelular ubicuo

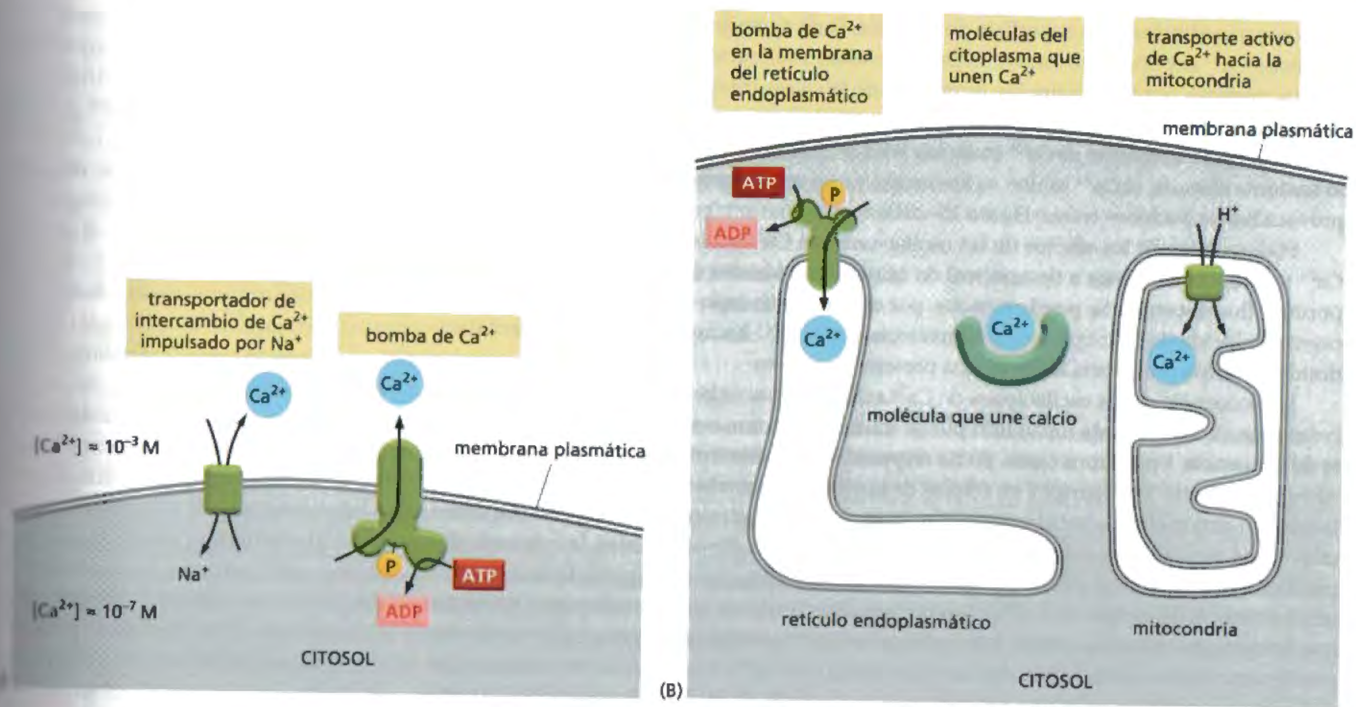
Una gran variedad de señales extracelulares (no sólo las que actúan vía proteínas G) inducen un incremento de la concentración citosólica de Ca^{2+}. Por ejemplo en los oocitos después de la fecundación por un espermatozoide se induce una ola citosólica de Ca^{2+} que es responsable del inicio del desarrollo embrionario (**Figura 15–40**). En las fibras musculares, el Ca^{2+} provoca la contracción y en muchas células secretoras, incluyendo las células nerviosas, provoca la secreción. El Ca^{2+} puede actuar como señal de este modo porque normalmente su concentración en el citosol es muy baja (~10^{-7} M), mientras que su concentración en el fluido extracelular (~10^{-3} M) y en el lumen del ER –y del retículo sarcoplasmático (SR: *sarcoplasmic reticulum*) del músculo– es alta. Así pues, existe un enorme gradiente de Ca^{2+} que tiende a empujar Ca^{2+} hacia el citosol, tanto a través de la membrana plasmática como a través de la membrana del ER o del SR. Cuando una señal abre transitoriamente los canales de Ca^{2+} en alguna de estas membranas, el Ca^{2+} fluye precipitadamente al citosol, incrementando de forma marcada la concentración local de Ca^{2+} en 10-20 veces y activando las proteínas sensibles a Ca^{2+} de la célula. <CGTC>

El Ca^{2+} del exterior de la célula entra al citosol a través de varios tipos de canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática, que se abren en respuesta a la unión de un ligando, a estiramiento o a despolarización de la membrana. El Ca^{2+} procedente del ER entra en el citosol a través de receptores de IP_3 (véase Figura 15–39) o de **receptores de rianodina** (llamados así porque son sensibles al alcaloide vegetal rianodina). Los receptores de rianodina por lo general son sensibles a la unión de Ca^{2+} por lo que amplifican la señal de Ca^{2+}. El Ca^{2+} también activa los receptores de IP_3 pero sólo en presencia de IP_3; en cambio, concentraciones muy elevadas de Ca^{2+} los inactivan. En el Capítulo 16 se explica cómo se libera el Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático generando la contracción de las células musculares.

La concentración de Ca^{2+} en el citosol se mantiene baja en las células en reposo mediante diversos mecanismos (**Figura 15–41**). Todas las células eucariotas tienen en su membrana plasmática una bomba de Ca^{2+} que utiliza la energía de la hidrólisis del ATP para bombear Ca^{2+} hacia el exterior del citosol. Células tales como las musculares y las nerviosas, que utilizan de forma intensa el sistema de señalización por Ca^{2+}, disponen en su membrana plasmática de otra proteína transportadora de Ca^{2+} (un intercambiador de Ca^{2+} dirigido por Na^+) que acopla el eflujo de Ca^{2+} a un influjo de Na^+. En la membrana del ER existe otra bomba de Ca^{2+} que también desempeña un papel importante en el mantenimiento de una concentración baja de Ca^{2+} en el citosol: esta bomba de Ca^{2+} permite al ER captar grandes cantidades de Ca^{2+} del citosol, en contra de gradiente de concentración, aunque los niveles de Ca^{2+} en el citosol sean bajos. Además, una bomba de Ca^{2+}, de baja actividad pero de gran capacidad, situada en la membrana interna de la mitocondria, tiene un papel importante limitando y acabando la señal de Ca^{2+}: utiliza el gradiente electroquímico generado a través de esta membrana, durante las etapas de transferencia de electrones de la fosforilación oxidativa, para extraer Ca^{2+} del citosol importándolo a la mitocondria. Así, aumenta la concentración de Ca^{2+} en la mitocondria, lo que puede activar algunas enzimas del ciclo del ácido cítrico y, por tanto, aumenta la síntesis de ATP, lo cual relaciona la activación celular con la producción de energía; sin embargo, un incremento excesivo de la concentración de Ca^{2+} en la mitocondria conduce a la muerte celular.

La frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} afecta la respuesta celular

Los investigadores a menudo utilizan indicadores fluorescentes sensibles a Ca^{2+}, como la *aecuorina* o la *fura-2* (se describe en el Capítulo 9), para seguir las variaciones de los niveles



...licos de Ca^{2+} en células individuales en las que se ha activado el proceso de señalización por fosfolípidos de inositol. Cuando se observan de esta manera, la señal inicial de Ca^{2+} aparece pequeña y localizada en una o más regiones discretas de la célula. Estas señales cresta, ...a, soplos o chispas de Ca^{2+} reflejan la apertura local de uno o pequeños grupos de canales de Ca^{2+} en la membrana del ER. Dado que varias proteínas de unión a Ca^{2+} actúan como tampones restringiendo la difusión de Ca^{2+}, generalmente la señal permanece localizada en el lugar en el que el Ca^{2+} ha entrado en el citosol. Sin embargo, si la señal extracelular es lo bastante fuerte y persistente, esta señal localizada de Ca^{2+} se puede propagar a través del citosol como una ola que se va regenerando (véase Figura 15–40), de modo parecido a como lo hace el potencial de acción en un axón. Por lo general, esta "espiga" inicial de Ca^{2+} viene seguida por series de espigas posteriores, cada una de las cuales tarda algunos segundos en producirse (**Figura 15–42**). Estas *oscilaciones de* Ca^{2+} persisten mientras los receptores se

Figura 15–41 Principales vías de las células eucariotas para mantener concentraciones muy bajas de Ca^{2+} libre en su citosol. (A) El Ca^{2+} es bombeado de forma activa desde el citosol hacia el exterior de la célula. (B) El Ca^{2+} es bombeado desde el citosol al interior del ER y de la mitocondria y varios tipos de moléculas en el citosol de la célula unen Ca^{2+} libre.

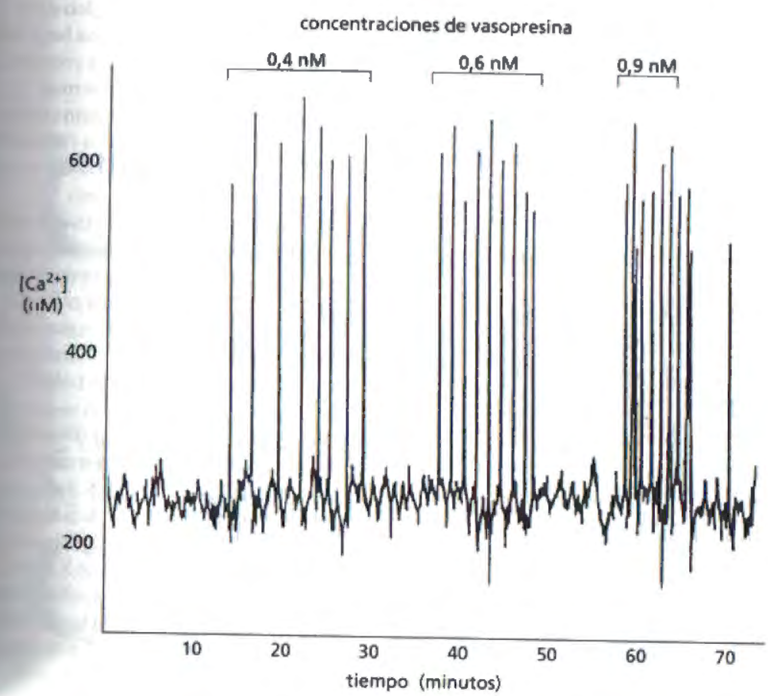


Figura 15–42 Inducción de oscilaciones de Ca^{2+} por vasopresina en una célula hepática. La célula fue cargada con la proteína sensible a Ca^{2+}, la aecuorina, y a continuación fue expuesta a concentraciones crecientes de la molécula péptido señal *vasopresina*, que activa una GPCR y la PLCβ (véase la Tabla 15–2). Nótese que la frecuencia de los picos de Ca^{2+} aumenta a medida que aumenta la concentración de vasopresina, pero que la amplitud de los picos no se ve afectada. Cada pico dura unos 7 segundos. (Adaptado de N.M. Woods, K.S.R. Cuthbertson y P.H. Cobbold, *Nature* 319:600-602, 1986. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

mantengan activados en la superficie de la célula. Parece que tanto las olas como las oscilaciones de Ca^{2+} dependen, al menos en parte, de una combinación de retroalimentación positiva y negativa por Ca^{2+} sobre los receptores de IP_3 y los receptores de rianodina: el Ca^{2+} liberado inicialmente estimula la liberación de más Ca^{2+} por ambos receptores, un proceso conocido como *liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}*; entonces, cuando su concentración es lo bastante elevada, el Ca^{2+} inhibe su liberación y esta retroalimentación negativa retrasada provoca las oscilaciones (véase Figura 15–28D).

Podemos seguir los efectos de las oscilaciones de Ca^{2+} sobre las proteínas sensibles a Ca^{2+} utilizando imágenes a tiempo real de células individuales que expresen proteínas reporteras fluorescentes. Se puede mostrar, por ejemplo, que cada espiga de Ca^{2+} de una respuesta inducida de este tipo recluta transitoriamente PKC hacia la membrana plasmática, donde de forma transitoria fosforila una proteína reportera.

La frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} refleja la intensidad del estímulo extracelular (véase Figura 15–42) y esta frecuencia puede traducirse en una respuesta celular dependiente de frecuencia. En algunos casos, dicha respuesta dependiente de frecuencia también es, a su vez, oscilatoria. Por ejemplo, en células de la pituitaria secretoras de hormona la estimulación por una molécula señal extracelular induce picos repetidos de Ca^{2+}, cada uno de los cuales está asociado con un pulso de secreción de hormona. En otros casos, la respuesta dependiente de frecuencia puede ser no-oscilatoria. Por ejemplo, en algunos tipos celulares una frecuencia de espigas de Ca^{2+} activa la transcripción de un conjunto de genes, mientras que frecuencias más altas activan la transcripción de otro conjunto de genes. ¿De qué forma pueden las células captar la frecuencia de las espigas de Ca^{2+} y modificar su respuesta según dicha frecuencia? El mecanismo probablemente depende de proteínas sensibles a Ca^{2+} que cambian su actividad en función de la frecuencia de los picos de Ca^{2+}. Como se expone a continuación, existe una proteína quinasa que actúa como un dispositivo de memoria molecular que parece tener esta destacable propiedad.

En las células animales, las acciones del Ca^{2+} se producen a través de proteínas quinasa dependientes de Ca^{2+}/calmodulina (CaM-quinasas)

Varias proteínas que se unen a Ca^{2+} ayudan a transmitir la señal citosólica de Ca^{2+}. La más importante de ellas es la **calmodulina**, que se encuentra en todas las células eucariotas y constituye aproximadamente el 1% de la masa total de proteína de la célula. La calmodulina actúa como un receptor intracelular polivalente de Ca^{2+} que gobierna muchos procesos regulados por Ca^{2+}. Se trata de una cadena polipeptídica muy conservada con cuatro lugares de unión con alta afinidad para el Ca^{2+} (**Figura 15–43**A). Cuando se activa por la unión a Ca^{2+}, la calmodulina sufre un importante cambio de conformación. Dado que se tienen que unir dos o más iones de Ca^{2+} a la calmodulina para que ésta adopte su conformación activa, la proteína responde casi como un interruptor cuando se incrementa la concentración de

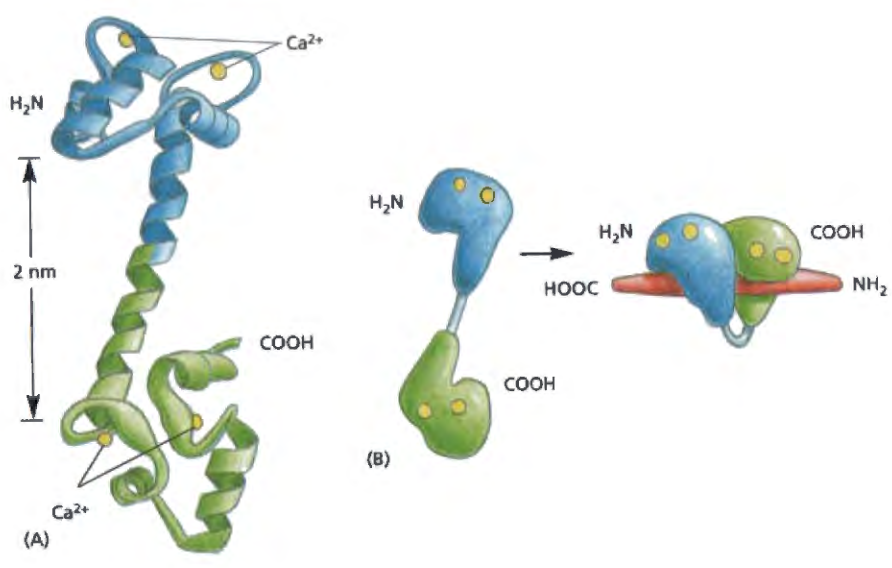


Figura 15–43 Estructura del complejo Ca^{2+}/calmodulina, basada en estudios de difracción de rayos X y de NMR. <CTTC> (A) La molécula se parece a una "pesa de gimnasia", con dos cabezas globulares terminales, que pueden unirse a muchas proteínas diana. Las cabezas globulares están conectadas mediante una larga hélice α expuesta, que le permite a la proteína adoptar varias conformaciones muy diferentes según con que proteína diana interactúa. Cada una de las dos cabezas tiene dos dominios de unión al Ca^{2+}. (B) Principal cambio estructural del complejo Ca^{2+}/calmodulina que ocurre cuando se une a una proteína diana (en este ejemplo, un péptido que contiene un dominio de unión para Ca^{2+}/calmodulina de una proteína quinasa dependiente de Ca^{2+}/calmodulina. Nótese que el complejo Ca^{2+}/calmodulina se dobla como una "navaja de bolsillo" abrazando al péptido. Cuando se unen a otras dianas, pueden adoptar diferentes conformaciones. (A, basado en datos de cristalografía de rayos X de Y.S. Babu et al., *Nature* 315:37-40, 1985. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd; B, basado en datos de cristalografía de rayos X de W.E. Meador, A.R. Means y F.A. Quiocho, *Science* 257:1251-1255, 1992, y en datos de NMR de M. Ikura et al., *Science* 256:632-638, 1992. Con la autorización de AAAS.)

Ca^{2+} (véase Figura 15–25): un incremento de 10 veces la concentración de Ca^{2+} genera un incremento de 50 veces de la activación de la calmodulina.

La activación alostérica de la calmodulina por el Ca^{2+} es análoga a la activación alostérica de la PKA por el AMP cíclico, con la diferencia de que la calmodulina no tiene actividad enzimática sino que actúa uniéndose y activando a otras proteínas. En algunos casos, la calmodulina actúa como una subunidad reguladora permanente de un complejo enzimático, pero generalmente la unión del Ca^{2+} induce la unión de la calmodulina a varias proteínas diana de la célula y altera su actividad.

Cuando el complejo Ca^{2+}/calmodulina activado se une a su proteína diana la calmodulina cambia de nuevo de conformación, la naturaleza de la cual depende de la superficie de la célula diana (Figura 15–43B). De entre la gran cantidad de proteínas diana reguladas por la calmodulina, varias de ellas son enzimas o proteínas de transporte a través de la membrana. Como ejemplo, el complejo Ca^{2+}/calmodulina se une, activándola, a la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática, que utiliza la hidrólisis de ATP para bombear Ca^{2+} hacia el exterior de la célula (véase Figura 15–41). Así, cuando la concentración de Ca^{2+} en el citosol aumenta, la bomba se activa, lo cual contribuye a que los niveles citosólicos de Ca^{2+} vuelvan a los valores de reposo.

Sin embargo, la mayor parte de los efectos del Ca^{2+} son más indirectos y están mediados por fosforilación de proteínas catalizadas por una familia de serina/treonina proteínas quinasas denominadas **quinasa dependientes de Ca^{2+}/calmodulina (CaM-quinasas)**. Algunas CaM-quinasas fosforilan proteínas reguladoras de la expresión génica, activando o inhibiendo la transcripción de determinados genes, como en el caso de la proteína CREB que hemos visto anteriormente (véase Figura 15–36).

Uno de los ejemplos mejor estudiados de CaM-quinasas es la **CaM-quinasa II**, que se encuentra en la mayoría de las células animales pero sobre todo en el sistema nervioso. Constituye más del 2% de la masa total de proteína en algunas regiones del cerebro y está muy concentrada en las sinapsis. La CaM-quinasa II tiene dos propiedades destacables, que están relacionadas entre sí. Primera, puede actuar como un dispositivo de memoria molecular, cambiándose en un estado activo cuando es expuesta a Ca^{2+}/calmodulina y permaneciendo activa incluso después de que la concentración de Ca^{2+} haya bajado. Este hecho es debido a que la quinasa se fosforila a sí misma (un proceso denominado *autofosforilación*) y también fosforila a otras proteínas celulares cuando es activada por Ca^{2+}/calmodulina. En su estado autofosforilado, la enzima permanece activa incluso en ausencia de Ca^{2+} y prolonga así la duración de la actividad de la quinasa después de que acabe la señal inicial activadora de Ca^{2+}. La actividad se mantiene hasta que las serinas/treoninas fosfatasa sobrepasan la actividad autofosforilativa

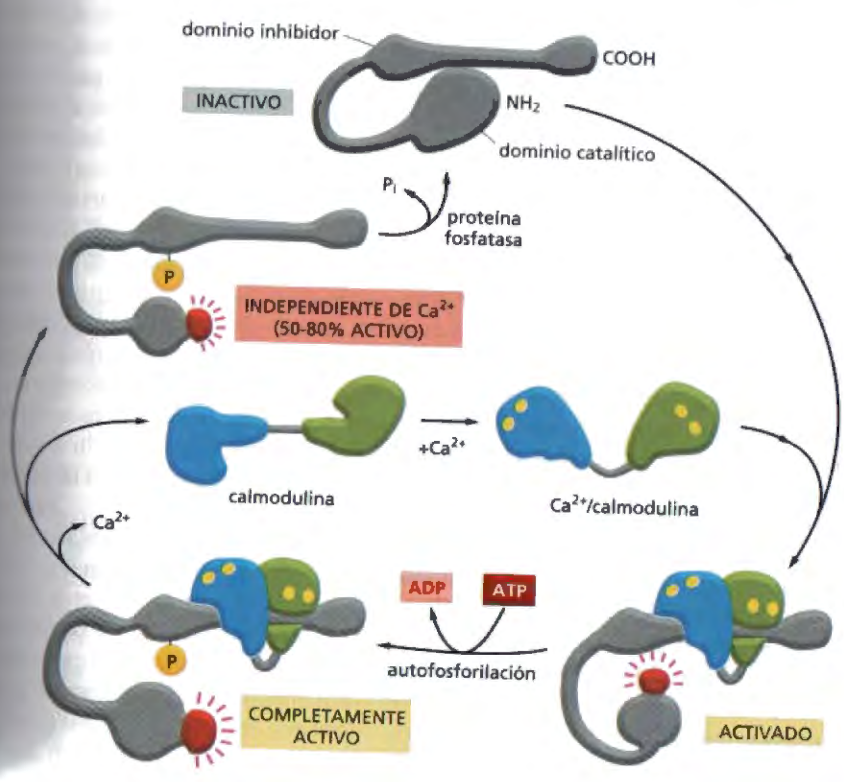


Figura 15–44 Pasos de la activación de la CaM-quinasa II. La enzima es un gran complejo proteico de 12 subunidades, aunque para simplificar el esquema sólo se muestra una subunidad (en *gris*). En ausencia de Ca^{2+}/calmodulina, la enzima es inactiva como consecuencia de una interacción entre un dominio inhibidor y el dominio catalítico. La unión de Ca^{2+}/calmodulina altera la conformación de la proteína, activándola parcialmente. Los dominios catalíticos del complejo fosforilan los dominios inhibidores de subunidades vecinas, así como otras proteínas de la célula (no se muestran). La autofosforilación del complejo enzimático (por fosforilación mutua de sus subunidades) activa por completo la enzima. Este hecho también prolonga la actividad de la enzima de dos maneras. Primero, atrapa el complejo Ca^{2+}/calmodulina unido, de forma que no se disocia del complejo enzimático hasta que los niveles citosólicos de Ca^{2+} vuelven a los valores basales, unos 10 segundos después (no se muestra). Segundo, transforma la enzima a una forma independiente de Ca^{2+}, ya que la quinasa se mantiene activa incluso después de que el complejo Ca^{2+}/calmodulina se disocie de ella. La actividad continúa hasta que el proceso de autofosforilación es contrarrestado por la acción de una proteína fosfatasa que sobrepasa la actividad de autofosforilación de la CaM-quinasa II.

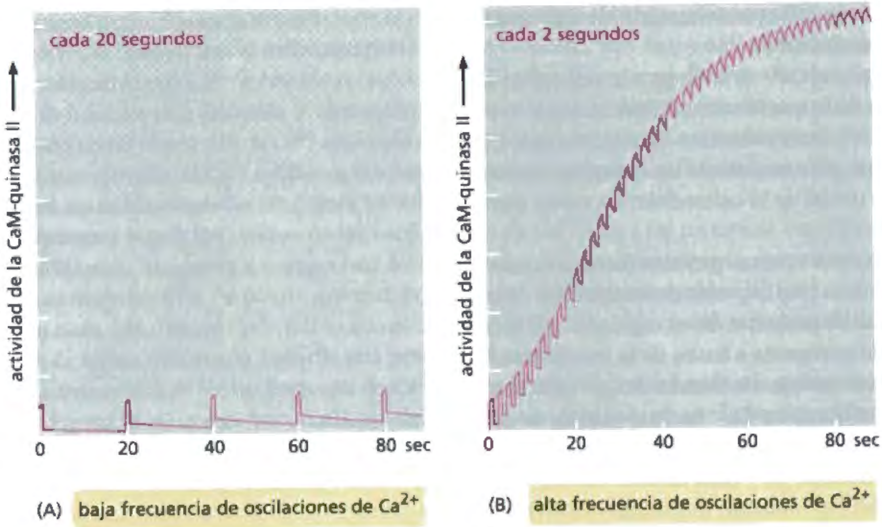


Figura 15–45 La CaM-quinasa II actúa como un descodificador de frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+}. (A) A bajas frecuencias de picos de Ca^{2+}, la enzima se inactiva después de cada pico de Ca^{2+}, dado que la autofosforilación inducida por la unión de Ca^{2+}/calmodulina no mantiene la actividad de la enzima durante el tiempo suficiente para que ésta permanezca activa hasta la llegada del pico siguiente de Ca^{2+}. (B) Sin embargo, a altas frecuencias de picos de Ca^{2+}, la enzima no se inactiva completamente entre los picos de Ca^{2+}, de manera que su actividad aumenta con cada pico. Si la frecuencia es lo bastante alta, este incremento progresivo de la actividad enzimática continuará hasta que se autofosforilen todas las subunidades de la enzima y, por tanto, estará activada al máximo. Aunque no se muestra, cuando se han autofosforilado un número suficiente de subunidades, la enzima puede mantener un estado muy activo aunque la frecuencia de picos de Ca^{2+} sea relativamente baja (una forma de memoria celular).

La unión de Ca^{2+}/calmodulina a la enzima se incrementa por la autofosforilación de la CaM-quinasa II (una forma adicional de retroalimentación positiva), ayudando a que la respuesta de la enzima a picos repetidos de Ca^{2+} exhiba un umbral abrupto, tal como se ha señalado anteriormente. (De P.I. Hanson, T. Meyer, L. Stryer y H. Schulman, *Neuron* 12:943-956, 1994. Con la autorización de Elsevier.)

e inactivan la quinasa (**Figura 15–44**). Así, la activación de la CaM-quinasa II puede actuar como una memoria traza de un pulso de Ca^{2+} anterior y al parecer participa en algunos tipos de aprendizaje y memoria del sistema nervioso de los vertebrados. Ratones mutantes que carecen de la isoforma específica del cerebro tienen defectos específicos en su capacidad de recordar la localización de un objeto, es decir, de aprendizaje espacial.

La segunda propiedad destacable de la CaM-quinasa II se produce a continuación de la primera: la enzima puede utilizar su dispositivo de memoria intrínseca para actuar como un decodificador de la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+}. Parece que esta propiedad tiene especial relevancia en la sinapsis de las células nerviosas, donde cambios en los niveles intracelulares de Ca^{2+} en una célula postsináptica como resultado de la actividad neural producen cambios a largo plazo en la efectividad posterior de esta sinapsis (se describe en el Capítulo 11). Cuando la CaM-quinasa II es inmovilizada en una superficie sólida y expuesta a la vez a una proteína fosfatasa y a pulsos repetitivos de Ca^{2+}/calmodulina a diferentes frecuencias mimetizando las observadas en células estimuladas, la actividad de la enzima se incrementa abruptamente en función de la frecuencia de los pulsos (**Figura 15–45**). Además, la frecuencia de la respuesta de esta enzima formada por multisubunidades depende de la composición exacta de subunidades, de modo que una célula puede diseñar su respuesta a las oscilaciones de Ca^{2+} según sus particulares necesidades ajustando la composición de la enzima CaM-quinasa II que sintetiza.

Algunas proteínas G regulan directamente canales iónicos

Las proteínas G no sólo actúan regulando la actividad de enzimas unidas a membrana que alteran la concentración de AMP cíclico o de Ca^{2+} en el citosol. Por ejemplo, la subunidad α de un tipo de proteína G (denominada G_{12}), activa un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) que activa una GTPasa monomérica de la *familia Rho* (se trata más adelante en el Capítulo 16), que regula el citoesqueleto de actina.

En algunos otros casos, las proteínas G activan o inactivan directamente canales iónicos de la membrana plasmática de la célula diana, alterando así su permeabilidad iónica y, por lo tanto, la excitabilidad eléctrica de la membrana. Por ejemplo, la acetilcolina liberada por el nervio vago reduce tanto la frecuencia como la fuerza de la contracción de la fibra muscular del corazón (véase la Figura 15–9B). Este efecto está mediado por una clase especial de receptores de acetilcolina que activan la proteína G inhibidora G_i, ya tratados. Una vez activada, la subunidad α de G_i inhibe la adenilato ciclasa (como hemos descrito), mientras que las subunidades $\beta\gamma$ se unen a canales de K^+ de la membrana plasmática de la fibra muscular y los abren. La apertura de estos canales de K^+ hace más difícil la despolarización de la célula y, por tanto, contribuye al efecto inhibidor de la acetilcolina sobre el corazón. (Estos receptores, que pueden ser activados por el alcaloide de hongos, muscarina, se denominan *receptores muscarínicos de aceticolina* para distinguirlos de otros receptores, muy diferentes a éstos, denominados *receptores nicotínicos de*

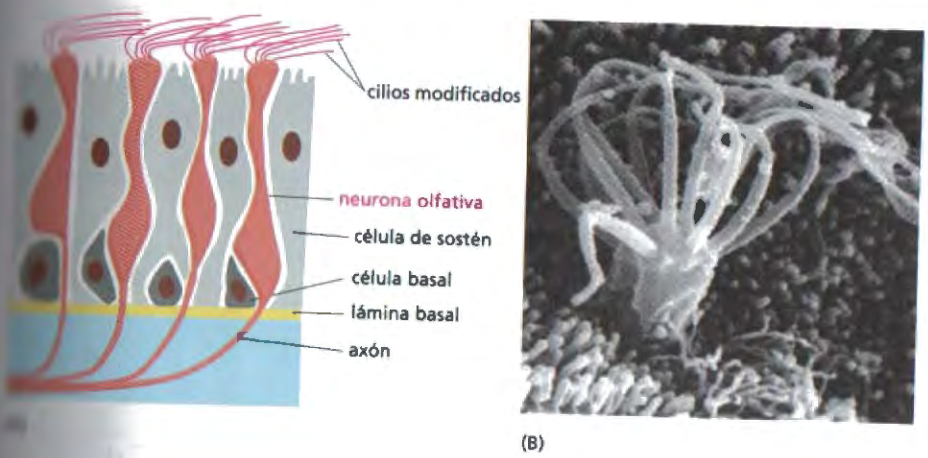


Figura 15–46 Neuronas receptoras del olfato. (A) Una sección del epitelio olfativo de la nariz. Las neuronas olfativas tienen cilios modificados que se proyectan desde la superficie del epitelio y que contienen los receptores olfativos y la maquinaria para la transducción de la señal. Cuando la célula es activada por un aroma, el axón, que se extiende desde el extremo opuesto de la neurona receptora, conduce las señales eléctricas hasta el cerebro, produciendo un potencial de acción. Al menos en roedores, las células basales actúan como células madre, produciendo nuevas neuronas receptoras a lo largo de toda la vida, que sustituyen las neuronas que mueren. (B) Electromicrografía de los cilios en la superficie de una neurona olfativa obtenida con un microscopio electrónico de barrido. (B, de E.E. Morrison y R.M. Costanzo, *J. Comp. Neurol.* 297, 1-13, 1990 Con la autorización de Wiley-Liss.)

acetilcolina, que son receptores acoplados a canales iónicos de las células del músculo esquelético y de células nerviosas que pueden ser activados tanto por la unión de nicotina como de acetilcolina.)

Otras proteínas G triméricas regulan la actividad de canales iónicos de una forma menos directa, regulando la fosforilación de canales (mediante, p. ej., la PKA, la PKC o la CaM-quinasa) o causando la producción o la destrucción de nucleótidos cíclicos que activan o inactivan directamente canales iónicos. Estos *canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos* desempeñan un papel crucial en los procesos de la visión y del olfato, como se explicará a continuación.

El olfato y la vista dependen de GPCR que regulan canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos

Los humanos podemos distinguir más de 10.000 aromas diferentes, que detectamos mediante neuronas especializadas receptoras del olfato del epitelio de la nariz. Estas células utilizan GPCR específicas denominadas **receptores olfativos** para reconocer los olores; estos receptores se localizan en la superficie de cilios modificados que sobresalen de cada célula (**Figura 15–46**). Los receptores actúan a través de AMP cíclico. Cuando son estimulados por la unión de un aroma, activan una proteína G específica del olfato (conocida como G_{olf}) que, a su vez, activa la adenilato ciclasa. El incremento resultante de los niveles de AMP cíclico abre *canales catiónicos regulados por AMP cíclico*, lo cual permite que se produzca un flujo de entrada de Na^+ que despolariza la neurona olfativa e inicia un impulso nervioso que viaja a lo largo del axón hasta el cerebro.

En el ratón hay unos 1000 receptores olfativos diferentes y en humanos unos 350, cada uno de los cuales está codificado por un gen diferente y reconoce un conjunto determinado de aromas diferentes. Cada neurona receptora de olores produce un solo tipo de receptor (véase p. 453); por tanto, cada neurona sólo responde a un conjunto específico de aromas en función del tipo determinado de receptor olfativo que expresa y cada aroma activa un grupo característico de neuronas receptoras de olores. Un mismo receptor también colabora dirigiendo la elongación del axón de cada neurona olfativa en desarrollo hacia las neuronas diana específicas con las que conectará en el cerebro. Existe otro conjunto de GPCR que actúa de manera similar mediando la respuesta a *feromonas*, señales químicas detectadas en otra parte diferente de la nariz, que son utilizadas en la comunicación entre miembros de una misma especie. Los humanos, sin embargo, carecemos de receptores funcionales de feromonas.

La visión en los vertebrados también utiliza un proceso de detección de la señal tan elaborado y sensible. También participan canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos, pero en este caso el nucleótido que tiene un papel crucial no es el AMP cíclico sino el GMP cíclico (**Figura 15–47**). Como el AMP cíclico, las concentraciones de GMP cíclico en el citosol están controladas por una rápida velocidad de síntesis (por la *guanilato ciclasa*) y una rápida degradación (por la *fosfodiesterasa de GMP cíclico*).

En la transducción visual, que constituye el conjunto de respuestas mediadas por proteínas G más rápido que se conoce en vertebrados, la activación de los receptores está esti-

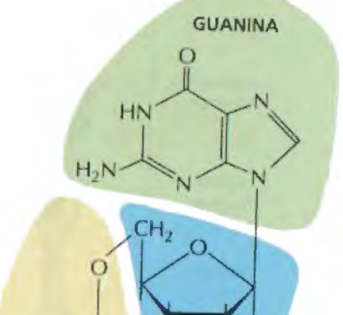


Figura 15–47 El GMP cíclico.

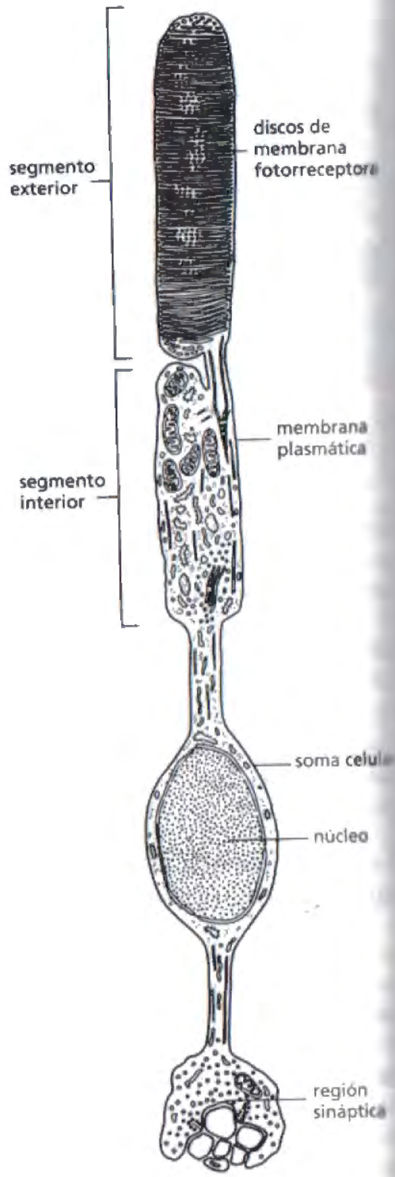


Figura 15–48 Un bastón fotorreceptor. En el segmento exterior del bastón existen unos 1000 discos. Las membranas de estos discos no están conectadas a la membrana plasmática. Los segmentos interior y exterior tienen zonas especializadas de un *cilio primario* (se describe en el Capítulo 16); como hemos mencionado antes, y analizaremos después, un cilio primario se extiende desde la superficie de algunas células de vertebrados, donde actúa como un orgánulo de señalización.

mulada por la luz y genera una disminución (en lugar de un incremento) de los niveles del nucleótido cíclico. El proceso se ha estudiado especialmente bien en el caso de la respuesta a la luz de los **fotorreceptores tipo bastón (bastones)** de la retina de los vertebrados. Los bastones son responsables de la visión monocromática con luz tenue, mientras que los *fotorreceptores tipo cono (conos)* son responsables de la visión cromática con luz brillante. Un bastón fotorreceptor es una célula altamente especializada con un segmento exterior y otro interior, un cuerpo celular y una región sináptica a través de la cual el bastón pasa una señal química a una célula nerviosa de la retina (**Figura 15–48**). Esta célula nerviosa transmite la señal a otra célula nerviosa, que a su vez la transmite al cerebro (véase Figura 23–16).

El aparato foto transductor se halla en el segmento exterior del bastón y está constituido por *discos* apilados, cada uno de los cuales está formado por una especie de saco de membrana en el que se hallan embebidas las moléculas fotosensibles de **rodopsina**. La membrana plasmática que envuelve el segmento exterior contiene *canales catiónicos regulados por GMP cíclico*. Estos canales se mantienen abiertos en la oscuridad mediante la unión de moléculas de GMP cíclico al canal. Paradójicamente, la luz provoca una hiperpolarización de la membrana plasmática (que inhibe la señal sináptica), en lugar de una despolarización (que estimularía la señalización sináptica). La hiperpolarización (es decir, el potencial de membrana adquiere valores más negativos –descrito en el Capítulo 11) se produce porque la activación producida por la luz de las moléculas de rodopsina en la membrana de los discos disminuye la concentración de GMP cíclico y cierra los canales catiónicos especiales de la membrana plasmática circundante (**Figura 15–49**).

La rodopsina es un miembro de la familia de GPCR, pero la señal activadora extracelular no es una molécula sino un fotón de luz. Cada molécula de rodopsina contiene un cromóforo unido covalentemente, el 11-*cis* retinal, el cual se isomeriza de forma casi instantánea a todo-*trans* retinal cuando absorbe un solo fotón. La isomerización altera la

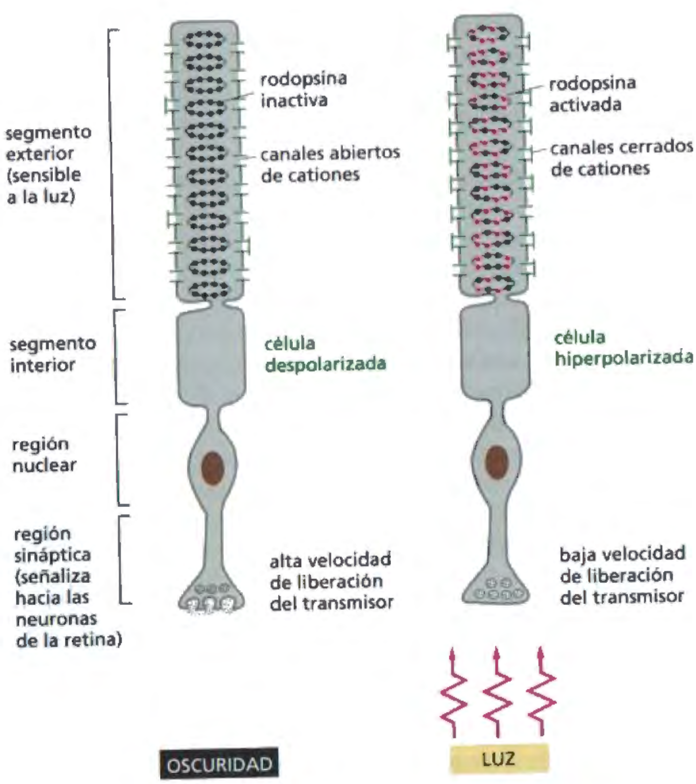


Figura 15–49 La respuesta a la luz de un bastón fotorreceptor. Los fotones son captados por las moléculas de rodopsina situadas en los discos del segmento exterior. Esto cierra los canales de cationes de la membrana plasmática, lo que hiperpolariza la membrana y reduce la velocidad de liberación del neurotransmisor desde la región sináptica. Debido a que el neurotransmisor inhibe muchas de las neuronas postsinápticas de la retina, la iluminación bloquea dicha inhibición, es decir que, de hecho, las excita.

Tabla 15-3 Las cuatro principales familias de proteínas G triméricas*

FAMILIA	ALGUNOS MIEMBROS DE LA FAMILIA	SUBUNIDAD QUE MEDIA LA ACCIÓN	ALGUNAS FUNCIONES
I	G_s	α	activa adenilato ciclasa; activa canales de Ca^{2+}
	G_{olf}	α	activa adenilato ciclasa en neuronas sensoriales del olfato
II	G_i	α	inhibe adenilato ciclasa
		βγ	activa canales de K^+
	G_o	βγ	activa canales de K^+; inactiva canales de Ca^{2+}
		α y βγ	activa fosfolipasa C-β
	G_t (transducina)	α	activa fosfodiesterasa de GMP cíclico en bastones fotorreceptores de vertebrados
III	G_q	α	activa fosfolipasa C-β
IV	$G_{12/13}$	α	activa GTPasas monoméricas de la familia Rho (vía Rho-GEF) regulando el citoesqueleto de actina

* Las familias se determinan por la relación entre las secuencias de aminoácidos de las subunidades α. Únicamente se incluyen ejemplos seleccionados. En humanos se han descrito unas 20 subunidades α y, al menos, 6 subunidades β y 11 subunidades γ.

conformación del retinal, induciendo un cambio de conformación en la proteína (opsina). Entonces, la molécula de rodopsina activada altera la conformación de la proteína G *transducina* (G_t), provocando que su subunidad α active una **fosfodiesterasa de GMP cíclico**. Entonces, esta fosfodiesterasa hidroliza GMP cíclico de forma que los niveles de GMP cíclico del citosol disminuyen. Esta bajada en la concentración de GMP cíclico disminuye la cantidad de GMP cíclico que está unido a los canales catiónicos de la membrana plasmática y permite que muchos de estos canales sensibles a GMP cíclico se cierren. De esta forma, la señal pasa rápidamente de la membrana de los discos a la membrana plasmática y la señal luminosa se transforma en una señal eléctrica a través de una hiperpolarización de la membrana plasmática de la célula bastón.

Los bastones utilizan varios circuitos de retroalimentación que le permiten a las células revertir rápidamente la situación hasta su estado de reposo, típico de la oscuridad, tras un flash de luz –un requerimiento necesario para percibir la corta duración del flash. Una quinasa específica de rodopsina denominada *rodopsina quinasa* (*RK*: ***r**hodopsin **k**inase*) fosforila residuos serina de la cola citosólica de la rodopsina activada, inhibiendo parcialmente la capacidad de la rodopsina para activar la transducina. Entonces, una proteína inhibidora denominada *arrestina* se une a la rodopsina fosforilada, inhibiendo aún más su actividad. Tanto en humanos como en ratones en los que el gen que codifica RK se encuentra inactivado por mutación, la respuesta a la luz se prolonga mucho tiempo y los bastones finalmente mueren.

Al mismo tiempo que la arrestina inactiva a la rodopsina, una proteína RGS (véase p. 900) se une a la transducina activada, estimulándola a hidrolizar su GTP unido a GDP, con lo que la transducina retorna a su estado inactivo. Además, los canales catiónicos que se cierran en respuesta a la luz también son permeables tanto al Ca^{2+} como al Na^+ de forma que cuando se cierran se inhibe la entrada normal de calcio provocando la disminución de la concentración de Ca^{2+} del citosol. Esta disminución de Ca^{2+} estimula la guanilato ciclasa a sintetizar GMP cíclico recuperando rápidamente los niveles de GMP cíclico y haciendo que la célula recobre rápido el estado en el que estaba antes de que la luz la activara. La activación de la guanilato ciclasa por la disminución de los niveles de Ca^{2+} está mediada por una proteína específica sensible al Ca^{2+}. A diferencia de la calmodulina, esta proteína es inactiva cuando se halla unida a Ca^{2+} y activa cuando está libre de Ca^{2+}. Así pues, estimula la ciclasa cuando los niveles de Ca^{2+} son bajos tras la respuesta a la luz.

Los mecanismos de retroalimentación negativa no sólo retornan con rapidez el fotorreceptor a su estado de reposo tras un flash transitorio de luz, sino que ayudan a que el bastón se *adapte*, disminuyendo la intensidad de la respuesta cuando el bastón está expuesto de forma continua a la luz. Como hemos explicado, la adaptación permite que la célula receptora pueda actuar como un detector sensible a *cambios* en la intensidad del estímulo en un amplio rango de niveles basales de estimulación. Por eso podemos ver un flash de cámara fotográfica en un día muy luminoso.

En la **Tabla 15-3** se resumen las principales proteínas G triméricas tratadas en este capítulo, agrupadas en las principales familias.

Los mediadores intracelulares y las cascadas enzimáticas amplifican las señales extracelulares

A pesar de las diferencias en detalles moleculares, las diversas vías de señalización intracelular iniciadas por GPCR comparten ciertas características y obedecen a principios generales similares. Dependen de complejas cascadas de transmisión de proteínas señalizadoras intracelulares y pequeños mensajeros intracelulares. A diferencia de lo que ocurre con sistemas de señalización más directos utilizados por los receptores intracelulares analizados anteriormente, estas cascadas de transmisión proporcionan numerosas oportunidades para amplificar las respuestas a señales extracelulares. Por ejemplo, en la cascada de la transducción visual una sola molécula de rodopsina activada cataliza la activación de cientos de moléculas de transducina a una velocidad de unas 1000 moléculas de transducina por segundo. Cada molécula de transducina activada activa una molécula de fosfodiesterasa de GMP cíclico, cada una de las cuales hidroliza unas 4000 moléculas de GMP cíclico por segundo. Esta cascada catalítica dura aproximadamente un segundo, produciendo la hidrólisis de más de 10^5 moléculas de GMP cíclico por cada cuanto de luz absorbida; a su vez, la disminución en la concentración de GMP cíclico cierra de forma transitoria centenares de canales catiónicos de la membrana plasmática (**Figura 15–50**). Como resultado, una célula bastón puede responder incluso a un solo fotón de luz de un modo muy reproducible tanto en tiempo como en magnitud.

De forma similar, cuando una molécula señal extracelular se une a un receptor que indirectamente activa la adenilato ciclasa vía proteína G_S, cada proteína receptora puede activar muchas moléculas de proteína G_S, cada una de las cuales puede activar a una molécula de adenilato ciclasa. Cada ciclasa puede catalizar la conversión de un gran número de moléculas de ATP a AMP cíclico. Un tipo de amplificación como ésta funciona en la vía de señalización de los fosfolípidos de inositol. De esta forma, una variación nanomolar (10^{-9} M) de la concentración de una señal extracelular induce cambios en el rango micromolar (10^{-6} M) en las concentraciones de mensajeros intracelulares como el AMP cíclico o el Ca^{2+}. Dado que estas moléculas actúan como efectores alostéricos que activan enzimas o canales iónicos específicos, una sola molécula señal extracelular puede modificar varios miles de moléculas proteicas en la célula diana.

Cualquier cascada de señales estimuladoras de este tipo requiere mecanismos de contrapeso que en cada una de las etapas restauren el sistema hasta su estado de reposo cuando cesa la estimulación. Como se ha destacado, la respuesta a la estimulación sólo puede ser rápida si los mecanismos de inactivación también son rápidos. Por consiguiente, las células presentan mecanismos eficaces para la rápida degradación (y resíntesis) de los nucleótidos cíclicos y para el amortiguamiento y secuestro del Ca^{2+} citosólico, así como para la inactivación de las enzimas y canales iónicos que responden a la señal, una vez han sido activados. Todo ello no sólo es esencial para frenar la respuesta, sino que también es importante para definir el estado de reposo a partir del cual la célula responde.

Como veremos a continuación, cada una de las proteínas de la cascada de transmisión de la señal constituye una diana de regulación independiente, incluyendo el receptor.

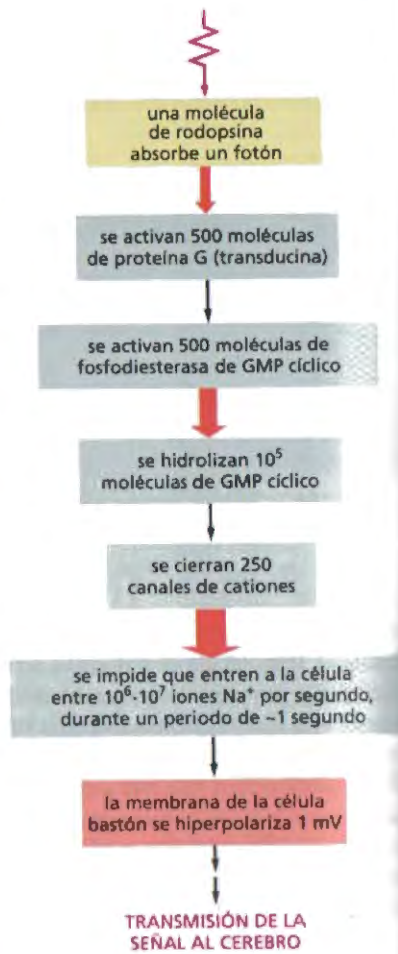


Figura 15–50 Amplificación de la cascada catalítica inducida por la luz, en bastones de vertebrados. Las *flechas rojas* indican etapas en las que se produce amplificación, y su anchura indica la magnitud de esta amplificación.

La desensibilización de los GPCR depende de la fosforilación del receptor

Cuando las células diana están expuestas a elevadas concentraciones de un ligando estimulador durante periodos prolongados de tiempo, pueden *desensibilizarse* o *adaptarse* de diferentes maneras. Un importante tipo de mecanismo de desensibilización depende de la alteración de la cantidad o de la condición de las propias moléculas receptoras.

Para el caso de las GPCR, existen tres sistemas generales de desensibilización (véase Figura 15–29): (1) *Inactivación del receptor*: los receptores resultan alterados de forma que ya no pueden interaccionar con las proteínas G. (2) *Secuestro del receptor*: los receptores son trasladados temporalmente al interior de la célula (son internalizados) de forma que no puedan tener acceso a su ligando. (3) *Regulación por disminución (down-regulation) del número de receptores*: los receptores son destruidos en los lisosomas después de su internalización.

En cada caso, la desensibilización de los GPCR depende de su fosforilación por la PKA, la PKC o algún miembro de la familia de las **GPCR quinasa** (**GRK**: *G-protein-coupled receptor kinases*), entre las que se encuentran la quinasa específica de rodopsina, RK, que participa en la desensibilización de los bastones fotorreceptores que se han descrito. Las GRK fosforilan múltiples residuos serina y treonina de los receptores, pero sólo después de que el

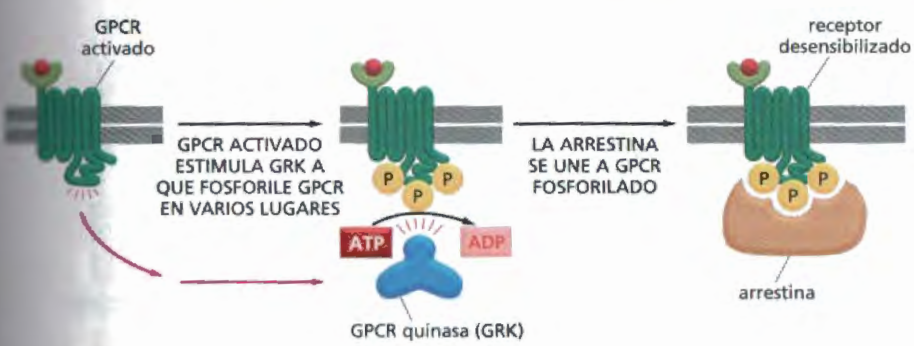


Figura 15–51 Papeles que desempeñan las quinasas de GPRC (GRK) y las arrestinas en la desensibilización de los GRPC. Una GRK únicamente fosforila receptores activados, ya que es el GPCR activado el que activa la GRK. La unión de una arrestina al receptor fosforilado impide que el receptor se una a su proteína G y también puede dirigir su endocitosis (no se muestra en la figura). La importancia que tienen las arrestinas en el proceso de desensibilización se ilustra con el ejemplo de ratones que son deficientes en una forma de arrestina, lo cual les impide desensibilizar sus receptores en respuesta a la morfina.

cuando haya activado el receptor ya que es el receptor activado el que activa alostéricamente la GRK. Como con la rodopsina, cuando el receptor ha sido fosforilado por una GRK, se une con gran afinidad a un miembro de la familia de las proteínas **arrestinas** (del inglés *arrest*: parar) (**Figura 15–51**).

La unión de la proteína arrestina contribuye al proceso de desensibilización, por lo menos de dos maneras. Primero, impide que el receptor activado interaccione con proteínas G. Segundo, actúa como una proteína adaptadora que colabora en el acoplamiento del receptor a la maquinaria de endocitosis dependiente de clatrina (se describe en el Capítulo 13), induciendo la endocitosis del receptor. El destino de los complejos GPCR-arrestina internalizados depende de otras proteínas del complejo. En algunos casos, el receptor es desfosforilado y reciclado hacia la membrana para su reutilización. En otros, es ubiquitinizado y degradado en los lisosomas (se trata más adelante).

La endocitosis del receptor no necesariamente hace que el receptor deje de transmitir la señal. En algunos casos, la arrestina unida recluta otras proteína señalizadoras que transmiten la señal a través de nuevas vías de señalización a partir de los GPCR internalizados.

Resumen

Los GPCR pueden, indirectamente a través de proteínas G, activar o inactivar enzimas unidas a la membrana plasmática o canales iónicos. Cuando un receptor activado estimula una proteína G, la proteína G sufre un cambio de conformación que activa su subunidad α y sus subunidades $\beta\gamma$, las cuales ahora pueden regular de forma directa la actividad de proteínas diana de la membrana plasmática. Algunos GPCR activan o inactivan la adenilato ciclasa, alterando así la concentración intracelular del mediador intracelular pequeño, el AMP cíclico. Otros activan una fosfolipasa C específica de fosfolípidos de inositol (la PLCβ), la cual hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato [PI(4,5)P_2] generando dos mediadores intracelulares pequeños. Uno es el inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3), que libera Ca^{2+} desde el ER e incrementa así la concentración de Ca^{2+} en el citosol. El otro es el diacilglicerol, que permanece en la membrana plasmática y colabora en la activación de la proteína quinasa C (PKC). Un incremento de los niveles de AMP cíclico o de Ca^{2+} afecta la célula estimulando sobre todo la proteína quinasa A (PKA) y las proteínas quinasa dependientes de Ca^{2+}/calmodulina (CaM-quinasas), respectivamente.

La PKC, la PKA y las CaM-quinasas fosforilan proteínas diana determinadas en residuos serina y treonina, alterando la actividad de estas proteínas. Cada tipo celular tiene su propio conjunto característico de proteínas diana que son reguladas de esta forma, lo cual permite a la célula presentar una respuesta propia y característica a los mediadores intracelulares pequeños. Las cascadas de señalización intracelular activadas por GPRS amplifican en gran medida la respuesta, de manera que por cada molécula de ligando señal extracelular unido a su receptor, se modifican miles de moléculas de proteínas diana.

Las diferentes respuestas mediadas por GPCR son rápidamente desactivadas cuando el ligando señal extracelular es eliminado. Así, la subunidad α de las proteínas G es estimulada por su proteína diana o por una RGS que la autoinactiva hidrolizando el GTP que llevan unido hasta GDP; el IP_3 es desfosforilado mediante una fosfatasa de lípidos (o fosforilado por una quinasa de lípidos); los nucleótidos cíclicos son hidrolizados por fosfodiesterasas; el Ca^{2+} es bombeado hacia fuera del citosol y las proteínas fosforiladas son desfosforiladas por proteínas fosfatasa. Los propios GPCR son fosforilados por GRK, lo que hace que la arrestina se una a ellos. La unión de la arrestina desacopla los receptores de las proteínas G y facilita su endocitosis, provocando una desensibilización o la continuación de la señal a través de proteínas señal reclutadas por la arrestina.

SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DE RECEPTORES DE SUPERFICIE CELULAR ACOPLADOS A ENZIMAS

Como los GPCR, los **receptores acoplados a enzimas** son proteínas transmembrana cuyo dominio de unión al ligando se halla en la superficie externa de la membrana plasmática. Sin embargo, en lugar de tener un dominio citosólico que se asocia a una proteína G trimérica, sus dominios citosólicos tienen una actividad enzimática intrínseca o están asociados directamente a una enzima. Mientras que los GPCR tienen siete segmentos transmembrana, cada subunidad de un receptor acoplado a enzima por lo general sólo tiene uno. A menudo los GPCR y los receptores acoplados a enzimas activan algunas de las mismas vías de señalización y habitualmente no existen razones obvias que expliquen por qué una señal extracelular determinada utiliza una u otra clase de estos receptores.

Existen seis clases de receptores acoplados a enzimas:

1. Los *receptores tirosina quinasa*, que fosforilan de forma directa determinados residuos de tirosina de su propia estructura o de un pequeño grupo de proteínas señalizadoras intracelulares
2. Los *receptores asociados a tirosinas quinasa*, que no tienen actividad enzimática intrínseca pero que directamente reclutan tirosinas quinasa citoplasmáticas para transmitir la señal.
3. Los *receptores serina/treonina quinasa* que realizan una fosforilación directa en serinas o treoninas de su propia cadena y de proteínas latentes reguladoras de la expresión de genes con las que están asociados.
4. Los *receptores asociados a histidinas quinasa*, que activan una vía de señalización de dos componentes en la cual la quinasa se autofosforila en un residuo histidina y de inmediato transfiere el fosfato a una segunda proteína señalizadora intracelular.
5. Los *receptores guanilato ciclasa*, que catalizan directamente la producción de GMP cíclico en el citosol, el cual actúa como un mediador pequeño intracelular de forma muy semejante a como lo hace el AMP cíclico
6. Las *tirosinas fosfatasa semejantes a receptores*, que eliminan grupos fosfato de residuos de tirosina de determinadas proteínas señalizadoras intracelulares (se denominan "semejantes a receptores" porque sus presuntos ligandos aún no han sido identificados, por lo que su función receptora todavía no está comprobada).

La exposición se centrará en las primeras cuatro clases, empezando con los receptores tirosina quinasa, los más numerosos de los receptores acoplados a enzimas.

Los receptores tirosina quinasa (RTK) activados se autofosforilan

Muchas proteínas señal extracelular que actúan a través de **receptores tirosina quinasa** (**RTK**: *receptor **t**yrosine **k**inase*). Entre los notables ejemplos que se describen en otra parte en este libro se incluyen el *factor de crecimiento epidérmico* (*EGF*: ***e**pidermal **g**rowth **f**actor*), el *factor de crecimiento derivado de plaquetas* (*PDGF*: ***p**latelet-**d**erived **g**rowth **f**actor*), los *factores de crecimiento de fibroblastos* (*FGF*: ***f**ibroblast **g**rowth **f**actors*), el *factor de crecimiento de hepatocitos* (*HGF*: ***h**epatocyte **g**rowth **f**actor*), la *insulina*, el *factor de crecimiento-1 semejante a insulina* (*IGF1*: ***i**nsulinlike **g**rowth **f**actor-**1***), el *factor de crecimiento vascular endotelial* (*VEGF*: ***v**ascular **e**ndothelial **g**rowth **f**actor*), el *factor estimulador de la formación de colonias de macrófagos* (*MCSF*: ***m**acrophage-**c**olony-**s**timulating **f**actor*), y las *neurotrofinas*, incluyendo el *factor de crecimiento nervioso* (*NGF*: ***n**erve **g**rowth **f**actor*).

Muchas proteínas señalizadoras unidas a la superficie extracelular también actúan a través de RTK. Las **efrinas** son la clase más numerosa de estos ligandos unidos a membrana, de las que se han descrito ocho en humanos. De entre sus muchas funciones, colaboran en la migración de células y axones a lo largo de vías específicas durante el desarrollo animal estimulando respuestas que acaban en atracciones o repulsiones (se describe más adelante, en el Capítulo 22). Los receptores de efrinas, denominados **receptores Eph** (***eph**rins*) también se encuentran entre los RTK más numerosos, con trece genes que los codifican en humanos. Las efrinas y los receptores Eph son extraordinarios, dado que pueden actuar simultáneamente como ligando y como receptor: algunas efrinas, cuando se unen al receptor Eph no sólo activan este receptor sino que también se activan a sí mismas transmitiendo señales al interior de la célula que expresa la efrina; de este modo se altera el comportamiento de am-

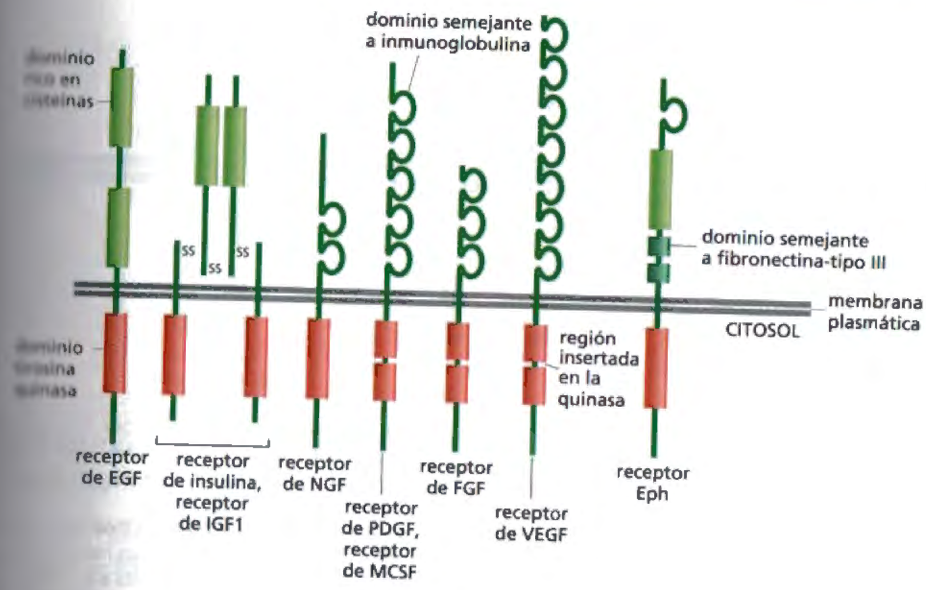


Figura 15–52 Algunas subfamilias de RTK. Solamente se indican uno o dos miembros de cada subfamilia. Nótese que en algunas subfamilias el dominio tirosina quinasa se halla interrumpido por una "región insertada en la quinasa". No se conoce el significado funcional de los dominios ricos en residuos cisteína, ni de los dominios semejantes a inmunoglobulinas, ni de los dominios semejantes a la fibronectina de tipo III. Algunos de los ligandos para estos receptores se describen en la Tabla 15–4, así como algunas de las respuestas representativas que median.

las células. Esta *señalización bidireccional* entre efrinas y receptores Eph es necesaria, por ejemplo, para evitar que determinados grupos próximos de células se mezclen entre ellas durante el desarrollo.

Existen alrededor de 60 genes que codifican RTK en humanos. Estos receptores se pueden clasificar en más de 16 subfamilias estructurales, cada una de las cuales está relacionada con su familia complementaria de proteínas ligando. En la **Figura 15–52** se muestran varias de estas familias que actúan en mamíferos y en la **Tabla 15–4** se relacionan algunos de sus ligandos y funciones. En todos los casos, la unión de la proteína señal al dominio de unión del ligando en el exterior de la célula permite que el dominio tirosina quinasa intracelular fosforile determinadas cadenas laterales de tirosina, tanto de la propia proteína receptora como de otras proteínas de señalización intracelular, las cuales a continuación se unen a las tirosinas fosforiladas de los receptores.

¿De qué forma la unión de un ligando extracelular activa el dominio quinasa que se halla situado al otro lado de la membrana plasmática? En los GPCR parece que la unión del ligando cambia la orientación relativa de varias hélices α transmembrana, modificando así la posición relativa de los bucles citosólicos entre sí. Sin embargo, resulta difícil de imaginar que un cambio de conformación pueda propagarse a través de la bicapa lipídica mediante una

Tabla 15–4 Algunas proteínas señalizadoras que actúan mediante receptores tirosina quinasa (RTK)

PROTEÍNA SEÑALIZADORA	RECEPTORES	ALGUNAS RESPUESTAS REPRESENTATIVAS
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	receptor de EGF	estimula la supervivencia, crecimiento y proliferación o diferenciación de varios tipos celulares; actúa como señal inductora en el desarrollo
Insulina	receptor de insulina	estimula la utilización de carbohidratos y la síntesis proteica
Factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGF1 y IGF2)	receptor de IGF1	estimulan el crecimiento y la supervivencia en varios tipos celulares
Factor de crecimiento nervioso (NGF)	Trk A	estimula la supervivencia y el crecimiento de algunas neuronas
Factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF AA, BB, AB)	receptores de PDGF (α y β)	estimula la supervivencia, crecimiento, proliferación y migración de varios tipos celulares
Factor estimulador de la formación de colonias de macrófagos (MCSF)	receptor de MCSF	estimula la proliferación y diferenciación de monocitos/macrófagos
Factores de crecimiento de fibroblastos (FGF1 a FGF24)	receptores de FGF (FGFR1, FGFR4, y varias isoformas de cada uno de ellos)	estimulan la proliferación de varios tipos celulares; inhibe la diferenciación de algunas células precursoras; actúan como señal inductora en el desarrollo
Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)	receptor de VEGF	estimula la angiogénesis
Efrinas (tipos A y B)	receptores Eph (tipos A y B)	estimulan la angiogénesis; guían la migración de células y axones

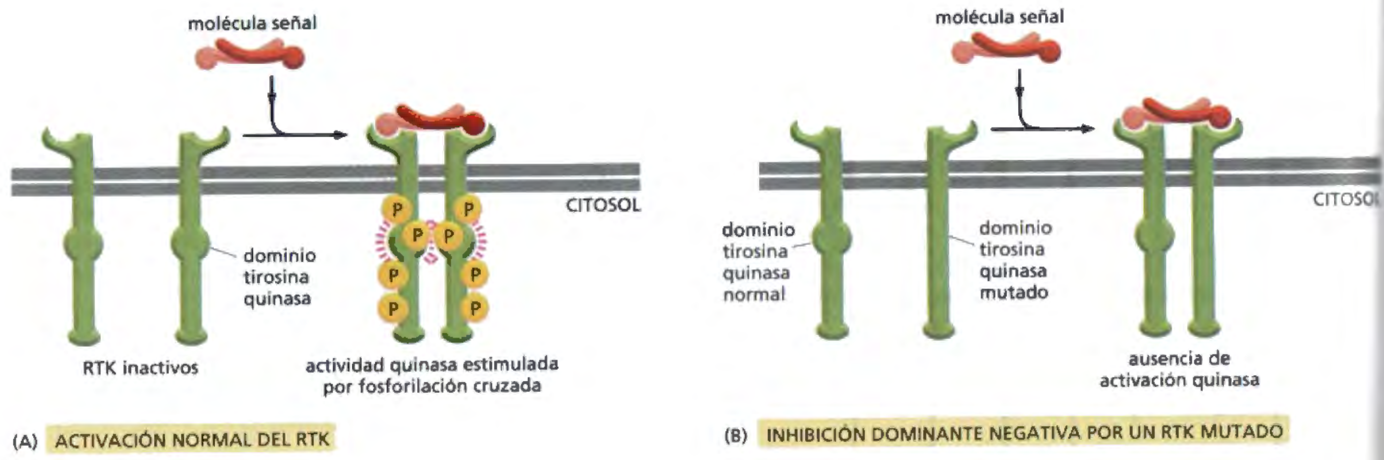


Figura 15-53 Activación e inactivación de RTK por dimerización. (A) Los receptores normales dimerizan en respuesta a la unión del ligando. Los dos dominios quinasa se fosforilan de forma cruzada, uno a otro, incrementando su actividad y activando así aún más el dímero de receptores al fosforilar otros sitios del dímero. (B) El receptor mutado puede dimerizar normalmente pero tiene el dominio quinasa inactivado, por lo que no puede fosforilar de forma cruzada el receptor normal que forma parte del dímero. Por este motivo, si el receptor mutado está presente en exceso bloqueará la señalización por los receptores normales; este proceso se denomina *regulación dominante negativa*. En biología celular se utiliza con frecuencia esta estrategia para inhibir un determinado tipo de RTK de una célula y poder así determinar su función normal. Se puede utilizar una aproximación similar a ésta para inhibir la función de otros tipos de receptores y de proteínas señalizadoras intracelulares que actúen como dímeros o como grandes oligómeros.

única hélice α transmembrana. En lugar de ello, en muchas RTK la unión del ligando hace que las cadenas de los receptores dimericen, juntando entre sí los dominios quinasa de dos receptores (un ejemplo de *proximidad inducida*, de la que ya hemos tratado) de forma que se fosforilan de forma cruzada sobre varias tirosinas, un proceso denominado *transautofosforilación* (**Figura 15-53**A).

Dado que es necesaria la dimerización del receptor, resulta relativamente sencillo inactivar una RTK determinada en un intento de valorar su importancia en una respuesta celular particular. Con este propósito, las células son transfectadas con un DNA que codifica una forma mutante del receptor tirosina quinasa, que dimeriza normalmente pero que tiene un dominio quinasa inactivo. Cuando se coexpresa a un nivel elevado con receptores normales, los receptores mutantes actúan de manera *dominante negativa*, inhabilitando los receptores normales al formar dímeros inactivos con ellos (Figura 15-53B).

Determinadas tirosinas fosforiladas de RTK actúan como lugares de unión de proteínas señal intracelulares

La transfosforilación de dominios citosólicos de los RTK contribuye de dos maneras a la activación del receptor. Primero, la fosforilación de residuos tirosina en el dominio quinasa incrementa la actividad quinasa de la enzima. Segundo, la fosforilación de residuos tirosina fuera del dominio quinasa genera lugares de unión de alta afinidad para determinadas proteínas señalizadoras intracelulares. Cada una de estas proteínas señalizadoras se une de forma específica a determinados lugares fosforilados de los receptores activados, ya que tienen dominios de unión específicos a fosfotirosinas que reconocen además determinadas características del entorno de la cadena polipeptídica.

Cuando se han unido al RTK activado, cada proteína señalizadora puede resultar fosforiladas en tirosinas y así activarse. Sin embargo, en muchos casos la sola unión puede ser suficiente para activar la proteína señalizadora unida induciendo cambios de conformación en la proteína o acercándola a la siguiente proteína de la vía de señalización. Así, la transautofosforilación actúa como un interruptor que desencadena el ensamblaje transitorio de un complejo señalizador intracelular, el cual puede transmitir la señal a través de varias rutas hacia varios destinos de la célula (**Figura 15-54**). Dado que diferentes RTK se unen a distintas combinaciones de estas proteínas señalizadoras, activan diversas respuestas.

Los receptores de insulina y de IGF1 actúan de una forma ligeramente diferente. Son tetrámeros (véase la Figura 15-52) y se cree que la unión del ligando induce una reordenación de las cadenas transmembrana de los receptores, desplazando los dos dominios quinasa que quedan muy juntos. Además, la mayoría de los lugares de unión a fosfotirosinas generados por la unión del ligando no se localizan en el propio receptor sino en una proteína de unión especializada denominada *sustrato-1 del receptor de insulina* (*IRS1: insulin receptor substrate-1*). El receptor activado primero transautofosforila sus dominios quinasa, los cuales entonces fosforilan IRS1 en varios residuos tirosina, con lo que se generan muchos más lugares de unión que los que podrían darse en el receptor (véase Figura 15-22). Algunas otras RTK utilizan proteínas de unión de una forma similar para aumentar el tamaño del complejo de señalización.

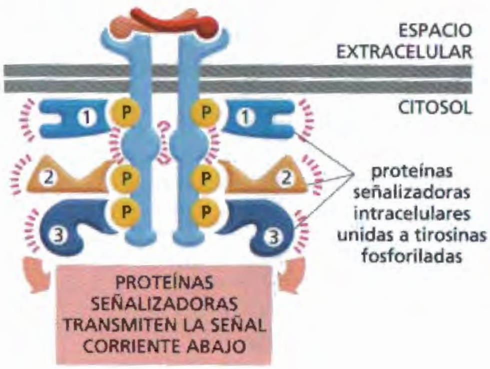


Figura 15–54 Anclaje de proteínas señalizadoras intracelulares a fosfotirosinas en un RTK activado. El receptor activado y las proteínas señalizadoras unidas a él forman un complejo de señalización, que puede difundir señales a varias vías de señalización.

Los residuos tirosina fosforilados actúan como lugares de unión de proteínas con dominios SH2

Una colección completa de proteínas señalizadoras intracelulares pueden unirse a las fosfotirosinas de RTK (o de proteínas de unión especiales, como IRS1) contribuyendo a transmitir la señal hacia adelante sobre todo a través de cadenas de interacciones proteína-proteína por *dominios de interacción* modular, como hemos descrito. Algunas de estas proteínas de unión son enzimas, como la **fosfolipasa C-γ (PLCγ**: *phospholipase C-γ*), que actúa de la misma forma que la fosfolipasa C-β y activa la vía de señalización de los fosfolípidos de inositol, de la que hemos tratado anteriormente en relación con los GPCR (véase Figuras 15–38 y 15–39). A través de esta vía, los RTK pueden aumentar los niveles citosólicos de Ca^{2+} y activar la PKC. Otra enzima que se une a estos receptores es la tirosina quinasa citoplasmática *Src*, que fosforila tirosinas de otras proteínas señalizadoras. Otra enzima es la *fosfatidil inositol 3´-quinasa (PI 3-quinasa)* que no fosforila proteínas sino lípidos; como se tratará posteriormente, los lípidos fosforilados actúan como lugares de unión atrayendo a diferentes proteínas señalizadoras hacia la membrana plasmática.

Las proteínas señalizadoras intracelulares que se unen a residuos de fosfotirosina tanto de RTK como de proteínas de unión unidas a ellos tienen estructuras y funciones muy variadas. Sin embargo, por lo general comparten dominios de unión a fosfotirosinas altamente conservados. Estos dominios pueden ser **dominios SH2** (*Src homology region; región homóloga a Src*) o, con menos frecuencia, *dominios PTB* (*phosphotyrosine-binding; unión a fosfotirosinas)*. Tal como se señaló, estos pequeños dominios de interacción permiten a las proteínas que los presentan unirse a RTK activados así como a otras proteínas señalizadoras intracelulares que hayan sido fosforiladas de forma transitoria en residuos tirosina (**Figura 15–55**). Como ya se indicó, muchas proteínas señalizadoras también tienen otros dominios de interacción que les permiten interaccionar específicamente con otras proteínas como parte del proceso de señalización. Entre estos dominios se encuentra el *dominio SH3*, que une motivos ricos en residuos prolina de proteínas intracelulares (véase la Figura 15–22). Existen aproximadamente 115 dominios SH2 y unos 295 dominios SH3 codificados en el genoma humano.

No todas las proteínas que se unen a RTK activados a través de dominios SH2 participan en la transmisión de la señal. Algunas de ellas actúan disminuyendo el proceso de señalización y proporcionan una retroalimentación negativa. Un ejemplo de ellas es la *proteína c-Cbl*, que puede unirse a ciertos receptores activados y catalizar su ubiquitinización, la adición covalente de una molécula de ubiquitina a uno o varios lugares del receptor (denominada *monoubiquitinización* para distinguirla de la *poliubiquitinización* en la que se añaden a la proteína una o más largas cadenas de ubiquitina). La monoubiquitinización estimula la internalización y la degradación de los receptores en los lisosomas –un ejemplo de regulación por disminución (*down-regulation*) del receptor (véase Figura 15–29). Algunas proteínas endocíticas que tienen *motivos de interacción con ubiquitinas* (*UIM*: *ubiquitin-interaction motifs*) reconocen los RTK monoubiquitinizados y los dirigen a vesículas recubiertas de clatrina y finalmente a lisosomas (se describe en el Capítulo 13). Las mutaciones que inactivan la regulación hacia abajo de RTK dependiente de c-Cbl generan señalizaciones RTK prolongadas, por lo que promueven el desarrollo de cáncer.

Como en el caso de las GPCR, la endocitosis inducida por ligando de los RTK no siempre disminuye la señalización. En algunos casos, los RTK son endocitados con sus proteínas de señalización unidas, con lo cual continúan la señalización desde los endosomas o desde

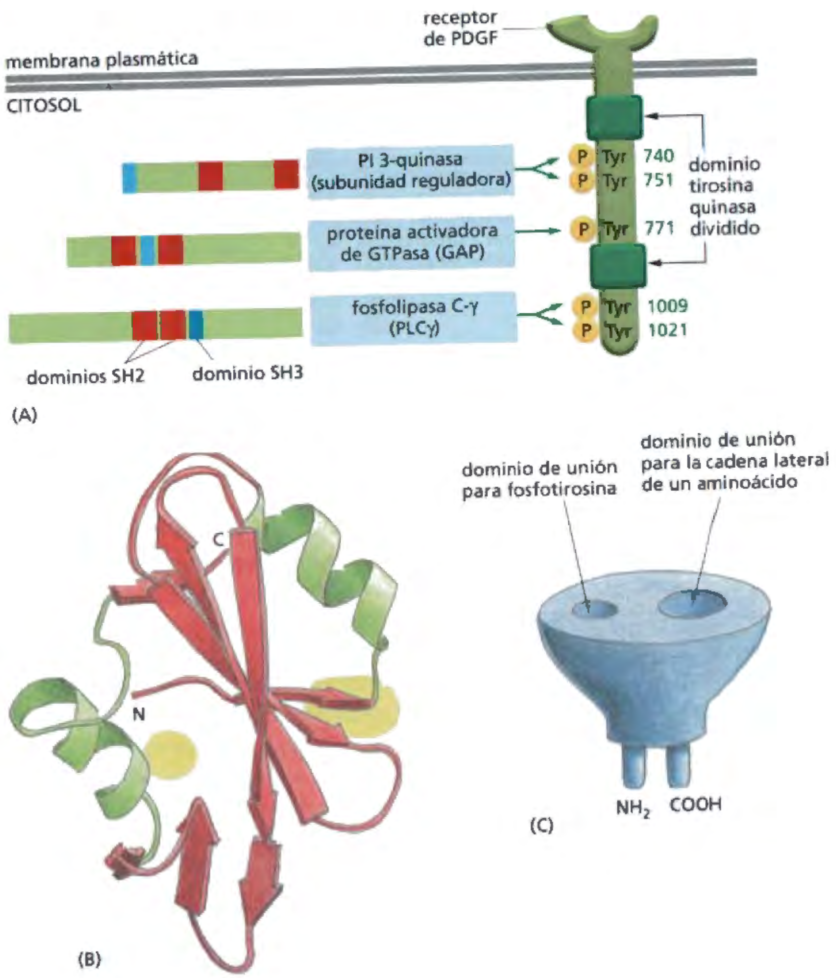


Figura 15–55 Unión a un receptor activado de PDGF de proteínas señalizadoras intracelulares que contienen SH2. (A) Esquema de un receptor de PDGF mostrando cinco lugares de unión de fosfotirosinas, tres en la región insertada en la quinasa y dos en el extremo carboxilo terminal; a estos lugares se unen las tres proteínas señal que se indican a su izquierda. Los números de la derecha indican las posiciones de las tirosinas en la cadena polipeptídica. Estos lugares de unión han sido identificados utilizando la tecnología del DNA recombinante para mutar determinados residuos tirosina del receptor: por ejemplo, la mutación de las tirosinas 1009 y 1021 impide la unión y la activación de PLCγ, de forma que la activación del receptor no estimula el proceso de señalización de fosfolípidos de inositol. Se indica la localización de los dominios SH2 (en *rojo*) y SH3 (en *azul*) en las tres proteínas señalizadoras. (Existen otros lugares de unión de fosfotirosinas al receptor, que no se indican en el esquema, incluyendo los que unen la tirosina quinasa citoplasmática Src y dos proteínas adaptadoras.) No se sabe cuántas proteínas señalizadoras se pueden unir de forma simultánea a una sola RTK. (B) Estructura tridimensional de un dominio SH2, determinada mediante cristalografía de rayos X. En *amarillo* a la derecha, se muestra el sitio de unión para la fosfotirosina y en *amarillo* a la izquierda se muestra un sitio de unión específico a una cadena lateral de un aminoácido (en este caso, isoleucina) (véase también la Figura 3–39). (C) El dominio SH2 es un módulo "enchufe" compacto que puede ser insertado en casi cualquier sitio de una proteína sin alterar ni el plegamiento ni la función de dicha proteína (explicado en el Capítulo 3). Debido a que cada dominio tiene diferentes lugares de unión que reconocen fosfotirosinas y determinadas cadenas laterales de aminoácidos, los diferentes dominios SH2 reconocen fosfotirosinas en el contexto de diferentes secuencias de aminoácidos flanqueantes. (B, basado en datos de G. Waksman et al., *Cell* 72:779-790, 1993. Con la autorización de Elsevier.)

otros compartimientos intracelulares. Este mecanismo, por ejemplo, permite al *factor de crecimiento nervioso (NGF: nerve growth factor)* unirse a su RTK específico (llamado TrkA) al final de un largo axón de la célula nerviosa y señalizar el cuerpo celular de la misma célula, situado a una gran distancia del final del axón. En este caso, las vesículas endocíticas de señalización, que contienen TrkA con NGF unido en la parte interior de la vesícula y proteínas señalizadoras unidas a la cara citosólica, son transportadas a lo largo del axón hasta el soma celular, donde señalizan la célula para que sobreviva.

Algunas proteínas señalizadoras están formadas casi completamente por dominios SH2 y SH3, y actúan como *adaptadoras* acoplando proteínas fosforiladas en tirosina con otras proteínas que no tienen sus propios dominios SH2 (véase Figura 15–22). Las proteínas adaptadoras de este tipo ayudan a acoplar los RTK activados a una importante proteína señalizadora, la proteína *Ras*, una GTPasa monomérica que, a su vez, puede activar varias vías señalizadoras corriente abajo, tal como se describe a continuación.

Ras forma parte de una gran superfamilia de GTPasas monoméricas

La **superfamilia Ras** está formada por varias familias de GTPasas monoméricas pero únicamente las familias Ras y Rho transmiten señales a partir de receptores de superficie celular (**Tabla 15–5**). Interactuando con diferentes proteínas señalizadoras intracelulares, un solo miembro de la familia Ras o de la familia Rho puede difundir de forma coordinada la señal a lo largo de varias vías de señalización y actuar como un *centro de señalización.*

En humanos hay tres proteínas Ras principales, íntimamente relacionadas entre sí (H-Ras, K-Ras y N-Ras –véase tabla 15–5). A pesar de que tienen funciones sutilmente diferentes, parece que actúan de la misma forma, por lo que nos referiremos a todas ellas como **Ras.** Como muchas GTPasas monoméricas, Ras tiene uno o varios grupos lipídicos unidos covalentemente que ayudan a anclar la proteína a la cara citoplasmática de la membrana,

Tabla 15–5 La familia Ras de GTPasas monoméricas

FAMILIA	ALGUNOS MIEMBROS DE LA FAMILIA	ALGUNAS FUNCIONES
Ras	H-Ras, K-Ras, N-Ras	transmite señales desde los RTK
	Rheb	activa mTOR que estimula el crecimiento celular
	Rep1	activado por GEF dependiente de AMP-cíclico; influye en la adhesión celular mediante la activación de integrinas
Rho*	Rho, Rac, Cdc42	transmite señales desde los receptores de membrana al citoesqueleto y a otros lugares
ARF*	ARF1-ARF6	regula el ensamblaje de proteínas de recubrimiento en vesículas intracelulares
Rab*	Rab1-60	regula el tráfico intracelular de vesículas
Ran*	Ran	regula el ensamblaje del huso mitótico y el transporte nuclear de RNA y proteínas

*La familia Rho se trata en el Capítulo 16, las proteínas ARF y Rab en el Capítulo 13, y la proteína Ran en los Capítulos 12 y 17. En la Figura 3-72 se muestra la estructura tridimensional de Ras.

donde actúa la proteína, que sobre todo es en la membrana plasmática desde donde libera señales a otras partes de la célula. Por ejemplo, Ras es requerida a menudo cuando RTK señaliza al núcleo para estimular la proliferación o la diferenciación, procesos que requieren cambios en la expresión de genes. Si se inhibe la función de Ras mediante la microinyección de anticuerpos neutralizantes anti-Ras o formas mutantes dominantes negativas de Ras, las respuestas de proliferación o de diferenciación que por lo general inducen RTK activados, no se producen. Por el contrario, el 30% de los tumores humanos tienen formas mutantes hiperactivas de Ras, que contribuyen en gran medida a la proliferación descontrolada de las células cancerosas.

Igual que otras proteínas de unión a GTP, Ras actúa como un interruptor molecular, alternando entre dos estados conformacionales diferentes: activo cuando une GTP e inactivo cuando une GDP (véase la Figura 15–18B). <GAAC> Tal como hemos descrito para el caso de las GTPasas monoméricas en general, dos clases de proteínas señalizadoras regulan la actividad de Ras influenciando su transición entre el estado activo y el inactivo (véase Figura 15–19). Los *factores intercambiadores de nucleótidos de guanina de Ras* (**Ras-GEF**: *Ras guanine nucleotide exchange factors*), estimulan la disociación de GDP y la posterior captación de GTP del citosol, activando así a Ras. Las *proteínas activadoras de GTPasas de Ras* (**Ras-GAP**: ***Ras** GTPase-activating proteins*) incrementan la velocidad de hidrólisis catalizada por Ras del GTP que tienen unido, de forma que inactivan Ras. Las formas mutantes hiperactivas de Ras son resistentes a la estimulación de la actividad GTPasa mediada por GAP, de modo que quedan fijadas de forma permanente en su estado activo unido a GTP, por lo que estimulan el desarrollo de cáncer.

Sin embargo, ¿de qué manera los RTK activan normalmente Ras? En principio pueden activar una Ras-GEF o inhibir una Ras-GAP. Aunque algunas GAP se unen de forma directa (a través de sus dominios SH2) a RTK activados (véase Figura 15–55A), por lo general sólo las GEF se unen indirectamente a ellos; es el acoplamiento indirecto del receptor Ras-GEF lo que conduce a la proteína Ras a su estado activo. De hecho, la pérdida de función de una Ras-GEF tiene un efecto similar al de la pérdida de función de esta Ras. La activación de otra superfamilia Ras, incluyendo los componentes de la familia Rho, también se produce a través de la activación de GEF. El GEF particular determina en qué membrana se ha activado la GTPasa y, actuando sobre un armazón, que proteínas corriente abajo activa la GTPasa.

Las proteínas Ras y las proteínas que las regulan han sido muy conservadas durante la evolución. Estudios genéticos realizados en *Drosophila* y en *C. elegans* proporcionan las primeras pistas sobre cómo los RTK activan a Ras. Estudios genéticos del desarrollo de las células fotorreceptoras en el ojo de *Drosophila* han resultado en particular informativos.

Los RTK activan Ras a través de adaptadores y GEF: evidencias a partir del desarrollo del ojo de *Drosophila*

El ojo compuesto de *Drosophila* está formado por unas 800 unidades idénticas llamadas omatidios, cada uno compuesto por 8 células fotorreceptoras (R1-R8) y 12 células accesorias (Figura 15–56). El ojo se desarrolla a partir de una sola lámina epitelial y las células que forman cada omatidio son reclutadas de la lámina epitelial siguiendo una secuencia fija mediante series de interacciones célula-célula. Empezando con el desarrollo del fotorreceptor



Figura 15–56 Electromicrografía de un ojo compuesto de *Drosophila*. El ojo está compuesto de unas 800 unidades idénticas (omatidios) cada uno de los cuales tiene un cristalino que enfoca la luz sobre ocho células fotorreceptoras en su base. (Cortesía de Kevin Moses.)

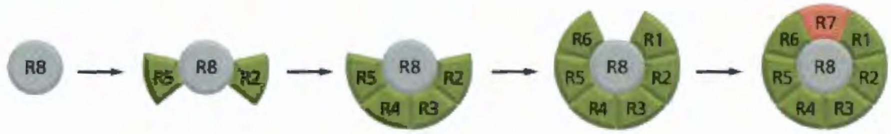


Figura 15-57 Ensamblaje de las células de un fotorreceptor en un omatidio de *Drosophila* en desarrollo. Las células son reclutadas de forma secuencial para transformarse en fotorreceptoras, empezando con R8 y acabando con R7, que es la última célula fotorreceptora en desarrollarse.

R8 cada célula en diferenciación induce a sus vecinas inmediatas no comprometidas a adoptar un destino específico y ensamblarse en el omatidio en desarrollo (**Figura 15-57**).

El desarrollo del fotorreceptor R7, necesario para la detección de la luz ultravioleta, se ha estudiado más a fondo, empezando con la descripción de una mosca mutante llamada *Sevenless* (de "sin el siete") (*Sev*), en la que el único defecto observado es una deficiencia de R7. Estos mutantes son fáciles de detectar sobre la base de su ceguera a la luz ultravioleta. Se observó que el gen *Sev* normal codifica una RTK que se expresa en las células precursoras de R7. Análisis genéticos posteriores de mutantes en los que el desarrollo de R7 es bloqueado pero no se afecta la proteína Sev, condujeron a la identificación del gen *Bride-of-sevenless* (de "novia de sevenless") (*Boss*) que codifica el ligando para RTK Sev. Boss es una proteína de siete pasos transmembrana que sólo se expresa en la superficie de la célula R8 adyacente y que cuando se une, y activa, a Sev, induce la célula precursora de R7 a que se diferencie a fotorreceptor R7. La proteína Sev también se expresa en otras varias células precursoras del omatidio en desarrollo, pero ninguna de ellas entra en contacto con R, por lo que la proteína Sev no se activa y estas células no se diferencian a fotorreceptores R7.

Los componentes de las vías de señalización intracelular activadas por Sev en las células precursoras de R7 han sido más difíciles de identificar que el receptor o el ligando, ya que las mutaciones que los inactivan son letales. El problema se solucionó desarrollando un estudio genético de moscas que presentaban una proteína Sev parcialmente inactiva. Uno de los genes identificados codifica una proteína Ras. Las moscas en las que se inactivan por mutación ambas copias del gen *Ras*, mueren, mientras que las moscas en las que sólo se inactiva uno de ambos genes, sobrevive. Pero cuando una mosca tiene una proteína Sev parcialmente inactiva en sus ojos en desarrollo, una mutación inactivante en una copia del gen *Ras* provoca la pérdida de R7. Aún más, si uno de los genes *Ras* se sobreactiva mediante mutación, R7 se desarrolla incluso en los mutantes en los que tanto *Sev* como *Boss* son inactivos. Estos hechos indican que Ras actúa corriente abajo de Sev y que su activación en las células precursoras de R7 es necesaria y suficiente para inducir la diferenciación de R7.

Un segundo gen identificado en este estudio genético se denominó *Son-of-sevenless* (de "hijo de sevenless") (*Sos*). Codifica una GEF-Ras necesaria para que Sev RTK active a Ras. Un tercer gen (llamado *Drk*) codifica una proteína adaptadora que acopla el receptor Sev a la proteína Sos; el dominio SH2 de la proteína adaptadora Drk se une, activando a Sev, mientras que sus dos dominios SH3 se unen a Sos (**Figura 15-58**). Este tipo de estudio genético, en los que se utilizan organismos con algún componente parcialmente incapacitado para identificar genes que codifican otras proteínas de la vía, se ha utilizado con éxito en muchos ámbitos.

Estudios bioquímicos y de biología celular han mostrado que este acoplamiento de RTK a Ras se produce por un mecanismo similar en las células de mamífero, en las que la proteína

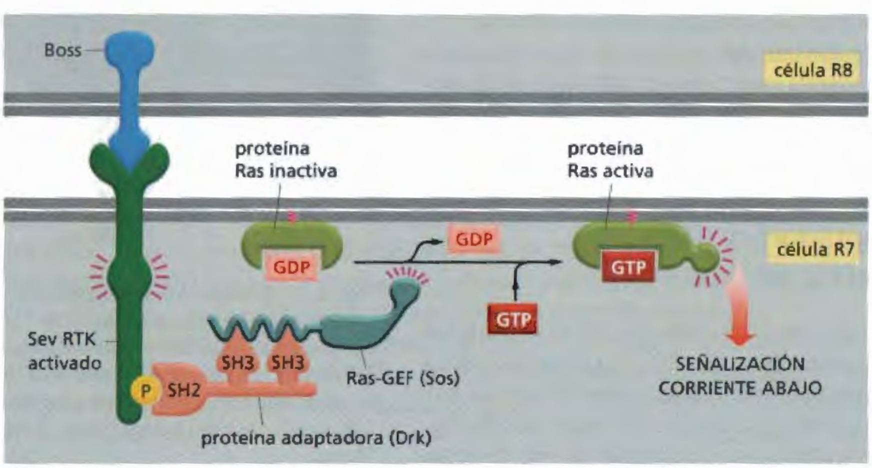


Figura 15-58 De qué forma Sev RTK activa Ras en el ojo de la mosca. La activación de Sev sobre la superficie de la célula precursora de R7 por la proteína Boss de la superficie de R8 activa Ras-GEF Sos a través de la proteína adaptadora Drk. Drk reconoce de forma específica una tirosina fosforilada de la proteína Sev mediante un dominio SH2 e interactúa con Sos mediante dos dominios SH3. Sos estimula la proteína Ras inactiva reemplazando el GDP que ésta lleva unido por GTP, lo cual activa a Ras a transmitir la señal corriente abajo, induciendo a la célula precursora de R7 a diferenciarse a una célula fotorreceptora sensible a UV.

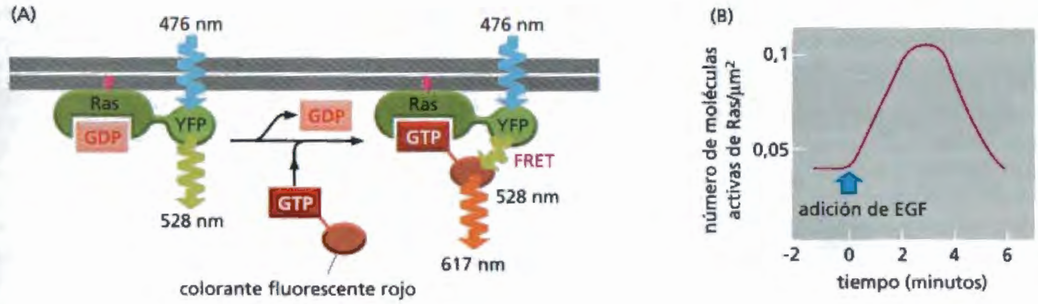


Figura 15–59 Activación transitoria de Ras puesta de manifiesto por transferencia de energía resonante fluorescente (FRET) de una sola molécula. (A) Ilustración esquemática de la estrategia experimental. Células de una línea celular de un cáncer humano se modificaron genéticamente para expresar una proteína Ras que estaba unida covalentemente a la proteína fluorescente amarilla (YFP: *yellow fluorescent protein*). Se microinyectó en el soma de estas células GTP que estaba unido a un colorante fluorescente rojo. Entonces, las células se estimularon con la proteína señalizadora extracelular factor de crecimiento epidérmico (EGF: *epidermal growth factor*), y se siguieron las moléculas fluorescente Ras-YFP en la superficie interna de la membrana plasmática mediante microscopía de videofluorescencia en cada una de las células individualmente. Cuando una molécula fluorescente Ras-YFP se activa, cambia su GDP no marcado por GTP marcado; ahora, la luz amarillo-verdosa emitida por YFP activa la GTP fluorescente a emitir luz roja. Así, se puede seguir la activación de una sola molécula Ras mediante la emisión de luz fluorescente roja a partir de una mancha previa de luz amarillo-verdosa en la membrana plasmática. Como se muestra en (B), las moléculas de Ras activadas se pueden detectar tras unos 30 segundos de la estimulación con EGF. La señal roja alcanza el máximo a los 3-4 minutos y después diminuye hasta el valor basal a los 6 minutos. Se sabe que Ras-GAP es reclutada en la misma zona de la membrana plasmática que Ras, por lo que probablemente tiene un papel importante en la rápida disminución de la señal de Ras. (Modificado de H. Murakoshi et al., *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 101:7317-7322, 2004. Con la autorización de la National Academy of Sciences.)

adaptadora se denomina **Grb2** y la GEF-Ras también se denomina Sos (ver Figura 15–22). Es interesante que cuando Sos de mamífero activa a Ras, Ras actúa hacia atrás simulando de nuevo Sos, formando un circuito de retroalimentación positivo sencillo.

Los RTK no son los únicos que conducen a la activación de Ras. Por ejemplo, el Ca^{2+} y el diacilglicerol activan GEF-Ras que se halla principalmente en el cerebro; esta GEF-Ras puede acoplar GPCR a la activación de Ras con independencia de Sos.

Una vez activada, Ras activa otras varias proteínas señalizadoras que transmiten la señal corriente abajo, como se describe a continuación.

Ras activa una molécula señalizadora MAP-quinasa

Tanto las fosforilaciones en tirosina como la activación de Ras estimuladas por RTK activados suelen tener una vida muy corta (**Figura 15–59**). Las *proteínas fosfatasa específicas de tirosinas* revierten rápidamente las fosforilaciones y las GAP inducen que Ras activada se inactive a sí misma hidrolizando el GTP que tiene unido hasta GDP. Para estimular las células a proliferar o a diferenciarse, estos cortos eventos señal deben convertirse en eventos más duraderos que puedan mantener la señal y transmitirla corriente abajo hacia el núcleo para modificar la expresión génica. Uno de los mecanismos utilizados en este sentido es un sistema de proteínas denominado *módulo proteína quinasa activada por mitógeno* (**módulo MAP-quinasa**) (**Figura 15–60**). En su conjunto, los tres componentes de este sistema forman un módulo de señalización funcional que ha sido muy conservado, desde las levaduras hasta los humanos y que actúa, con algunas variaciones, en muchos contextos de señalización diferentes.

Los tres componentes son proteínas quinasa. La quinasa final de la serie se denomina simplemente MAP quinasa (MAPK, de *kinase*). La anterior a ésta es la MAP-quinasa-quinasa (MAPKK): fosforila, activándola, a la MAP-quinasa. La anterior a ésta, que recibe la señal activadora directamente de Ras, es la MAP-quinasa-quinasa-quinasa (MAPKKK): fosforila, activándola, a la MAPKK. En la **vía de señalización de las MAP-quinasas RAS** de los mamíferos estas tres quinasas se denominan mediante nombres más cortos: Raf (=MAPKKK), Mek (=MAPKK) y Erk (=MAPK).

Una vez activada, la MAP transmite la señal corriente abajo fosforilando varias proteínas celulares, incluyendo otras proteínas quinasa y proteínas reguladoras de la expresión génica (véase la Figura 15–60). Por ejemplo, Erk MAP-quinasa entra en el núcleo donde fosforila uno o más componentes de un complejo regulador de la expresión génica. Ello activa la transcripción de un conjunto de *genes tempranos inmediatos*, denominados así porque se activan pocos minutos después de que un RTK reciba una señal extracelular, incluso aunque la síntesis proteica esté bloqueada experimentalmente con fármacos. Algunos de estos genes codifican otras proteínas reguladoras de la expresión génica que activan a otros genes, un proceso que requiere síntesis proteica y más tiempo. (Esta relación entre los genes inmediatos y los genes más tardíos es similar a la relación existente entre las respuestas primaria y secundaria de la expresión génica producida por los receptores nucleares, que se ha explicado previamente –véase Figura 15–15.)

De este modo, la vía de señalización Ras-MAP-quinasa transmite señales desde la superficie celular hasta el núcleo, donde modula el patrón de expresión génica. Entre los genes activados por dicha vía se encuentran algunos que estimulan la proliferación celular, como por ejemplo los genes que codifican las *ciclinas* G_1 (se describe en el Capítulo 17).

Normalmente las señales extracelulares activan MAP-quinasas sólo de manera transitoria y durante el periodo de tiempo en el que se mantienen activas influencian profunda-

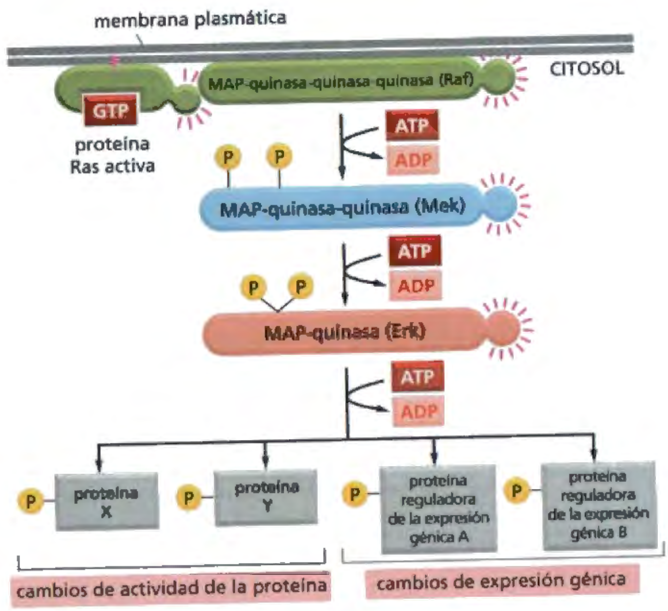


Figura 15–60 El módulo de fosforilación serina/treonina de MAP-quinasa activado por Ras. El módulo de tres componentes empieza con una MAP-quinasa-quinasa-quinasa denominada *Raf.* Ras recluta Raf a la membrana plasmática y ayuda a activarla. Raf entonces activa la MAP-quinasa-quinasa *Mek*, la cual activa la MAP-quinasa *Erk*. Erk a su vez fosforila una gran variedad de proteínas corriente abajo, que incluyen otras proteínas quinasa, así como proteínas reguladoras de la expresión génica en el núcleo. Los cambios resultantes de expresión génica y actividad proteica causan cambios complejos en el comportamiento celular.

mente la respuesta. Por ejemplo, cuando EGF activa sus receptores en una célula precursora neuronal, la actividad Erk MAP-quinasa es máxima a los cinco minutos y decae con rapidez; el resultado es que las células después siguen dividiéndose. Por el contrario, cuando NGF activa sus receptores en estas mismas células, la actividad Erk se mantiene elevada durante muchas horas y las células paran su proliferación y se diferencian a neuronas. Muchos factores pueden influenciar la duración de la respuesta señalizadora, incluyendo ciclos de retroalimentación positiva o negativa (véase Figura 15–28).

Las MAP-quinasas participan en ciclos de realimentación tanto positivos como negativos, que se pueden combinar generando respuestas que pueden ser graduales o semejantes a un interruptor y tanto breves como prolongadas. En un ejemplo ilustrado antes, en la Figura 15–24, una MAK quinasa activa un complejo ciclo de retroalimentación positiva produciendo una respuesta irreversible de todo o nada cuando los oocitos de rana son estimulados a madurar mediante una breve exposición a la progesterona como molécula señalizadora extracelular. En muchas células, las MAK-quinasas activan un ciclo de retroalimentación negativa aumentando la concentración de una *proteína fosfatasa de especificidad dual* que elimina el fosfato tanto de tirosinas como de treoninas inactivando las MAP-quinasas (que está fosforilada en tirosinas y treoninas por la MAKK). El aumento de la fosfatasa se produce tanto debido a un incremento de la transcripción del gen de la fosfatasa como a la estabilización de la enzima ante la degradación. En la vía MAP-quinasa-Ras que se muestra en la Figura 15–61, Erk también fosforila e inactiva a Raf, proporcionando otro circuito de retroalimentación negativa que contribuye a inhibir el módulo de las MAP-quinasas.

Algunas proteínas de armazón ayudan a impedir el entrecruzamiento de señales entre módulos paralelos de MAP-quinasa

En todas las células eucariotas actúan módulos de señalización MAP-quinasa de tres componentes con diferentes módulos que median diferentes respuestas en una misma célula. Por ejemplo, en la levadura en gemación uno de estos módulos media la respuesta a la feromona de acoplamiento, otro la respuesta al ayuno y otro la respuesta a un estrés osmótico. Algunos de estos módulos MAP-quinasa utilizan una o varias quinasas comunes, a pesar de lo cual se las arreglan para activar diferentes proteínas efectoras y, por lo tanto, respuestas celulares diferentes. Como se ha indicado, una de las maneras mediante las cuales las células evitan los cruces entre las diferentes vías de señalización paralelas y aseguran la especificidad de cada respuesta consiste en utilizar proteínas de armazón (*scaffold proteins*) (véase Figura 15–21A). En las células de levadura, estas proteínas armazón unen algunas o todas las quinasas de cada módulo MAP-quinasa formando un complejo, contribuyendo así a asegurar la especificidad de la respuesta (**Figura 15–61**).

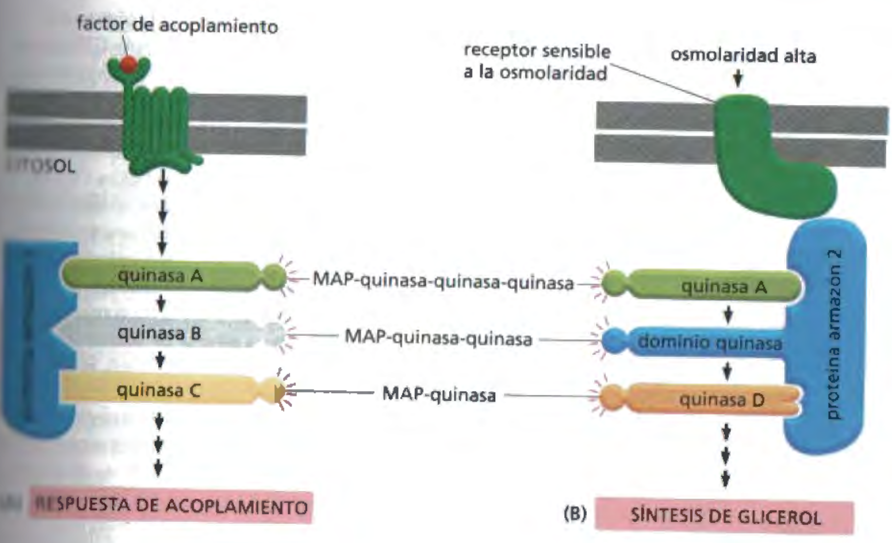


Figura 15–61 Organización mediante proteínas armazón de dos módulos MAP-quinasa en la levadura en gemación. Las levaduras en gemación tienen al menos 6 módulos de tres componentes MAP-quinasa, que están implicados en una gran variedad de procesos biológicos, que incluyen las dos respuestas mostradas: la respuesta al acoplamiento y la respuesta a una osmolaridad elevada. (A) La respuesta al acoplamiento se desencadena cuando un factor de acoplamiento secretado por una levadura con un tipo de acoplamiento contrario se une a un GPCR. Éste activa a una proteína G, que libera su complejo βγ y activa de forma indirectamente una MAP-quinasa-quinasa-quinasa (quinasa A), que transmite la señal corriente abajo. Una vez activada, la MAP-quinasa (quinasa C) se fosforila y así activa varias proteínas que median la respuesta de acoplamiento, en que la célula de levadura para de dividirse y se prepara para la fusión. Las tres quinasas de este módulo están unidas a una proteína de armazón 1. (B) En una segunda respuesta, una célula de levadura expuesta a un ambiente de alta osmolaridad es inducida a sintetizar glicerol aumentando su osmolaridad interna. Esta respuesta está mediada por una proteína receptora transmembrana, sensible a la osmolaridad, y por un módulo de diferentes MAP-quinasas unidas a otra proteína de armazón (armazón 2). (Es importante que el dominio quinasa que pertenece a la proteína de armazón 2 proporcione la actividad MAP-quinasa-quinasa de este módulo.) Aunque ambas vías utilizan la misma MAP-quinasa-quinasa-quinasa (quinasa A, en *verde*), no hay cruces entre ellas porque en cada módulo las quinasas están muy unidas a diferentes proteínas de armazón y el receptor sensor de osmolaridad también está unido a la misma proteína de armazón a la cual se unen la quinasa específica que activa.

Es destacable que la proteína de armazón 1 es capaz de actuar incluso si está despojada (mediante ingeniería genética) de su capacidad de alinear o regular de forma alostérica sus tres quinasas unidas. Parece ser que el papel que desempeña consiste únicamente en unir las quinasas y mantenerlas cerca unas de otras, incrementando así la velocidad a las que se encuentran, como es de esperar a partir de aceleraciones de las velocidades de reacción causadas por unión de proteínas (véase la Figura 3–80C).

Las células de mamífero también utilizan esta estrategia de las proteínas de armazón para evitar los cruces entre los diferentes módulos MAP-quinasa. En una célula de mamífero pueden actuar en paralelo 5 módulos MAP-quinasa. Estos módulos utilizan al menos 12 MAP-quinasas, 7 MAP-quinasa quinasas y 7 MAP-quinasa quinasa quinasas. Dos de estos módulos (que acaban en MAP-quinasas JNK y p38) se activan por diferentes tipos de estrés celular, como la radiación UV, el estrés térmico y el estrés osmótico, así como por la estimulación por citoquinas inflamatorias; otros median respuestas a señales de otras células.

A pesar de que la estrategia de las proteínas de armazón proporciona precisión y evita cruces entre vías, reduce las oportunidades de amplificación y propagación de la señal a diferentes partes de la célula, que requiere que al menos alguno de los componentes pueda difundir (véase Figura 15–17). No está claro hasta que punto los componentes individuales de los módulos MAP-quinasa pueden disociarse de las proteínas de armazón durante el proceso de activación para permitir la amplificación, que es por lo que se denominan módulos y no cascadas.

Las GTPasas de la familia Rho se acoplan funcionalmente a receptores de superficie celular con el citoesqueleto

Además de las proteínas Ras, la otra clase de GTPasas de la superfamilia Ras, que transmiten señales desde receptores de la superficie celular, es la gran **familia Rho** (véase Tabla 15–5). Las GTPasas monoméricas de la familia Rho regulan los citoesqueletos tanto de actina como de microtúbulos, controlando la forma de la célula, la polaridad, la motilidad y la adhesión (se describe en el Capítulo 6). También regulan la progresión a través del ciclo celular, la transcripción de genes y el transporte a través de la membrana, y desempeñan un papel importante en la conducción de la migración celular y el crecimiento de los axones, mediando respuestas del citoesqueleto a la activación de receptores guía especiales. A continuación, se analizará este aspecto de la función de la familia Rho.

Los tres miembros de la familia Rho mejor caracterizados son el propio **Rho**, **Rac** y **Cdc42**, cada uno de los cuales afecta a varias proteínas diana corriente abajo. Como en el caso de Ras, GEF activan y GAP inactivan las GTPasas de la familia Rho; en humanos existen más de 60 GEF-Rho y más de 70 GAP-Rho. Algunos de los GEF y de los GAP son específicos de algún miembro de la familia, mientras que otros son menos específicos. A diferencia de Ras, que está asociado a la membrana incluso cuando está inactivo (unido a GDP), las GTPasas de la familia Rho cuando están inactivas suelen estar unidas a *inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina* (*GDI*: *guanine nucleotide dissociation inhibitors*) en el citosol, lo cual impide que las GTPasas interaccionen con sus GEF-Rho en la membrana plasmática.

A pesar de que los receptores de superficie celular activen las GTPasas Rho activando GEF-Rho, en muchos casos no se conoce de qué forma un receptor activa su GEF. Una de las excepciones es un RTK *Eph* (véase Figura 15–52) de la superficie de neuronas motoras que ayuda a guiar la migración de la punta del axón (denominado *cono de crecimiento*) hasta su músculo diana. La unión de una proteína *efrina* de superficie celular activa el receptor Eph, determinando que el cono de crecimiento se colapse haciendo que descarte regiones no

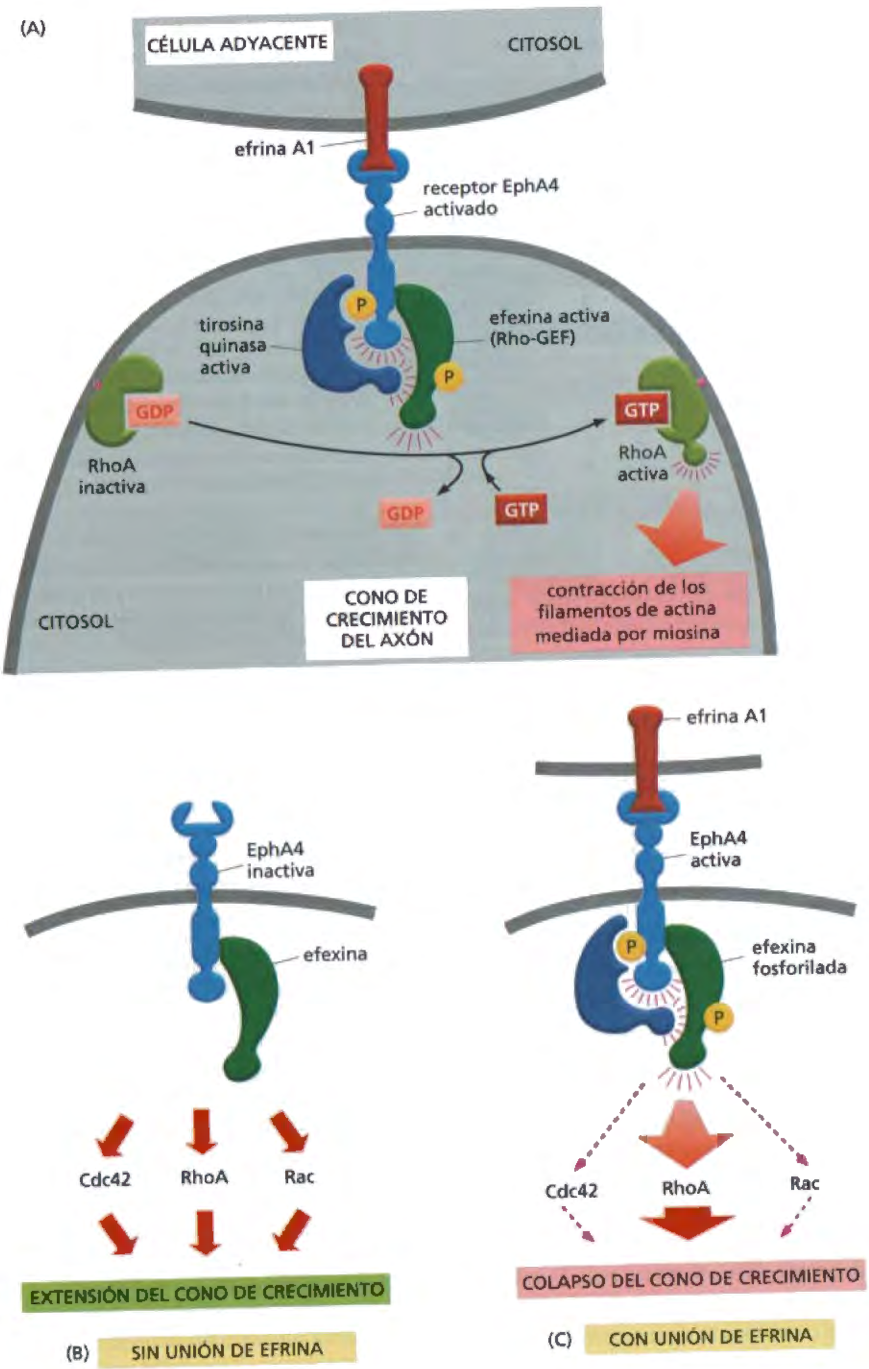


Figura 15–62 Esquema del colapso del cono de crecimiento mediante GTPasas de la familia Rho. (A) La unión de las proteínas efrina A1 transmembrana sobre una célula adyacente, activa RTK EphA4 del cono de crecimiento de un axón, mediante el mecanismo ilustrado en la Figura 15–53A. Unas fosfotirosinas de los receptores Eph activados reclutan y activan una tirosina quinasa citoplasmática que fosforila sobre una tiroxina a la Rho-GEF asociada al receptor, efexina. Este hecho aumenta la capacidad de la efexina de activar las GTPasas de la familia Rho, RhoA. Entonces, RhoA induce el cono de crecimiento a colapsarse al estimular la contracción dependiente de miosina del citoesqueleto de actina. (B) Cuando la efrina A1 no está unida al receptor EphA4, la efexina activa tres miembros diferentes de la familia Rho (Cdc42, Rac y RhoA) aproximadamente lo mismo facilitando el avance del cono de crecimiento. (C) La unión de efrina A1 a EphA4 altera la actividad de la efexina, la cual ahora activará a RhoA, haciendo que el cono de crecimiento se colapse.

apropiadas y manteniéndolo en la búsqueda. La respuesta depende de una GEF Rho denominada *efexina* que está asociada de forma estable con la cola citosólica del receptor Eph. Cuando la unión de efrina activa el receptor Eph, el receptor activa una tirosina quinasa citoplasmática que fosforila a efexina sobre una tirosina e incrementa la capacidad de la efexina de activar la proteína Rho, RhoA. La proteína RhoA activada (RhoA-GTP) regula varias proteínas diana corriente abajo, incluyendo algunas proteínas efectoras que controlan el citoesqueleto de actina haciendo que el cono de crecimiento se colapse (**Figura 15–62**).

Las efrinas son unas de las *proteínas guía* extracelulares mejor caracterizadas y que tienen muchas funciones tanto en el sistema nervioso como fuera de él. Uno de sus papeles, por ejemplo, consiste en dirigir la forma en la que los axones nerviosos crecen desde el ojo hasta el tectum óptico, generando en el cerebro un "mapa" neuronal del campo visual (se describe en el Capítulo 22). Pero la guía del crecimiento exterior de un axón es una cuestión compleja, en la que también participan otros tipos de receptores guía, como se examina en el Capítulo 22. Sin embargo, parece que todos estos receptores guían el movimiento celular influenciando el esqueleto y lo hacen a través de miembros de la familia Rho.

Después de considerar de qué forma los RTK utilizan GEF y GTPasas monoméricas para transmitir señales al interior de la célula, se analizará una segunda estrategia mayor que utiliza RTK, que depende de mecanismos de transmisión intracelular bastante diferentes.

La PI 3-quinasa produce fosfolípidos de inositol que actúan como sitios de unión en la membrana plasmática

Como hemos mencionado, una de las proteínas que se unen a la cola intracelular de las moléculas RTK es la enzima unida a membrana plasmática **fosfoinositol 3-quinasa** (**PI 3-kinase**: ***phosphoinositide 3-kinase***). Esta quinasa no fosforila proteínas sino principalmente fosfolípidos de inositol y tanto los RTK como los GPCR la pueden activar. Tiene un papel central promoviendo la supervivencia y el crecimiento celulares.

El *fosfatidilinositol (PI: **phosphatidylinositol**)* es el único de los lípidos de membrana que puede ser fosforilado de forma reversible en varios lugares sobre su grupo cabeza de inositol, lo que genera una gran variedad de PI fosforilados denominados **fosfoinositoles** (véase Figura 15–37). Cuando se activa, la PI 3-quinasa cataliza la fosforilación en la posición 3 del anillo de inositol generando varios fosfoinositoles (**Figura 15–63**). La producción de $PI(3,4,5)P_3$ es la más importante, ya que puede actuar como un sitio de unión para varias proteínas señalizadoras intracelulares, que se ensamblan formando complejos de señalización que transmiten la señal desde la cara citosólica de la membrana plasmática hacia el interior de las células (véase Figura 15–21C).

Hay que distinguir entre esta utilización de los fosfoinositoles de la utilización descrita en la que $PI(4,5)P_2$ es cortado por PLC-β (en el caso de GPCR) o por PLC-γ (en el caso de RTK) generando IP_3 soluble y diacilglicerol unido a la membrana (véase las Figuras 15–38 y 15–39). Por el contrario $PI(3,4,5)P_3$ no es cortado por PLC. Se sintetiza a partir de $PI(4,5)P_2$ y luego permanece en la membrana plasmática hasta que unas *fosfatasas de fosfoinositoles* específicas lo desfosforilan. De entre todas ellas, hay que destacar la fosfatasa *PTEN*, que desfosforila la posición 3 del anillo de inositol. En muchos cánceres se han encontrado mutaciones de PTEN: al prolongar la señalización por PI 3-quinasa promocionan el crecimiento celular descontrolado.

Existen varios tipos de PI 3-quinasas. Los que se activan por RTK y por GPCR pertenecen a la clase I. Son heterodímeros con una subunidad catalítica y varias subunidades reguladoras. Los receptores RTK activan las *PI 3-quinasas de clase Ia*, en las cuales la subunidad reguladora es una proteína adaptadora que se une a dos fosfotirosinas de los RTK activados mediante sus dominios SH2 (Figura 15–55A). Los receptores GPCR activan las *PI 3-quinasas*

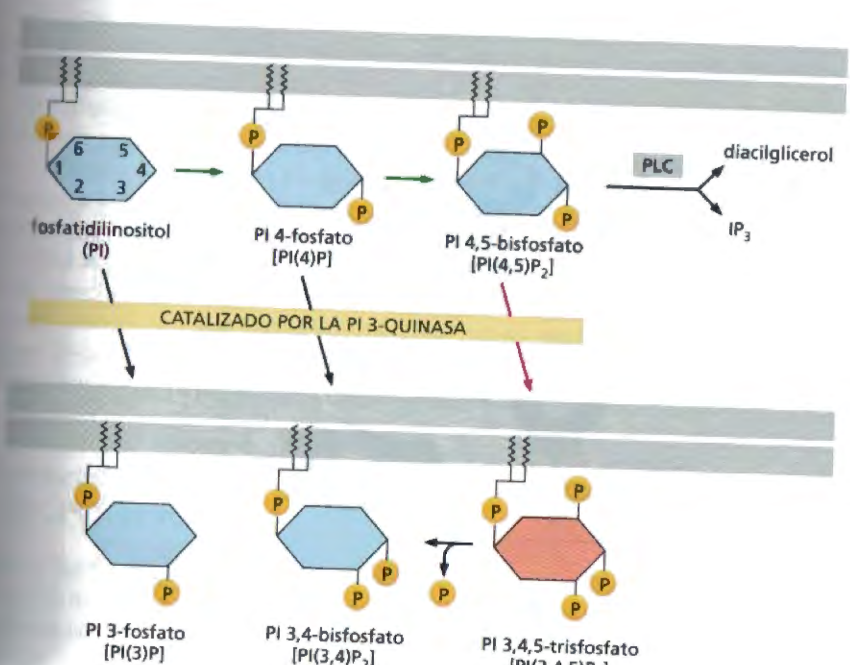


Figura 15–63 Generación de lugares de unión a fosfoinositoles por la PI 3-quinasa. La PI 3-quinasa fosforila el anillo de inositol en el átomo de carbono 3 y genera los fosfoinositoles que se muestran en la parte inferior de la figura (desviándolos de las vías que conducen a IP_3 y diacilglicerol). La fosforilación más importante (indicada en *rojo*) es la $PI(4,5)P_2$ a $PI(3,4,5)P_3$, que puede servir como lugar de unión a proteínas señal con dominios de unión a PIP_3, PH. Otras quinasas de fosfolípidos de inositol catalizan la fosforilación indicada por *flechas verdes*.

de clase Ib, las cuales tienen una subunidad reguladora que se une al complejo βγ de una proteína G trimérica activada cuando los GPCR son activados por sus ligandos extracelulares. La unión directa de Ras activada también puede activar la subunidad catalítica de la clase.

Las proteínas señalizadoras intracelulares se unen a PI(3,4,5)P_3, producidos por la PI 3-quinasa activada a través de un dominio de interacción específica, como es el **dominio de homología a la plecstrina** (**PH**: ***pleckstrin homology***), que ya hemos tratado, y que fue identificado por primera vez en la proteína plecstrina de las plaquetas. Los dominios PH actúan principalmente como dominios de interacción proteína-proteína y sólo un pequeño subconjunto de ellos se unen a PIP_3; al menos algunos de ellos reconocen tanto a una proteína específica unida a membrana como a PIP_3, lo cual aumenta en gran medida la especificidad de la unión y ayuda a explicar por qué no todas las proteínas señalizadoras con dominios PH de unión a PIP_3 se unen a todos los lugares PI(3,4,5)P_3. Los dominios PH se presentan en unas 200 proteínas humanas, incluyendo los Sos GEF Ras descritos anteriormente (véase Figura 15–22).

Una proteína que tiene dominios PH en especial importantes es la serina/treonina proteína quinasa, *Akt*. La *vía de señalización PI 3-quinasa–Akt* es la vía principal que es activada por la hormona *insulina*. También desempeña un papel importante promocionando la supervivencia y el crecimiento de muchos tipos celulares tanto en invertebrados como en vertebrados, como se expondrá a continuación.

La vía de señalización PI 3-quinasa–AKT estimula el crecimiento y la supervivencia de las células animales

Para que un organismo pluricelular crezca, sus células tienen que crecer (acumular masa y aumentar de tamaño). Si las células simplemente se dividieran sin crecer, se harían progresivamente más pequeñas y el organismo, como un todo, se mantendría del mismo tamaño. Como se ha indicado antes, habitualmente se necesitan señales extracelulares para que las células crezcan y se dividan, y también para que sobrevivan (véase Figura 15–8). Por ejemplo, los miembros de la familia de *factores de crecimiento semejantes a insulina* (*IGF*: ***insulin-like growth factor***) estimulan el crecimiento y la supervivencia de muchos tipos de células animales. Se unen a RTK específicos (véase Figura 15–22) que activan PI 3-quinasa a producir PI(3,4,5)P_3. Este PIP_3 recluta dos proteínas quinasa de la membrana plasmática a través de sus dominios PH: **Akt** (también denominada *proteína quinasa B*, o *PKB*) y la *proteína quinasa 1 dependiente de fosfoinositoles* (*PDK1*: ***phosphoinositide-dependent protein kinase 1***), lo cual conduce a la activación de Akt (**Figura 15–64**). Una vez activada, Akt fosfo-

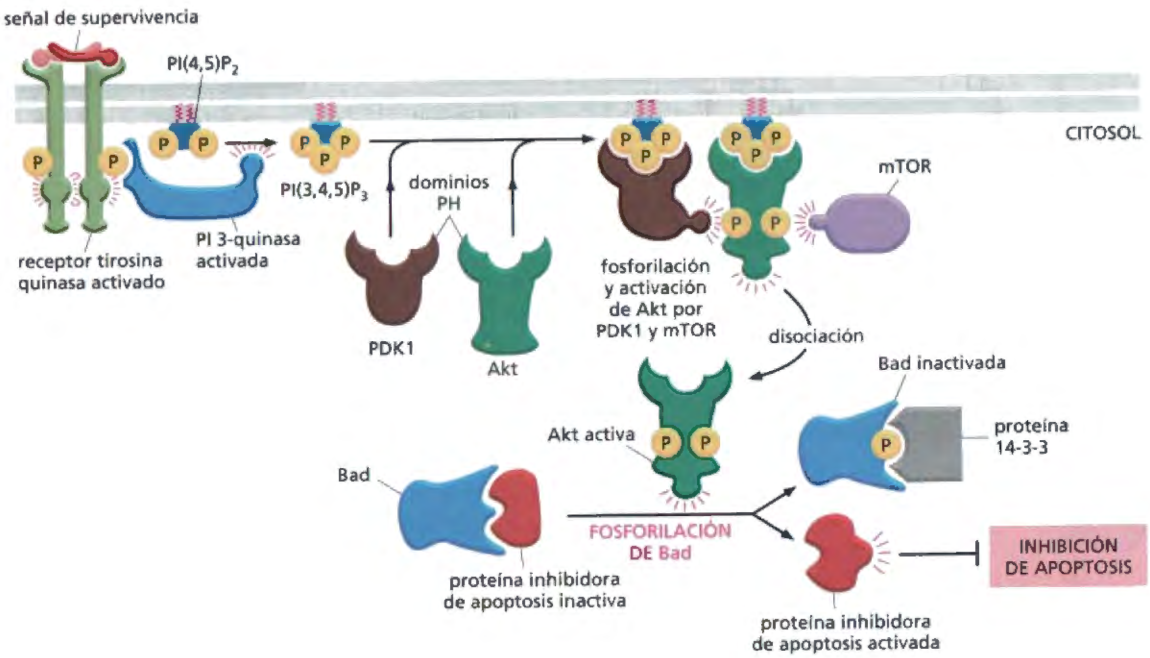


Figura 15–64 Una de las maneras a través de las cuales la señalización vía PI 3-quinasa estimula la supervivencia celular. Una señal extracelular de supervivencia activa un RTK, que recluta y activa la PI 3-quinasa. La PI 3-quinasa produce PI(3,4,5)P_3 que actúa como sitio de unión para dos serinas/treoninas quinasa con dominios PH: Akt y la quinasa dependiente de fosfoinositoles PDK1, que se colocan cerca una de otra en la membrana plasmática. Akt es fosforilada sobre una serina por una tercera quinasa (por lo general mTOR) que altera la conformación de Akt de forma que ahora puede ser fosforilada sobre una treonina por PDK1, lo cual activa a Akt. La Akt activada se disocia de la membrana plasmática y fosforila varias proteínas diana, entre ellas, la proteína Bad.

Cuando no está fosforilada, Bad mantiene en estado inactivo a una o más proteínas inhibidoras de apoptosis (de la familia Bcl2; se explica en el Capítulo 18). Cuando BAD es fosforilada, libera las proteínas inhibidoras, que bloquean la apoptosis, y estimula así la supervivencia celular. Como se muestra, una vez fosforilada, Bad se une a una proteína citosólica ubicua denominada *14-3-3*, que mantiene Bad no funcional.

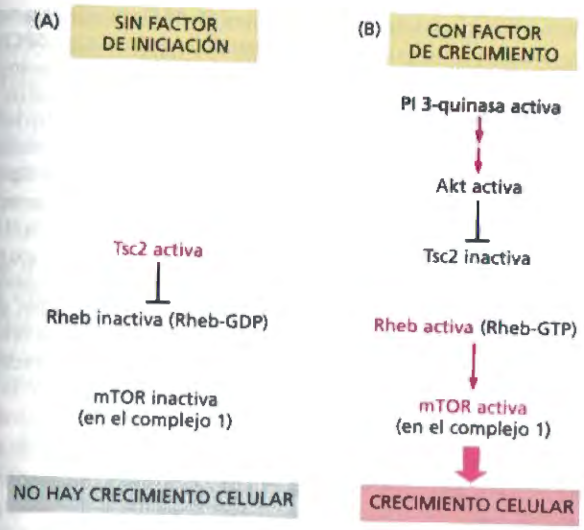


Figura 15–65 Activación de mTOR por la vía de señalización PI-3-quinasa–Akt. (A) En ausencia de factores de crecimiento extracelulares, Tsc2 (una Rheb-GAP) mantiene a Rheb inactiva; mTOR en el complejo I es inactiva y no se produce crecimiento celular. (B) En presencia de factores de crecimiento, Akt activada fosforila e inhibe Tsc2, facilitando así la activación de Rheb. Rheb activada (Rheb-GTP) colabora en la activación de mTOR en el complejo 1, que a su vez estimula el crecimiento. En la Figura 15–64 se muestra de qué forma los factores de crecimiento (o las señales de supervivencia) activan Akt.

La MAP-quinasa Erk (véase Figura 15–60) también puede fosforilar, e inhibir, a Tsc2 y, por tanto, activar mTOR. Así pues, las vías de señalización PI-3-quinasa–Akt y Ras-MAP-quinasa convergen en mTOR en el complejo 1 y estimulan el crecimiento celular.

Tsc2 es la abreviatura de "proteína de esclerosis tuberosa" 2 (*tuberous sclerosis protein 2*) y es un componente de un heterodímero compuesto por Tsc1 y Tsc2 (no se muestra); estas proteínas se denominan así porque mutaciones en los genes que las codifican causan la enfermedad de la *esclerosis tuberosa*, asociada con tumores benignos en el cerebro y en las zonas donde haya células demasiado grandes.

de varias proteínas diana en la membrana plasmática, el citosol y el núcleo. El efecto sobre la mayoría de las dianas conocidas consiste en su inactivación; pero las dianas son de tal naturaleza que todas estas acciones de Akt cooperan para aumentar la supervivencia y el crecimiento celulares.

Por ejemplo, un efecto de Akt es fosforilar una proteína citosólica llamada *Bad*, que en su estado no-fosforilado promueve la muerte celular por apoptosis (se describe en el Capítulo 18). La fosforilación de Bad por Akt genera sitios fosfoserina de unión a una proteína de armazón denominada *14-3-3*, que secuestra la proteína Bad fosforilada inhibiendo su acción y facilita así la supervivencia celular (véase Figura 15–64).

La **vía PI 3-quinasa–Akt** induce a la célula a crecer a través de un mecanismo más complejo que depende de una gran serina/treonina proteína quinasa denominada **TOR** (denominada como la diana de la *rapamicina*, una toxina bacteriana que inactiva esta quinasa y que se utiliza clínicamente como fármaco inmunosupresor y anticancerígeno). TOR fue identificada originalmente en levaduras, en un cribado genético para resistencia a rapamicina; en células de mamífero se denomina **mTOR**. En las células, TOR se halla en dos complejos multiproteicos con funciones distintas. En células de mamífero, el *complejo mTOR 1* contiene la proteína *raptor*; este complejo es sensible a la rapamicina y estimula el crecimiento celular –promocionando la producción de ribosomas y la síntesis de proteínas por un lado, e inhibiendo la degradación de proteínas por otro. El complejo 1 también estimula el crecimiento celular y la supervivencia celular estimulando la captación de nutrientes y el metabolismo. El *complejo mTOR 2* contiene la proteína *rictor* y es insensible a la rapamicina; colabora en la activación de Akt (véase Figura 15–64) y regula el citoesqueleto de actina a través de GTPasas de la familia Rho.

El complejo mTOR 1 integra señales de varias procedencias, incluyendo proteínas señalizadoras extracelulares denominadas *factores de crecimiento* y nutrientes como aminoácidos; ambas señales ayudan a activar mTOR y estimular el crecimiento. Los factores de crecimiento activan mTOR sobre todo a través de la vía PI 3-quinasa–Akt. Akt activa mTOR del complejo 1 indirectamente, fosforilando y, por tanto, inhibiendo, una GAP denominada Tsc2. Tsc2 actúa sobre una GTPasa relacionada con Ras monomérica, denominada **Rheb** (véase Tabla 15–5, p. 926). En su forma activa, la forma Rheb (Rheb-GTP) activa mTOR. EL resultado neto es que Akt activa mTOR y por tanto estimula el crecimiento celular (**Figura 15–65**). En el Capítulo 17 explicamos de qué forma mTOR estimula la producción de ribosomas y la síntesis de proteínas (véase la Figura 17–65).

Las vías de señalización corriente abajo activadas por RTK y por GPCR se solapan

Como ya hemos mencionado, los RTK y los GPCR activan algunas de las mismas vías de señalización intracelular. Por ejemplo, ambos pueden activar la vía de fosfolípidos de inositol desencadenada por la fosfolipasa C. Además, incluso cuando activan diferentes pasos, estos diferentes pasos pueden converger sobre las mismas proteínas diana. En la **Figura 15–66** se

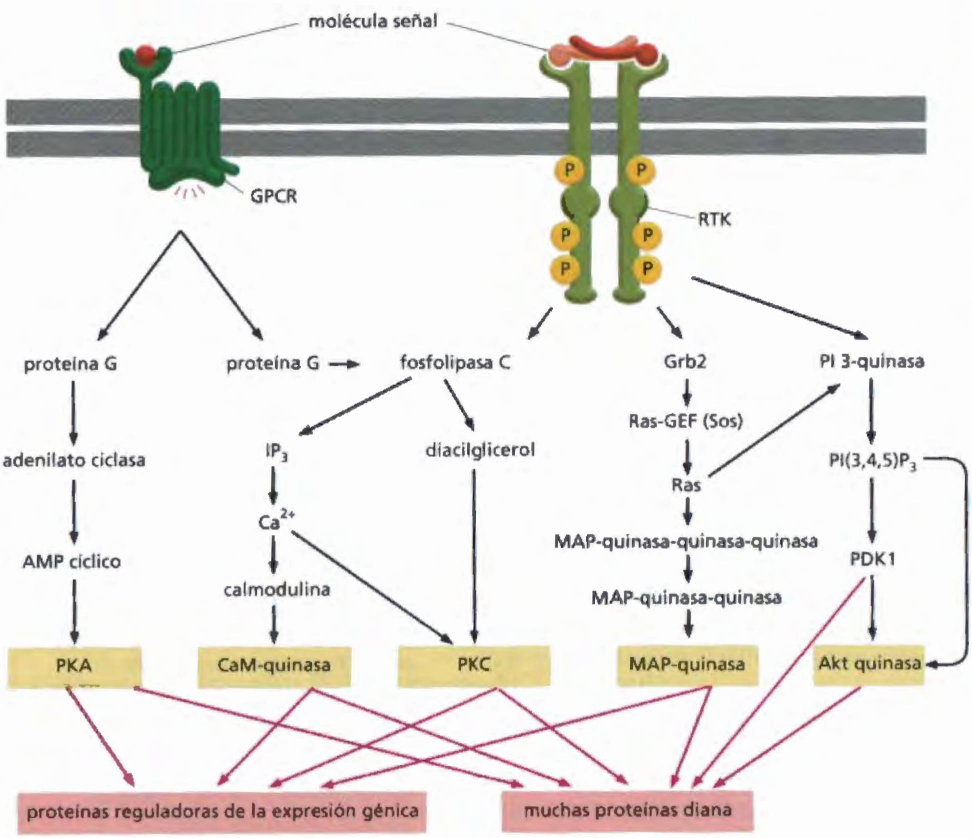


Figura 15–66 Cinco vías de señalización intracelular activadas por GPCR, RTK o ambos. En este ejemplo hipotético, las ci quinasas (en *amarillo*) al final de cada vía fosforilan proteínas diana (en *rojo*), algun de las cuales pueden ser fosforiladas por más de una quinasa. La fosfolipasa C que activada por los dos tipos de receptor es diferente: los GPCR activan la PLCβ mient que los RKT activan la PLCγ (no mostrado Aunque no se muestran, algunos GPCR también pueden activar a Ras, pero lo ha de forma independiente de Grb2, mediar una vía una Ras-GEF que es activada por Ca^{2+} y diacilglicerol.

ilustran estos dos tipos de señalizaciones que se solapan: resume cinco vías paralelas de señalización intracelular tratadas, una de ellas desencadenada por GPCR, dos desencadenadas por RTK y dos desencadenadas por ambos tipos de receptores.

La actividad de los receptores asociados a tirosinas quinasa depende de proteínas tirosina quinasa citoplasmáticas

Muchos de los receptores de la superficie celular dependen de la fosforilación de tirosinas para su actividad, aunque carecen de un dominio tirosina quinasa. Estos receptores actúan a través de **tirosinas quinasa citoplasmáticas**, que están asociadas al receptor y fosforilan diversas proteínas diana, incluyendo con frecuencia el propio receptor, cuando los receptores unen a sus ligandos. Así pues, estos **receptores asociados a tirosina quinasa** actúan de modo parecido a los RTK, excepto en que su dominio quinasa está codificado por un gen diferente y está asociado de forma no-covalente con la cadena polipeptídica del receptor. Pertenecen a esta categoría varias clases de receptores, incluyendo los receptores para los antígenos y las interleucinas de los linfocitos (se describe en el Capítulo 25), las integrinas (se describe en el Capítulo 19) y receptores para varias citoquinas y para algunas hormonas. Como ocurre con los RTK, muchos de estos receptores son dímeros preformados (**Figura 15–67**) o dimerizan cuando se une el ligando.

Algunos de estos receptores dependen de miembros de la mayor familia de proteínas tirosina quinasa citosólicas, la **familia Src** (véase las Figuras 3–10 y 3–69), que incluye: *Src, Yes, Fgr, Fyn, Lck, Lyn, Hck* y *Blk*. Todas estas proteínas quinasa tienen dominios SH2 y SH3 y se hallan localizados en la cara citoplasmática de la membrana plasmática, unidos a ella en parte a través de su interacción con proteínas receptoras transmembrana, y en parte por su unión covalente a cadenas lipídicas. Varios miembros de la familia se hallan asociados con diferentes receptores y fosforilan de forma solapada distintos conjuntos de proteínas diana. Por ejemplo, tanto Lyn, como Fyn y Lck se hallan asociados a diferentes juegos de receptores en los linfocitos (se trata en el Capítulo 25). En cada caso, la quinasa se activa cuando un ligando extracelular se une a una proteína receptora adecuada. El propio Src, al igual que otros miembros de la familia, también puede unirse a RTK activados; en estos casos, tanto el

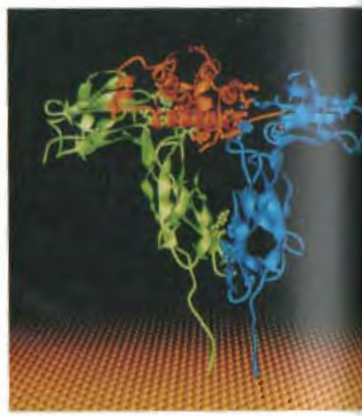


Figura 15–67 Estructura tridimensional la hormona de crecimiento humana un a su receptor. <CGCT> El receptor es un homodímero y la hormona (*rojo*) se une cada una de las dos subunidades idéntic (una mostrada en *verde* y la otra en *azul*) reconocen diferentes zonas de la hormo monomérica. Parece que la unión de la hormona provoca una reorganización d subunidades que activa una tirosina qui citoplasmática estrechamente unida a l colas citosólicas de los receptores (no se muestra). La estructura mostrada fue determinada por estudios de cristalogr de rayos X de complejos formados entr la hormona y dominios extracelulares d receptor producidos por tecnología del recombinante. (De A.M. deVos, M. Ultsc A.A. Kossiakoff, *Science* 255:306-312, 19 Con la autorización de la AAAS.)

receptor como la quinasa citoplasmática se estimulan mutuamente, cada uno la actividad catalítica del otro, reforzando y prolongando así la señal (véase Figura 15–62). Incluso existen algunas proteínas G (G_s y G_i) que pueden activar Src, que es una vía a través de la que la activación de GPCR puede fosforilar tirosinas de proteínas señalizadoras intracelulares y proteínas efectoras.

Otro tipo de tirosinas quinasa citoplasmáticas se asocian con las *integrinas*, los principales receptores que utilizan las células para unirse a la matriz extracelular (tratado en el Capítulo 19). La unión de componentes de la matriz a las integrinas activa vías de señalización intracelular que modifican el comportamiento de la célula. Cuando las integrinas se agrupan en los sitios de contacto con la matriz, participan en desencadenar el ensamblaje de uniones célula-matriz denominadas *adhesiones focales*. Entre las muchas proteínas reclutadas en estas uniones, se encuentra la tirosina quinasa citosólica llamada **quinasa de adhesión focal** (**FAK**: *focal adhesion kinase*), que se une a la cola citoplasmática de una de las subunidades de integrina con la ayuda de otras proteínas. El conjunto de moléculas de FAK se fosforila de manera cruzada unas a otras, generando lugares de unión a los que puede unirse la quinasa Src. Entonces, Src y FAK se fosforilan una a la otra y a otras proteínas que se ensamblan en la adhesión focal, incluyendo muchas de las proteínas señalizadoras utilizadas por los RTK. De este modo, las dos tirosinas quinasa señalizan a la célula que se ha adherido a un sustrato apropiado, donde la célula puede sobrevivir, crecer, dividirse, migrar, etc.

La clase de receptor más amplia y heterogénea, que se basa en tirosinas quinasa citosólicas para transmitir señales en el interior de las células, es la clase de *receptores de citoquinas*, que vamos a tratar a continuación.

Los receptores de citoquinas activan la vía de señalización JAK-STAT, proporcionando un camino rápido hacia el núcleo

La gran familia de **receptores de citoquinas** incluye receptores de la mayoría de tipos de mediadores locales (denominados de manera colectiva *citoquinas*), así como receptores de algunas hormonas como por ejemplo la *hormona de crecimiento* (Figura 15–67) y la *prolactina*. Estos receptores están asociados de forma estable a tirosinas quinasa citoplasmáticas denominadas **quinasas Janus** (**JAK**: *Janus kinase*, por el nombre del dios romano de dos caras), que fosforilan, y activan, proteínas reguladoras de la expresión génica llamadas **STAT** (*signal transducers and activators of transcription*; transductores de señal y activadores de transcripción). Las proteínas STAT están localizadas en el citosol y se denominan *proteínas latentes reguladoras de genes* porque sólo migran al núcleo y regulan la transcripción génica después de ser activadas.

Aunque muchas vías de señalización intracelular conducen desde los receptores de superficie celular hasta el núcleo, donde modifican la transcripción génica (véase la Figura 15–66), la **vía de señalización JAK-STAT** constituye la vías más directa de ellas. Los receptores de citoquinas son dímeros o trímeros y están asociados de forma estable con uno o dos de los JAK conocidos (JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2). La unión de la citoquina altera la distribución de forma que dos JAK quedan muy juntos de forma que se transfosforilan y aumentan así la actividad de sus dominios tirosina quinasa. Entonces, JAK fosforila tirosinas del receptor de citoquina generando fosfotirosinas que actúan como lugares de unión para las STAT (**Figura 15–68**). Algunas proteínas adaptadoras también pueden unirse a algunos de estos sitios y acoplar el receptor de tirosinas a la vía de señalización Ras-MAP quinasas de la que hemos tratado.

En mamíferos existen al menos seis STAT. Cada una de ellas tiene un dominio SH2 que realiza dos funciones. Primero, facilita la unión de la proteína STAT a un sitio de unión fosfotirosina en un receptor de citoquina activado. Una vez unida, la JAK fosforila las STAT en residuos tirosina y provoca que STAT se disocie del receptor. Segundo, el dominio SH2 de la proteína STAT liberada media ahora su unión a una fosfotirosina de otra proteína STAT, formando un homodímero STAT o un beterodímero. Entonces, el dímero de STAT se transloca hacia el núcleo donde, en combinación con otras proteínas reguladoras de la expresión génica, se une a elementos de respuesta de DNA específicos en varios genes, estimulando su transcripción (véase Figura 15–68). Por ejemplo, en respuesta a la hormona prolactina, que estimula la producción de leche en las células de la glándula mamaria, la STAT5 activada activa la transcripción de los genes que codifican las proteínas de la leche. En la **Tabla 15–6** se recogen algunas de las más de 30 citoquinas y hormonas que activan la vía JAK-STAT mediante la unión a receptores de citoquinas; también muestra los JAK y STAT específicos que participan.

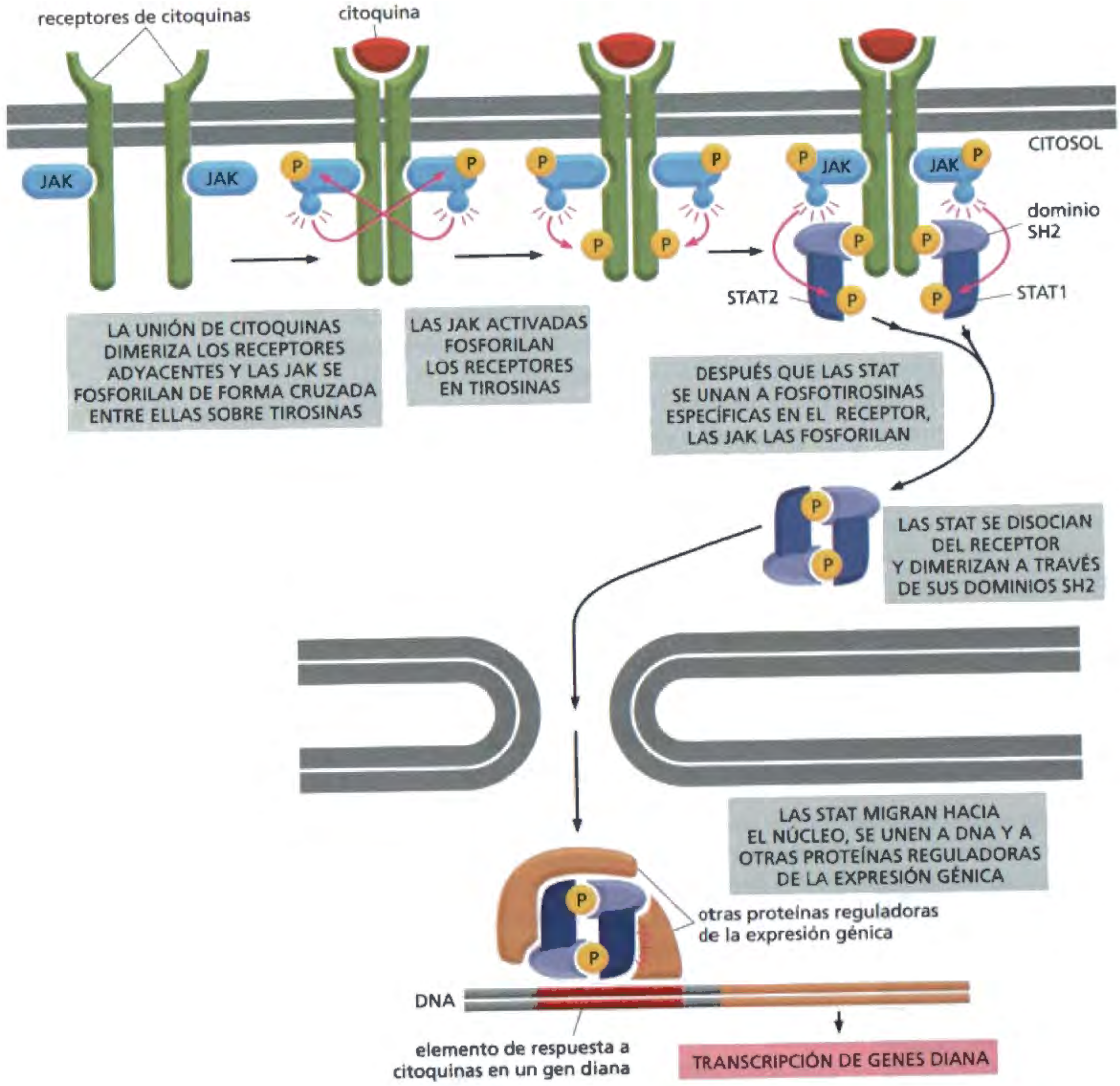


Figura 15–68 La vía de señalización JAK-STAT activada por citoquinas. La unión de citoquinas provoca que las dos cadenas polipeptídicas del receptor que están separadas (como se muestra) dimeriza o reorienta las cadenas de receptor en un dímero preformado. En ambos casos, las JAK asociadas se aproximan de modo que pueden fosforilarse entre ellas en residuos tirosina, empezando el proceso de señalización mostrado. En algunos casos, el receptor activo es un trímero en lugar de un dímero.

Algunos STAT también tienen dominios SH2 que les permiten unirse a fosfotirosinas específicas de algunos RTK activados. Estos receptores pueden activar de forma directa los STAT unidos con independencia de JAK. El nemátodo *C. elegans* utiliza STAT para señalizar pero no sintetiza ningún JAK ni ningún receptor de citoquina, lo cual sugiere que los STAT evolucionaron antes que los JAK y que los receptores de citoquina.

Las respuestas mediadas por la vía JAK-STAT están reguladas por circuitos de retroalimentación negativa. Además de activar genes que codifican proteínas mediante la respuesta inducida por citoquina, los dímeros de STAT también activan genes que codifican proteínas inhibidoras que ayudan a inhibir la respuesta. Algunas de estas proteínas se unen, e inactivan, a JAK fosforiladas y a sus receptores fosforilados asociados; otras se unen a dímeros STAT fosforilados impidiendo que se unan a sus DNA diana. Sin embargo, estos mecanismos de retroalimentación negativa no son suficientes por sí solos para inhibir la respuesta. La inactivación de JAK y de STAT activados requiere la desfosforilación de sus fosfotirosinas.

Las proteínas tirosina fosfatasa revierten las fosforilaciones en tirosinas

En todas las vías de señalización que utilizan fosforilación en tirosinas, esta fosforilación se revierte por una desfosforilación que llevan a cabo las **proteínas tirosina fosfatasa**. Estas fosfatasas son tan importantes en el proceso de señalización como lo son las proteínas tirosina quinasa, que añaden los fosfatos. Mientras que sólo algunos tipos de subunidades cata-

Tabla 15–6 Algunas proteínas extracelulares señalizadoras que actúan mediante receptores de citoquinas y la vía de señalización JAK-STAT

PROTEÍNA SEÑALIZADORA	JAK ASOCIADAS AL RECEPTOR	STAT ACTIVADAS	ALGUNAS RESPUESTAS
γ-interferón	JAK1 y JAK2	STAT1	activa los macrófagos
α-interferón	Tyk2 y JAK2	STAT1 y STAT2	incrementa la resistencia celular a infecciones víricas
Eritropoyetina	JAK2	STAT5	estimula la producción de eritrocitos
Prolactina	JAK1 y JAK2	STAT5	estimula la producción de leche
Hormona del crecimiento	JAK2	STAT1 y STAT5	estimula el crecimiento induciendo la producción de IGF1
GMCSF	JAK2	STAT5	estimula la producción de granulocitos y de macrófagos

Las *fosfatasas de proteína serina/treonina fosfatasas* son responsables de eliminar los grupos fosfato de las serinas y las treoninas fosforiladas de las proteínas; en el genoma humano existen más de 100 proteínas tirosina fosfatasa codificadas, incluyendo alguna *fosfatasa de especificidad dual* que también desfosforilan en serinas y treoninas.

Como sucede con las tirosinas quinasa, hay formas citosólicas y formas transmembrana de tirosinas fosfatasa, pero ninguna de ellas está relacionada estructuralmente con las proteínas serina/treonina fosfatasa. Parece que algunas de las formas transmembrana actúan como receptores de superficie celular pero, dado que todavía no se ha establecido, de forma general se denominan tirosinas fosfatasa semejantes a receptores

A diferencia de las proteína serinas/treoninas fosfatasa, que en general tienen una especificidad muy laxa, la mayoría de proteína tirosinas fosfatasa presentan una especificidad exquisita por sus sustratos, eliminando grupos fosfato sólo de determinados subgrupos de proteínas. En conjunto, estas fosfatasas aseguran que las fosforilaciones en tirosinas tienen una vida media corta y que el nivel de fosforilaciones en tirosina en las células en reposo es muy bajo. Sin embargo, las proteínas tirosinas fosfatasa no actúan simplemente revertiendo de forma continua el efecto de las proteínas tirosina quinasa; a menudo están reguladas para actuar en el momento apropiado en una respuesta de señalización o en el ciclo de división celular (se describe en el Capítulo 17).

Tras la explicación del papel crucial de la fosforilación y desfosforilación en tirosinas en las vías de señalización intracelular activadas por muchos receptores acoplados a enzimas, ahora volvemos a una clase de receptores acoplados a enzimas que sólo transmiten la información a través de fosforilaciones en serinas o treoninas. Estos *receptores serina/treonina quinasa* activan una vía de señalización al núcleo todavía más directa que la vía JAK-STAT. Fosforilan directamente proteínas latentes reguladoras de genes denominadas *Smads*, que luego son translocadas al interior del núcleo y activan la transcripción génica.

Las proteínas señalizadoras de la superfamilia TGFβ actúan mediante receptores serina/treonina quinasa y Smads

Los **factores β transformantes del crecimiento** (TGFβ: *transforming growth factors-β*) constituyen una gran familia (en humanos, entre 30 y 40) de proteínas diméricas de secreción con gran similitud estructural. Actúan como hormonas, o más comúnmente, como mediadores locales que regulan un amplio rango de funciones biológicas en todos los animales. Durante el desarrollo, regulan la formación del patrón e influyen sobre varios comportamientos celulares, incluyendo la proliferación, la especificación y la diferenciación, la producción de matriz extracelular y la muerte celular. En adultos, están implicados en la reparación tisular y en la regulación de la respuesta inmune, así como en muchos otros procesos. La superfamilia está formada por la familia de *TGF-β/activinas* y la gran familia de *proteínas de morfogénesis del hueso* (*BMP*: *bone morphogenetic proteins*).

Todas estas proteínas actúan a través de receptores acoplados a enzimas que atraviesan una sola vez la membrana y con dominios serina/treonina quinasa sobre la cara citosólica de la membrana plasmática. Existen dos clases de estos **receptores serina/treonina quinasa** –*tipo I* y *tipo II*– que son estructuralmente homodímeros similares. Cada miembro de la superfamilia TGFβ se une a una combinación característica de receptores diméricos de tipo-I y de tipo-II, juntando los dominios quinasa de forma que el receptor de tipo II

puede fosforilar y activar el receptor de tipo I, formando de esta manera un complejo receptor tetramérico.

Una vez activado, el complejo receptor utiliza una estrategia para transmitir la señal rápidamente al núcleo que es similar a la vía JAK-STAT utilizada por los receptores de citoquinas. El receptor de tipo-I se une de forma directamente y fosforila una proteína reguladora de la expresión génica en estado latente de la **familia Smad** (denominada así por los dos primeros componentes identificados: Sma en *C. elegans* y Mad en *Drosophila*). Los receptores de TGFβ/activina activados fosforilan Smad2 o Smad3, mientras que los receptores de BMP fosforilan Smad1, Smad5 o Smad8. Cuando una de estas *Smad activadas por receptor* (*R-Smad*) ha sido fosforilada, se disocia del receptor y se une a Smad4 (llamada *co-Smad*), la cual puede formar un complejo con cualquiera de las cinco R-Smad. Entonces, el complejo Smad se transloca al núcleo, donde se asocia con otras proteínas reguladoras de la expresión génica y regula la transcripción de genes diana específicos (**Figura 15–69**). Dado que las proteínas del núcleo que acompañan la respuesta varían según el tipo celular y el estado de la célula, los genes que resultan afectados son muy variados.

Los receptores TGFβ activados y el ligando que se halla unido a ellos son endocitados a través de dos rutas diferentes, una que conduce a la posterior activación y la otra a la inactivación. La ruta de activación depende de vesículas recubiertas de clatrina y conduce a los endosomas tempranos (se describe en el Capítulo 13), donde se produce la activación de la mayoría de los Smad. Unas proteínas de anclaje denominadas *SARA* (*Smad anchor for receptor activation*; anclajes de Smad para la activación del receptor) tienen un importante papel en este proceso; se hallan concentradas en los endosomas tempranos y se une a receptores TGFβ activados y a Smad activados aumentando la eficiencia de la fosforilación de Smad mediada por receptor. La ruta de inactivación depende de las *caveolas* (se describen en el Capítulo 13) y conducen a la ubiquitinización del receptor y a su degradación en proteosomas.

Algunos miembros de la familia TGF-β actúan como morfógenos en gradiente durante el desarrollo e inducen diferentes respuestas en una célula en desarrollo en función de la concentración del morfógeno (véase Figura 15–10, y tratado en el Capítulo 22). A menudo sus concentraciones extracelulares efectivas están reguladas por proteínas inhibidoras

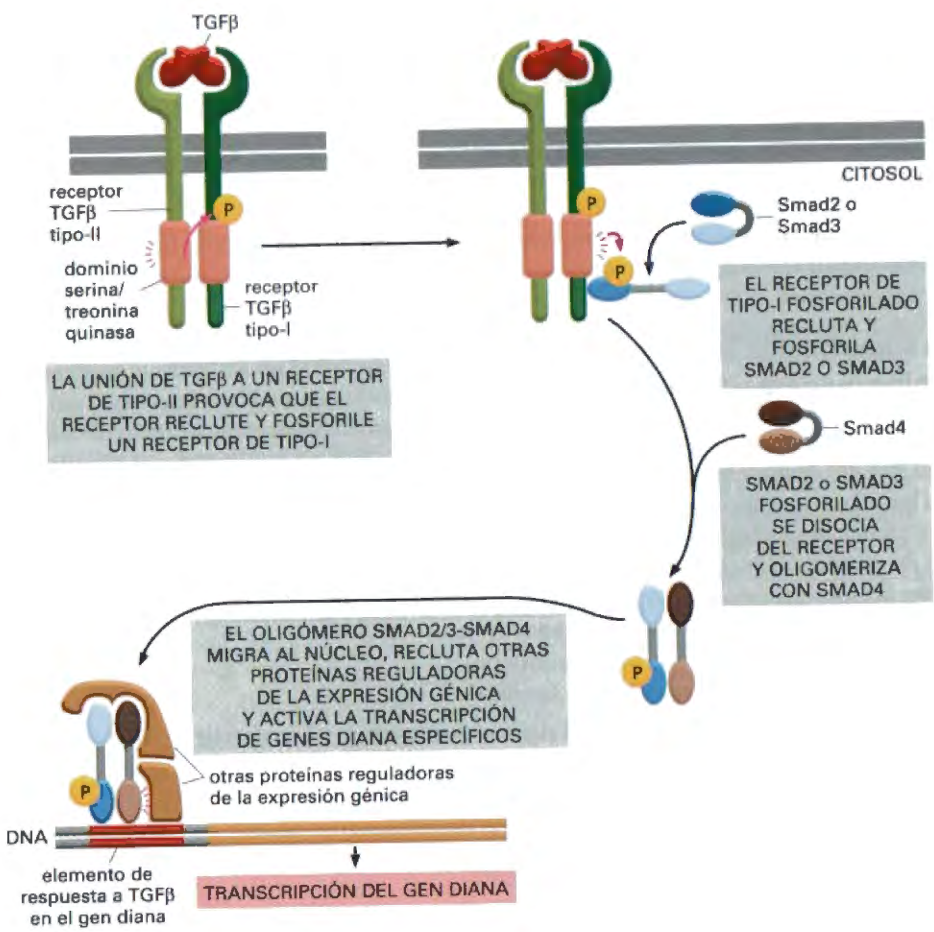


Figura 15–69 Vía de señalización dependiente de Smad activada por TGF-β. TGF-β es un dímero y las Smad al ser fosforiladas se abren y exponen una superficie de dimerización. Para simplificar, se han omitido diversas características de la vía, incluyendo las siguientes: (1) Las proteínas receptoras de tipo-I y de tipo-II se cree que son dímeros. (2) Normalmente los receptores tipo-I están acoplados a una proteína inhibidora, que se disocia cuando el receptor tipo-I es fosforilado por el receptor tipo-II. (3) Parece que cada Smad es un trímero. (4) Una proteína de anclaje denominada SAR, participa en el reclutamiento de Smad2 y Smad3 por el receptor tipo-I activado, principalmente en endosomas, como se explica en el texto.

secretadas que se unen directamente a las moléculas señal impidiendo que activen sus receptores sobre las células diana. Por ejemplo, *noggin* y *chordin* inhiben los BMP y la *follistatina* inhibe las activinas. Algunos de estos inhibidores, así como la mayoría de los miembros de la familia de TGFβ son secretados como precursores inactivos y son activados por rotura proteolítica extracelular.

Durante la respuesta de señalización, los Smad viajan continuamente entre el citoplasma y el núcleo: son desfosforilados en el núcleo y se exportan al citoplasma donde pueden ser refosforilados por receptores activados. De esta forma, el efecto ejercido sobre los genes diana refleja tanto la concentración de la señal extracelular como el tiempo durante el que esta señal continúa actuando sobre los receptores de superficie celular (a menudo, varias horas). Las células expuestas a un morfógeno, a una elevada concentración o durante mucho tiempo, activarán un conjunto de genes mientras que las células que reciben una menor concentración o durante exposiciones más transitorias, activarán otro conjunto de genes.

Tal como pasa con la vía JAK-STAT, la vía Smad también se regula por lo general mediante retroalimentación negativa. Entre los genes diana activados por los complejos Smad se encuentran aquellos que codifican las *Smad inhibidoras*, que incluyen Smad6 y Smad7. Smad7 (y posiblemente también Smad6) se unen al receptor activado inhibiendo su capacidad de señalización al menos de tres maneras: (1) compiten con los R-Smad por los sitios de unión sobre el receptor, disminuyendo la fosforilación de R-Smad; (2) reclutan una ubiquitina ligasa llamada *Smurf* que ubiquitiniza el receptor, produciendo la internalización del receptor y su degradación (este fenómeno es debido a que Smurf también ubiquitiniza y estimula la degradación de los Smad, que se denominan *factores reguladores de la ubiquitinización de los Smad* o Smurf: ***Smad ubiquitylation regulatory factors***); y (3) reclutan una proteína fosfatasa que desfosforila, e inactiva, al receptor. Además, los Smad inhibidores se unen a la co-Smad, Smad4, inhibiéndola e impidiendo que se una a los R-Smad y facilitando su ubiquitinización y degradación.

A pesar de que los receptores serina/treonina quinasa actúan sobre todo a través de la vía Smad que acabamos de describir, también pueden afectar otras vías de señalización intracelular. A la inversa, algunas proteínas señalizadoras de otras vías pueden fosforilar las Smad, afectando así la señalización a lo largo de la vía de los Smad.

Las proteínas serina/treonina quinasa y las proteínas tirosina quinasa están relacionadas estructuralmente

Todas las vías de señalización activadas por receptores GPCR y receptores acoplados a enzimas tratados dependen de proteínas quinasa específicas de serina o treonina, de proteínas tirosina quinasa o de ambas. Estas quinasas están relacionadas estructuralmente como se resume en la **Figura 15–70**.

La extraordinaria complejidad de múltiples vías reguladoras que se regulan de forma entrecruzada y los circuitos de retroalimentación no es un embrollo casual sino un sistema muy evolucionado para el procesamiento y la interpretación de una gran cantidad de señales que reciben las células animales. En su conjunto, la red de control molecular que va desde los receptores de la superficie celular hasta los genes en el núcleo se puede comparar a uno de los componentes de un ordenador; y, como otro de los componentes, el cerebro, presenta uno de los problemas más difíciles de la biología. Podemos identificar los componentes y descubrir cómo trabajan individualmente y entender de qué forma trabajan pequeños subconjuntos de componentes como módulos reguladores. Pero entender cómo funciona el sistema en conjunto, como un todo, resulta una tarea mucho más difícil. Y ello no sólo debido a la complejidad del sistema sino también porque la manera en la que trabaja depende de una gran cantidad de detalles de las interacciones moleculares y, para el caso de la mayoría de las células animales, sólo disponemos de pequeñas cantidades de información sobre el sistema.

En las células bacterianas, las vías de señalización son más sencillas y resulta más fácil obtener información cuantitativa de forma precisa. Por tanto, resulta posible obtener una relación detallada sobre cómo funciona un sistema de señalización completo, al menos para el comportamiento de una determinada bacteria y las señales que lo controlan. A continuación se analizará un ejemplo en el que la bacteria responde a señales del entorno transmitidas a través de receptores acoplados a enzimas que, de nuevo, son quinasas, pero de un tipo no relacionado con las descritas hasta ahora.

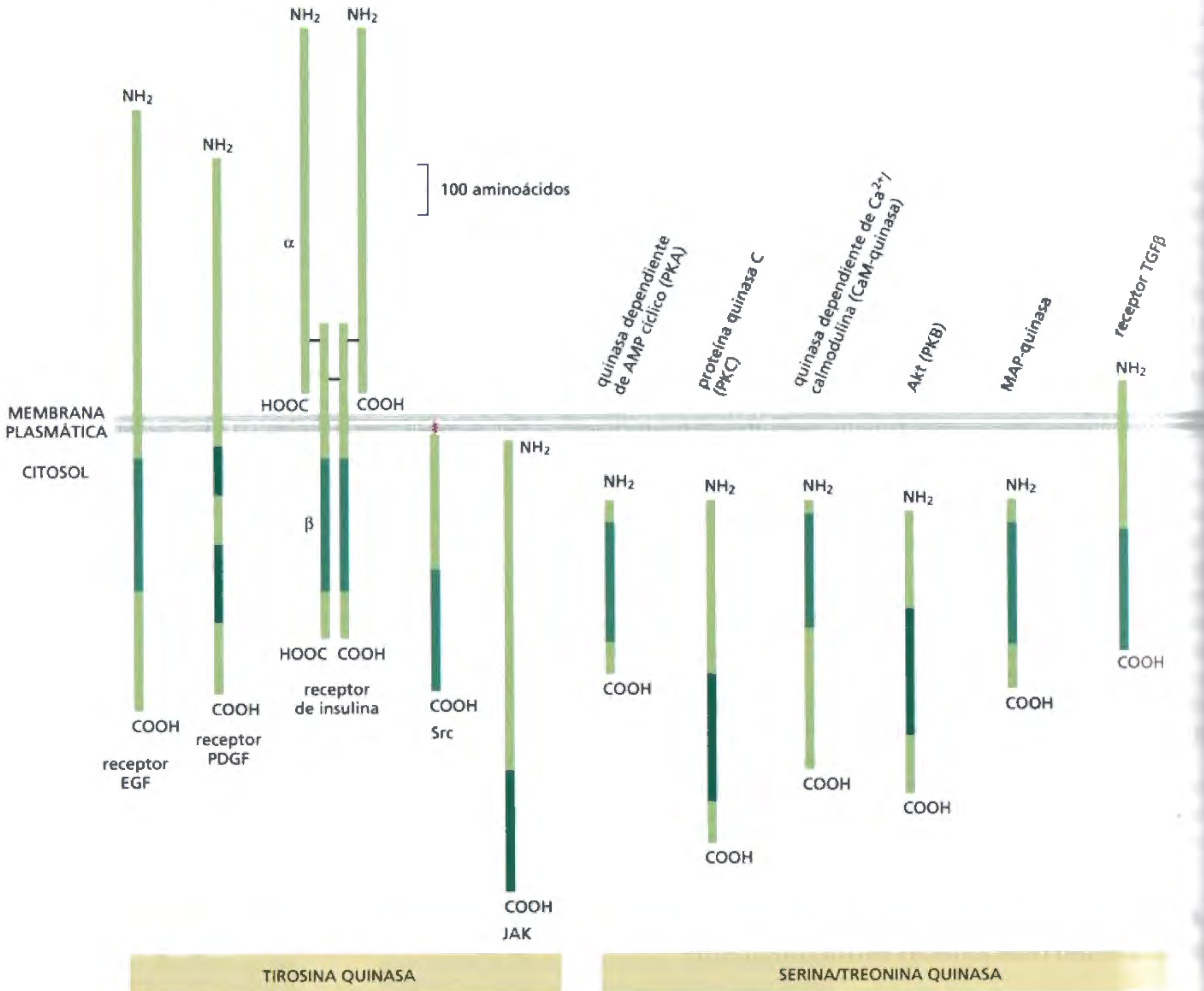
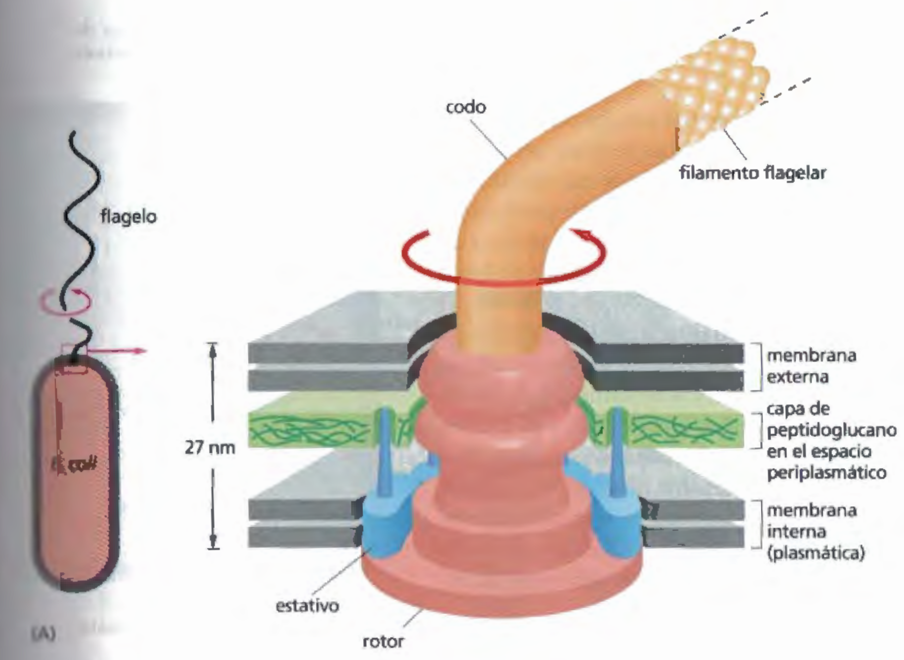


Figura 15–70 Algunas de las proteínas quinasa descritas en este capítulo. Se muestra el tamaño y la localización de sus dominios catalíticos (en *verde oscuro*). En cada caso, el dominio catalítico está formado por unos 250 residuos de aminoácidos. Todos estos dominios tienen una secuencia similar, lo que sugiere que todos ellos han evolucionado a partir de una quinasa primordial común (véase también la Figura 3–66). Obsérvese que todas las tirosinas quinasa mostradas se hallan unidas a la membrana plasmática (las JAK están unidas por su asociación con los receptores de citoquinas; véase la Figura 15–68), mientras que la mayoría de las serinas/treoninas quinasa se hallan en el citosol.

La quimiotaxis bacteriana depende de una vía de señalización de dos componentes activada por receptores asociados a histidina quinasa

Como hemos indicado, muchos de los mecanismos que participan en la señalización química entre células en los animales pluricelulares han evolucionado a partir de mecanismos utilizados por organismos unicelulares para responder a cambios químicos de su entorno. De hecho, ambos tipos de organismos utilizan algunos mediadores intracelulares comunes, como los nucleótidos cíclicos y el Ca^{2+}. Entre las reacciones mejor estudiadas de los organismos unicelulares frente a señales extracelulares, se encuentran las *respuestas quimiotácticas*, en las cuales el desplazamiento celular se dirige hacia o escapa de una fuente de algún compuesto químico del medio. Concluimos esta sección sobre los receptores acoplados a enzimas con una breve descripción de la **quimiotaxis bacteriana**, que depende de una vía de señalización de dos componentes, que proporciona un ejemplo particularmente bien estudiado sobre el papel crucial de la adaptación en respuesta a señales químicas. La respuesta quimiotáctica está mediada por **receptores asociados a histidinas quinasa** que activan una *vía de señalización de dos componentes* que también es utilizada por levaduras y por las plantas, aunque aparentemente no por los animales.

Las bacterias móviles como *E. coli* tienen que nadar hacia los lugares donde haya elevadas concentraciones de nutrientes (*atrayentes*), como azúcares, aminoácidos y pequeños péptidos, y alejarse de lugares donde haya elevadas concentraciones de productos químicos nocivos (*repelentes*). Las bacterias nadan gracias a los flagelos, entre cuatro y seis, cada uno



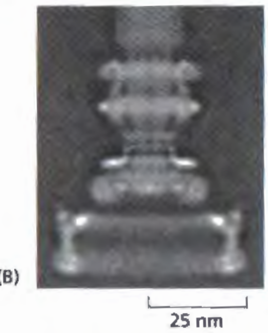


Figura 15–71 Motor del flagelo bacteriano. (A) Dibujo esquemático de la estructura. El flagelo está unido a un codo flexible. El codo está unido a varios anillos de proteínas (mostrados en *naranja*) que se hallan integrados en las membranas exterior e interna (plasmática). Los anillos forman un rotor, que gira con el flagelo cerca de 100 revoluciones por segundo. La rotación está dirigida por un flujo de protones a través de un anillo exterior de proteínas, el estativo (*azul*), que está embebido en el interior de la membrana y anclado a la capa de peptidoglucano. El estativo también contiene las proteínas responsables de cambiar el sentido de giro. (B) Motor del flagelo reconstruido a partir de muchas imágenes de microscopio electrónico. (A, basado en datos de T. Kubori et al., *J. Mol. Biol.* 226:433-446,1992, con la autorización de Academic Press, y N.R. Francis et al., *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 89:6304-6308, 1992, con la autorización de National Academy of Sciences; B, de D. Thomas, D.G. Morgan y D.J. DeRosier, *J. Bacteriol.* 183:6404-6412, 2001. Con la autorización de American Society for Microbiology.)

de los cuales está unido por su base, gracias a un corto codo flexible, a un pequeño disco proteico localizado en la membrana de la bacteria. Este disco forma parte de un diminuto motor que utiliza la energía almacenada en el gradiente transmembrana de H^+ para girar rápidamente y mover el flagelo helicoidal (**Figura 15–71**). Dado que los flagelos de la superficie bacteriana tienen una "orientación" intrínseca, diferentes direcciones de rotación tienen efectos distintos sobre el movimiento. Los flagelos están casi siempre rotando en sentido contrario al de las agujas del reloj lo que hace que los flagelos se unan formando un haz, con lo que la bacteria nada de forma uniforme en una dirección. En ausencia de estímulos ambientales, segundo a segundo uno o más de uno de los motores cambia de forma transitoria la dirección de giro, de forma que el flagelo que está unido rompe el haz con lo que la bacteria se mueve de forma caótica sin desplazarse hacia delante (**Figura 15–72**). Esta secuencia produce un patrón característico de movimiento en el que la natación suave en línea recta se alterna con cambios bruscos de dirección al azar.

Este patrón normal de natación de la bacteria se modifica por atrayentes o por repelentes quimiotácticos, los cuales se unen a proteínas receptoras específicas afectando la frecuencia de cambios de dirección, incrementando o disminuyendo la duración de los intervalos de tiempo entre los cambios sucesivos de dirección de giro de los flagelos. Cuando las bacterias están nadando en una dirección favorable (hacia concentraciones elevadas de un atrayente o huyendo de concentraciones elevadas de un repelente), cambian de dirección menos frecuentemente que cuando están nadando en una dirección desfavorable (o cuando no existe ningún gradiente). Dado que los periodos de natación suave son más largos cuando la bacteria se desplaza en una dirección favorable, gradualmente progresará en esta dirección, ya sea hacia un atrayente o apartándose de un repelente.

Estas respuestas están mediadas por **receptores quimiotácticos** asociados a histidinas quinasa, que típicamente son proteínas transmembrana diméricas que unen atrayentes y repelentes específicos en el exterior de la membrana plasmática. Los dominios citosólicos de estos receptores están asociados de manera estable a una histidina quinasa *CheA* (***Chemotaxis***; quimiotaxis) a través de una proteína adaptadora *CheW* (**Figura 15–73**). La unión de un repelente a un receptor quimiotáctico incrementa la actividad del receptor, mientras que la unión de un atrayente la inactiva. Un mismo receptor puede unir ambos tipos de moléculas, con consecuencias opuestas. La unión de un repelente al receptor activa *CheA*, la cual se autofosforila en un residuo histidina y casi inmediatamente transfiere el grupo fosforilo a un residuo de aspartato en la proteína reguladora de la respuesta *CheY*. La proteína *CheY* fosforilada se disocia del receptor, difunde a través del citosol, se une al motor flagelar y genera una rotación del motor en el sentido de las agujas del reloj, de modo que la bacteria se desplaza de forma caótica. *CheY* tiene actividad fosfatasa intrínseca, con lo que se desfosforila a sí misma, en un proceso que la proteína *CheZ* acelera en gran medida (Figura 15–73).

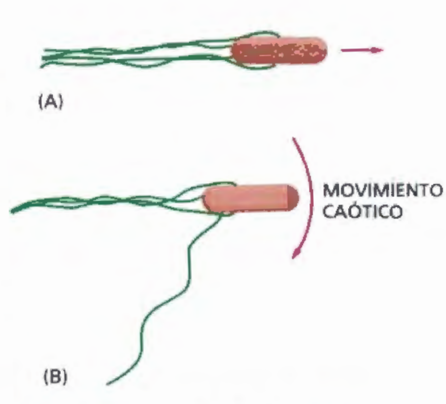


Figura 15–72 Posiciones de los flagelos de *E. coli* durante la natación. (A) Cuando los flagelos giran en sentido opuesto al de las agujas del reloj (mirando hacia adentro de la célula desde el flagelo) quedan unidos en un solo haz que actúa como una hélice, dando lugar a una natación suave. (B) Cuando uno o más motores invierten el sentido de su movimiento, los flagelos a los que están unidos se separan del haz provocando un movimiento caótico de la bacteria.

La metilación del receptor es la responsable de la adaptación en la quimiotaxis bacteriana

El cambio en la frecuencia de desplazamientos caóticos en respuesta a un incremento en la concentración de un atrayente o de un repelente ocurre en menos de un segundo pero es sólo transitoria. Aunque se mantenga un alto nivel de ligando, en cuestión de minutos la bacteria se *adapta* (desensibiliza) al estímulo aumentado. La adaptación es una parte crucial de la respuesta, ya que le permite a la bacteria comparar su ambiente actual con el ambiente de su pasado reciente y, por tanto, responder a *cambios* de concentración de ligando en lugar de responder a sus niveles estacionarios.

La adaptación está mediada por la metilación covalente (catalizada por una *metil transferasa*) o por la desmetilación (catalizada por una *metilasa*) de los receptores quimiotácticos, que cambian su respuesta a la unión de ligando como consecuencia de su modificación covalente. Cuando un atrayente se une por ejemplo a un receptor quimiotáctico ejerce dos efectos: (1) disminuye la capacidad del receptor de activar CheA resultando una disminución de la velocidad de movimientos caóticos. (2) Altera lentamente (durante minutos) el receptor, de forma que ahora puede ser metilado por la metil transferasa, lo cual le hace recuperar su capacidad de activar CheA. Así, el receptor no metilado sin ningún ligando unido tiene la misma actividad que el receptor metilado con un ligando unido por lo que la frecuencia de movimientos caóticos es la misma en ambos casos.

Cada dímero de receptor tiene ocho lugares de metilación; el número de lugares metilados aumenta cuando se incrementa la concentración del atrayente (ya que cuanto mayor es la concentración, más tiempo se mantiene el receptor unido a su ligando). Cuando se elimina el atrayente, la metilasa desmetila el receptor. A pesar de que la metilación del receptor cambia durante una respuesta quimiotáctica, permanece constante mientras la bacteria se adapta, ya que se consigue un equilibrio exacto entre las velocidades de metilación y de desmetilación. Un modelo sencillo sobre cómo pueden actuar la unión del ligando y la metilación sobre la quimiotaxis bacteriana propone que tanto la metilación del receptor como la unión al repelente empaquetan las subunidades que forman el receptor y las proteínas de señalización asociadas, incrementando así la señalización y los movimientos caóticos; por el contrario, la desmetilación del receptor y la unión al atrayente relajan la estructura del complejo disminuyendo así la señalización y los movimientos caóticos. Parece que la sensibilidad de esta respuesta se incrementa por efectos cooperativos que se producen por la reunión de las colas citoplasmáticas de receptores adyacentes en la membrana (**Figura 15–74**).

Todos los genes y todas las proteínas que participan en la quimiotaxis bacteriana se han identificado y se han medido sus interacciones. Por ello, parece que será el primer sistema de señalización celular que será comprendido por completo en términos moleculares. Sin embargo, aunque es un proceso de señalización bastante sencillo, se necesitarán simulaciones informáticas para comprender de qué forma actúa el proceso de señalización como una red integrada. Las vías de señalización proporcionarán un área de investigación especialmente rica para nuevas generaciones de biólogos informáticos, ya que las propiedades de estas vías no podrán entenderse sin potentes herramientas informáticas.

Como hemos mencionado, existen algunos receptores de superficie celular que no encajan en ninguna de las tres clases principales tratadas: acoplados a canales iónicos, a proteínas G y a enzimas. En la siguiente sección, se consideran los receptores de superficie celular que activan vías de señalización dependientes de proteolisis para regular la actividad de proteínas latentes de regulación génica. Estas vías desempeñan un papel importante en los procesos que determinan el desarrollo animal y en la renovación y la reparación de los tejidos.

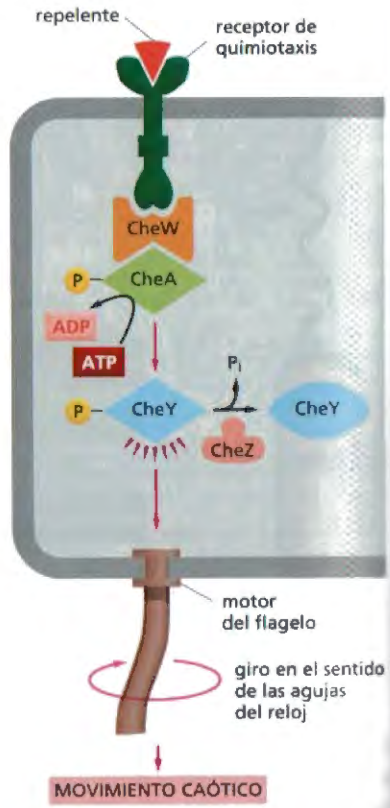


Figura 15–73 Vía de señalización de dos componentes que permite a los receptores quimiotácticos controlar el motor del flagelo durante la quimiotaxis bacteriana. La histidina quinasa CheA está unida de forma estable al receptor mediante la proteína adaptadora CheW. Todos los receptores y sus proteínas asociadas están agrupados en un extremo de la célula (véase la Figura 15–74) La unión de un repelente incrementa la actividad del receptor, que estimula así a CheA a que se autofosforile sobre una histidina. Rápidamente CheA transfiere el grupo fosfato que tiene unido de forma covalente a través de un enlace de alta energía, directamente al regulador de respuesta CheY generando CheY-fosfato, que se une al motor del flagelo haciéndolo girar en el sentido de las agujas del reloj, lo cual hace que la bacteria entre en un movimiento caótico, con constantes cambios de sentido. La unión de un atrayente tiene los efectos contrarios: disminuye la actividad del receptor con lo que produce una disminución del grado de fosforilación de CheA y de CheY, lo cual hace que el motor flagelar gire en sentido opuesto al de las agujas del reloj y, por lo tanto, que la bacteria nade con un movimiento suave y continuo. CheZ acelera la desfosforilación de CheY-fosfato y lo inactiva. Cada uno de estos intermediarios fosforilados se desfosforila con una vida media de segundos, lo que le permite a la bacteria responder de una forma muy rápida a cambios de su entorno (véase Figura 15–11).

Resumen

Existen varias clases de receptores acoplados a enzimas, incluyendo los receptores tirosina quinasa (RTK), los receptores asociados a tirosina quinasa, los receptores serina/treonina quinasa y los receptores asociados a histidina quinasa. Los dos primeros tipos de receptores son, con diferencia, los más numerosos en mamíferos.

La unión del ligando a RTK induce a los receptores a la fosforilación cruzada en varios residuos tirosina de sus dominios citoplasmáticos. Esta transautofosforilación activa las quinasas y produce un conjunto de fosfotirosinas que actúan como lugar de unión para un conjunto de proteínas de señalización intracelulares, las cuales se unen mediante dominios SH2 (o PTB). Una de estas proteínas

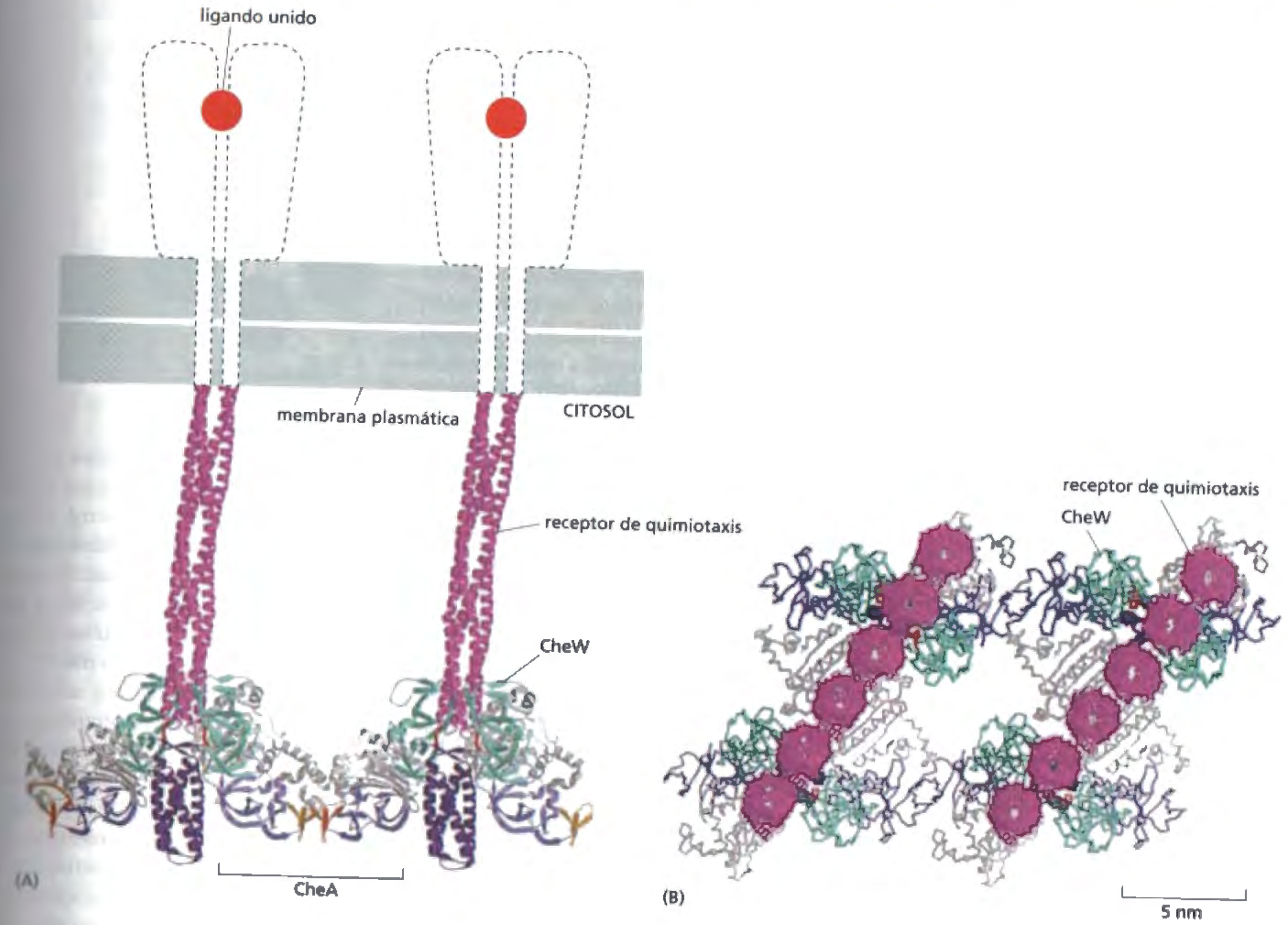


Figura 15–74 Modelo estructural de la asociación de receptores de quimiotaxis en la membrana plasmática de la bacteria. Se muestran dos receptores asociados entre sí. Cada uno de ellos es un homodímero y la larga cola citoplasmática de hélice α de cada una de las dos subunidades se pliega de nuevo sobre sí misma. Así, cada subunidad contribuye con dos hélices al haz de cuatro hélices. Las distancias entre los dominios proteicos, determinadas por una célula conocida mediante resonancia de espín electrónico pulsátil, se han integrado con la estructura tridimensional conocida de las proteínas generando el modelo que se muestra. La agrupación de los complejos receptor-CheA-CheW en series de este tipo permite interacciones de cooperatividad entre complejos adyacentes, incrementando en gran medida la sensibilidad del proceso de señalización. (A) Vista de la estructura situada justo por debajo de la membrana plasmática de la bacteria. El dominio extracelular del receptor se representa de forma esquemática. (B) Vista de esta misma estructura mirando desde la membrana plasmática hacia el interior (Adaptado de S.Y. Park et al., *Nat. Struct. Biol.* 13:400-407, 2006. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

de señalización actúa de adaptador acoplando algunos receptores activados a Ras-EGF (Sos), que activa la GTPasa Ras monomérica. A su vez, Ras activa al módulo de señalización de la MAP-quinasa de tres componentes, que transmite la señal al núcleo al fosforilar allí varias proteínas reguladoras de la expresión génica. Otra importante proteína de señalización que puede unirse a RTK activados es la PI 3-quinasa, que fosforila específicamente fosfoinositoles y produce lugares lipídicos de unión en la membrana plasmática para proteínas señalizadoras con dominios PH, incluyendo la serina/treonina proteína quinasa Akt (PKB) que tiene un papel clave en el control de la supervivencia y el crecimiento celulares. Muchas clases de receptores, incluyendo algunos RTK, activan GTPasas monoméricas de la familia Rho, que acoplan funcionalmente los receptores al citoesqueleto.

Los receptores asociados a tirosinas quinasa dependen para su acción de varias tirosinas quinasa citoplasmáticas. Estas quinasas incluyen miembros de la familia Src, que se asocian a muchos tipos de receptores, y la quinasa de adhesión focal (FAK), que se asocia a las integrinas en las adhesiones focales. Las tirosinas quinasa citoplasmáticas fosforilan una gran variedad de proteínas de señalización que transmiten la señal corriente abajo. La familia de receptores más amplia de esta clase es la familia de receptores de citoquinas. Cuando se estimulan por la unión del ligando, estos receptores activan tirosinas quinasa citoplasmáticas JAK, que fosforilan las STAT. Entonces las STAT dimerizan, se translocan al núcleo y activan la transcripción de determinados genes. Los receptores serina/treonina quinasa, que se activan por proteínas señalizadoras de la superfamilia de TGFβ, actúan de forma similar: directamente fosforilan y activan algunas Smad, que entonces oligomerizan con otra Smad, se translocan al núcleo y activan la transcripción génica.

La quimiotaxis bacteriana está regulada por una vía de señalización que se conoce excepcionalmente bien. Está gobernada por receptores de quimiotaxis asociados a histidinas quinasa, que activan una vía de señalización de dos componentes. Cuando se activan por un repelente, los receptores de quimiotaxis estimulan su histidina quinasa asociada a autofosforilarse en histidina y a transferir el grupo fosforilo a una proteína reguladora de respuesta, que transmite la señal a un motor flagelar modificando el comportamiento natatorio de la bacteria. Los atrayentes causan el efecto opuesto en esta quinasa y, por tanto, en la natación. Estas respuestas dependen de forma crucial de la adaptación del receptor, que está mediada por metilación reversible del receptor.

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTES DE PROTEOLISIS REGULADA POR PROTEÍNAS LATENTES REGULADORAS DE GENES

La necesidad de señalización entre células es muy importante en el desarrollo animal. Cada célula del embrión debe ser guiada a lo largo de una u otra vía de desarrollo según su historia, su posición y las características de sus células vecinas. En cada paso de la vía, la célula tiene que intercambiar señales con sus vecinas para coordinar su comportamiento con ellas, asegurando que sea correcto tanto el número como el patrón de los diferentes tipos celulares en cada tejido u órgano. La mayoría de las vías de señalización que hemos descrito se utilizan de forma amplia durante estos procesos de desarrollo, controlando la supervivencia celular, su crecimiento, proliferación, adhesión, especificación, diferenciación y migración.

Sin embargo, también existen otras vías de señalización que son como mínimo tan importantes como éstas en el control de los procesos de desarrollo, pero que transmiten las señales entre los receptores de superficie celular y el interior de la célula de maneras diferentes. Algunas de estas vías dependen de *proteolisis regulada* para controlar la actividad y la localización de *proteínas latentes reguladoras de la expresión génica*, que entran en el núcleo y activan la transcripción de determinados genes diana sólo después de haber sido activadas por una señal. A pesar de que las proteínas STAT y Smad, tratadas antes, también son proteínas latentes reguladoras de genes, se activan por fosforilación en respuesta a señales extracelulares y no por degradación proteica selectiva. Las vías de señalización que utilizan proteínas latentes de la expresión génica proporcionan, como función principal, una vía lineal relativamente directa a través de la cual las señales extracelulares controlan la expresión génica; esta es la causa por la que probablemente se utilizan tanto durante el desarrollo y en especial para controlar las decisiones del destino de las células.

A pesar de que la mayoría de las vías que se analizan en esta sección fueron descubiertas en estudios genéticos en *Drosophila*, se han conservado durante la evolución, y, por tanto, se utilizan habitualmente durante el desarrollo animal. Como se expone en el Capítulo 23, también resultan cruciales en muchos procesos de desarrollo que continúan en los tejidos y en los órganos de los animales adultos.

En esta sección describiremos cuatro de estas vías de señalización: la mediada por la proteína receptora *Notch*, la activada por proteínas secretadas *Wnt*, la activada por proteínas secretadas *Hedgehog*, y la que depende de la activación de la proteína latente reguladora de genes *NFκB*. Todas estas vías desempeñan papeles cruciales en el desarrollo animal. En el Capítulo 22 se describe con detalle el papel central de Notch, Wnt y Hedgehog en la señalización del desarrollo animal.

La proteína receptora Notch es una proteína latente reguladora de genes

La señalización a través de la proteína receptora **Notch** puede ser la vía de señalización más utilizada a lo largo del desarrollo animal. Como se expone en el Capítulo 22, desempeña un papel general controlando la elección del destino celular y regulando los patrones de formación durante el desarrollo de la mayor parte de tejidos, así como en la renovación continua de tejidos como es el caso de la pared interna del intestino. Sin embargo, es más conocida por su papel en la producción de células nerviosas en *Drosophila*, que por lo general aparecen como células individuales aisladas dentro de una capa epitelial de células precursoras. Durante este proceso, cuando una célula precursora se compromete a transformarse en una célula nerviosa, señaliza a sus vecinas más cercanas a que no hagan lo mismo; las células inhibidas se desarrollan como células epiteliales. Este proceso, conocido como *inhibición lateral*, depende de un mecanismo de señalización dependiente de contacto que está activado por una proteína señal transmembrana de paso único llamada **Delta**, que se presenta en la superficie de la futura célula nerviosa. Uniéndose a la proteína receptora Notch de una célula vecina, Delta le indica que no se transforme en célula nerviosa (**Figura 15–75**). Cuando este proceso de señalización es defectuoso, las células vecinas de las células nerviosas también se desarrollan como células nerviosas y producen un exceso enorme de neuronas a expensas de las células epiteliales, lo cual es letal.

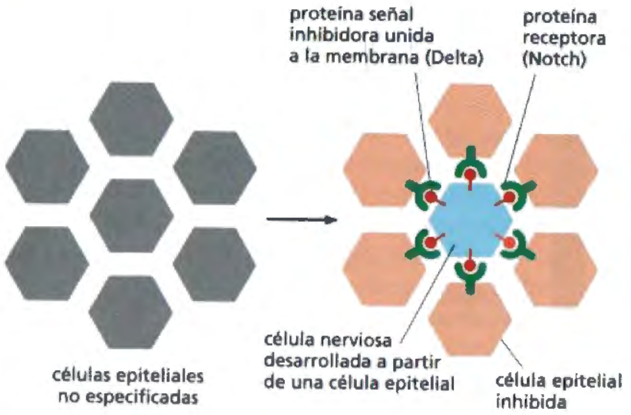


Figura 15–75 Inhibición lateral mediada por Notch y Delta durante el desarrollo de una célula nerviosa en *Drosophila*. Cuando en el epitelio hay células que empiezan a desarrollarse como células neuronales, éstas señalan a sus vecinas que no deben hacer lo mismo. Esta señalización, dependiente de contacto de tipo inhibidor, está mediada por el ligando Delta, que aparece en la superficie de la futura célula nerviosa y que se une a proteínas receptoras de Notch de las células vecinas. En muchos tejidos, las células de un conjunto expresan inicialmente Delta y Notch. Se produce una competencia, de la que emerge una célula ganadora, que expresa Delta fuertemente e inhibe a las células vecinas para que no hagan lo mismo (véase la Figura 22–60). En otros casos, hay otros factores adicionales que interaccionan con Delta y Notch, haciendo más susceptibles a la inhibición lateral a algunas células mientras que a otras las hacen insensibles.

La señalización entre células adyacentes vía Notch y Delta (o de ligandos parecidos a Delta) regula la elección de destino celular en muchos tejidos de muchas especies de animales. A menudo media la inhibición lateral controlando la formación de mezclas de tipos celulares diferenciados en un tejido, como en el sistema nervioso de la mosca. Pero en otros casos facilita, en lugar de inhibir, un destino celular determinado y dirige a las células vecinas a que se comporten de modo similar. Es difícil encontrar algún comportamiento de desarrollo celular que no esté regulado por Notch en uno u otro tejido.

Notch es una proteína con un solo dominio transmembrana que para poder actuar requiere un procesamiento proteolítico. Actúa como una proteína latente reguladora de genes y proporciona la vía de señalización más sencilla y directa de las conocidas que va desde un receptor asociado a la membrana plasmática hasta el núcleo. Cuando se activa por la unión de Delta de otra célula, una proteasa unida a la membrana plasmática corta la cola citoplasmática de Notch, el fragmento liberado se transloca al núcleo y activa la transcripción de un grupo de genes de respuesta a Notch. El fragmento de la cola Notch actúa uniéndose a una proteína de unión a DNA transformándola de represora transcripcional a activadora transcripcional. Las vías de señalización de Wnt y de Hedgehog utilizan esta misma estrategia para regular el destino celular mediante el cambio de un represor de la transcripción transformándolo en activador de la transcripción. El conjunto de genes regulados por la señalización de Notch varía dependiendo del tejido y de las circunstancias, a pesar de que en la mayoría de las células las dianas primarias son miembros de una familia génica conocida (en mamíferos) como genes *Hes*, los cuales codifican proteínas inhibidoras de la regulación de la expresión génica. Por ejemplo, en el sistema nervioso los productos de los genes *Hes* bloquean la expresión de genes necesarios para la diferenciación neuronal.

El receptor Notch sufre tres cortes proteolíticos sucesivos, pero sólo los dos últimos dependen de la unión de Delta. Como parte de su proceso de biosíntesis normal, es cortado en el complejo de Golgi formando un heterodímero que entonces es transportado a la superficie celular como un receptor maduro. La unión de Delta a Notch induce un segundo corte en el dominio extracelular, mediado por una proteasa extracelular diferente. El corte final se da en seguida liberando la cola citoplasmática del receptor activado (**Figura 15–76**). A diferencia de la mayoría de receptores, la activación de Notch es irreversible; una vez activado por la unión de un ligando, la proteína ya no se puede volver a utilizar.

El corte final de la cola de Notch sucede justo en el segmento transmembrana y está mediado por un complejo proteasa denominado *γ-secretasa*, que también es responsable de la rotura intramembranar de otras proteínas. Una de sus subunidades esenciales es la *Presenilina*, denominada así porque las mutaciones en el gen que la codifica son causa frecuente de la aparición prematura de la enfermedad familiar de Alzheimer, una forma de demencia presenil. Parece que el complejo proteasa contribuye a ésta y a otras formas de la enfermedad de Alzheimer generando fragmentos peptídicos a partir de una proteína neurotransmembrana; estos fragmentos se acumulan en cantidades excesivas y forman agregados de proteínas mal plegadas denominadas placas amiloides que pueden dañar las células nerviosas y contribuir a su degeneración y pérdida.

Tanto Notch como Delta son glucoproteínas y su interacción está regulada por la glucosilación de Notch. La *familia Fringe* de glucosil-transferasas, en particular, añade azúcares extra al oligosacárido unido por *O* (se describe en el Capítulo 13) a Notch, el cual modifica la especificidad de Notch por sus ligandos. Este hecho constituye el primer ejemplo de modulación de una señalización ligando-receptor por glucosilación diferencial del receptor.

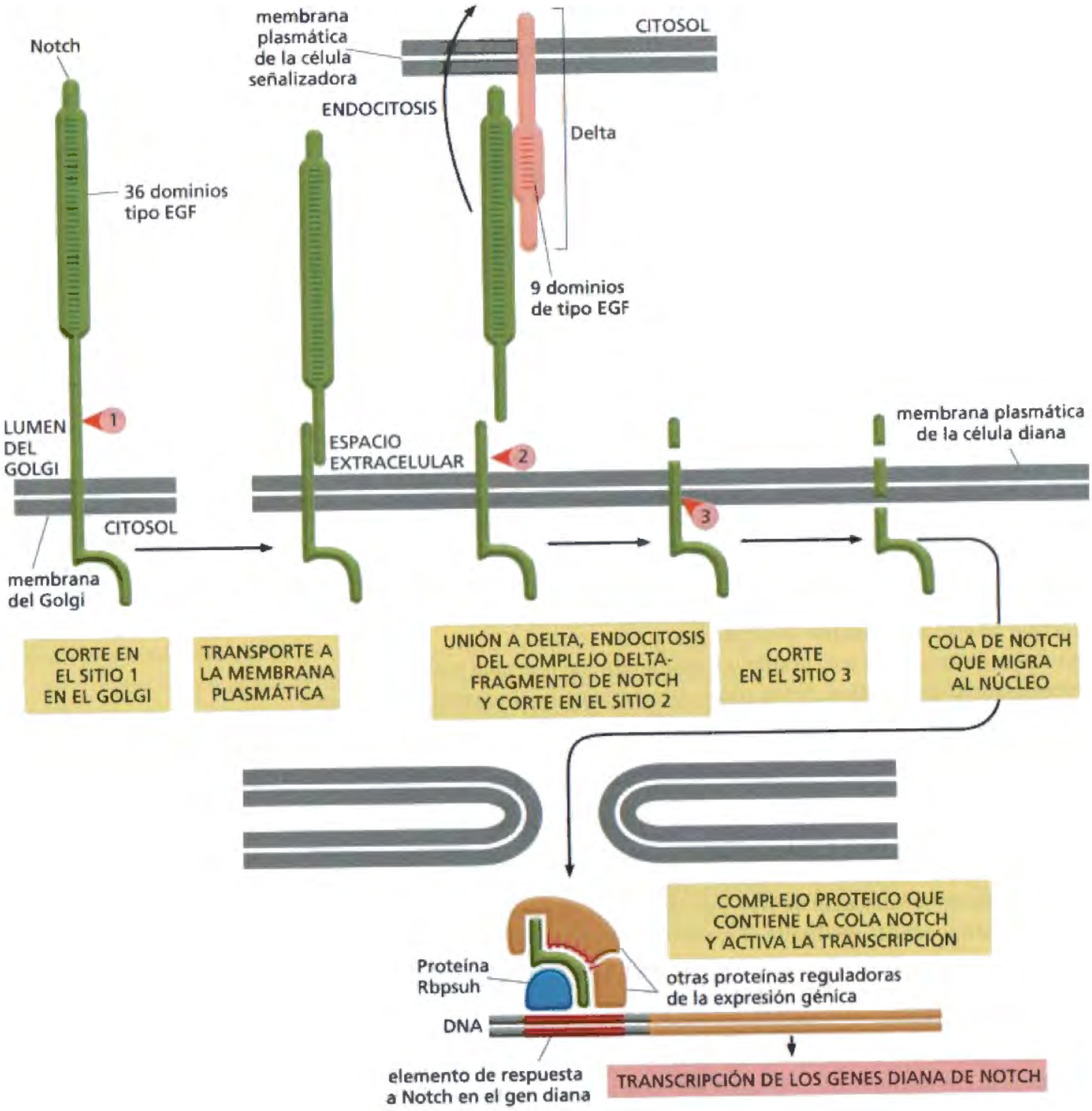


Figura 15–76 Procesamiento y activación de Notch por rotura proteolítica. Las *flechas rojas numeradas* indican los sitios donde se efectúa el corte proteolítico. El primer paso del procesamiento proteolítico ocurre en el *trans* Golgi generando la forma madura heterodimérica del receptor Notch que después estará presente en la superficie celular. La unión de Delta, que se encuentra en una célula vecina, desencadena los dos pasos proteolíticos siguientes: el complejo de delta con la subunidad Notch a la que está unido, es endocitado por la célula que expresa Delta, exponiendo el sitio de la rotura extracelular en la subunidad Notch transmembrana. Obsérvese que Notch y Delta interaccionan a través de sus dominios repetidos tipo EGF.

La cola liberada de Notch migra al núcleo donde se une a la proteína Rbpsuh y la transforma de represora a activadora de la transcripción.

Las proteínas Wnt se unen a los receptores Frizzled e inhiben la degradación de la β-catenina

Las **proteínas Wnt** son moléculas señalizadoras de secreción que actúan como mediadores locales y como morfógenos, controlando diversos aspectos del desarrollo de todos aquellos animales en los que se ha estudiado. Se descubrieron de manera independiente en moscas y en ratones: en *Drosophila*, el gen *Wingless (Wg)* se descubrió originariamente por su papel como morfógeno en el desarrollo del ala (se trata en el Capítulo 22), mientras que en ratón, el gen *Int1* se encontró porque estimula el desarrollo de tumores de mama cuando se activa por la integración de un virus en una zona próxima a él. Ambos genes codifican proteínas Wnt. Las proteínas Wnt son proteínas de secreción especiales ya que están unidas covalentemente en su N-terminal a una cadena de ácido graso, lo cual incrementa su unión a las superficies celulares. En humanos hay 19 proteínas Wnt, cada una de las cuales tiene funciones diferentes aunque a veces se solapan.

Las proteínas Wnt pueden activar al menos tres tipos de vías de señalización intracelular: (1) la *vía de Wnt/β-catenina* (también conocida como la *vía canónica de Wnt*), que se centra en la proteína latente reguladora de la expresión génica, la *β-catenina*; (2) la *vía de polaridad plana* que coordina la polarización de las células en el plano de un epitelio en desarrollo (se describe en los Capítulos 19 y 22) y depende de GTPasas de la familia Rho, y (3) La vía Wnt/Ca^{2+} que genera un incremento del Ca^{2+} intracelular, con las consecuencias que hemos descrito antes para el caso de otras vías. Las tres vías empiezan con la unión de proteínas Wnt a receptores de superficie de la familia de **Frizzled**, proteínas de siete dominios

transmembrana cuya estructura es parecida a la de los GPCR. En humanos hay siete de estos receptores. Cuando se activan por la unión de Wnt, las proteínas Frizzled reclutan la proteína armazón **Dishevelled** que es necesaria para transmitir la señal corriente abajo de las tres vías de señalización. La exposición se centrará en la primera vía.

La **vía Wnt/β-catenina** actúa regulando la proteolisis de la proteína multifuncional denominada **β-catenina** (o *Armadillo* en moscas). La β-catenina actúa en la adhesión célula-célula (se trata en el Capítulo 19) y en la regulación de la expresión génica. En esta vía (pero no en las otras vías de Wnt) Wnt actúa uniéndose tanto a la proteína Frizzled como a una proteína co-receptora que está relacionada con la proteína receptora de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (se describe en el Capítulo 13) por lo que se le denomina **proteína receptora relacionada con el receptor de LDL** (**LRP**: *LDL-receptor-related protein*). En las células epiteliales la mayor parte de la β-catenina de la célula está localizada en las uniones adherentes célula-célula donde se encuentra asociada a proteínas transmembrana de adhesión denominadas *cadherinas* que son proteínas transmembrana de adhesión célula-célula. Como se indica en el Capítulo 19, en estas uniones la β-catenina ayuda a unir las cadherinas al citoesqueleto de actina. Tanto en las células epiteliales como también en las no epiteliales la β-catenina que no está asociada a cadherinas es degradada rápidamente en el citoplasma.

La degradación de la β-catenina citoplasmática depende de un gran *complejo proteico de degradación* que se une a β-catenina y la mantiene fuera del núcleo facilitando su degradación. El complejo contiene al menos otras cuatro proteínas: una serina/treonina quinasa denominada *caseína quinasa 1* (*CK1: casein kinase 1*) que fosforila la proteína β-catenina en una serina, marcándola así para su posterior fosforilación por otra serina/treonina quinasa denominada *glucógeno sintasa quinasa 3* (*GSK3*: *glicogen synthase kinase 3*); esta fosforilación final marca la proteínas para su ubiquitinización y rápida degradación en los proteosomas. Dos proteína de armazón llamadas *axina* y *coli poliposis adenomatosa* (*APC*: *adenomatous polyposis coli*) mantienen unido el complejo proteico (**Figura 15–77**A). La proteína APC se denominada así porque el gen que la codifica se encuentra mutado con frecuencia en un tumor benigno (adenoma) de colon. El tumor se proyecta hacia el lumen como un pólipo y, con el tiempo, puede convertirse en maligno –esta proteína APC no debe confundirse con el complejo activador de la anafase (*APC*: *anaphase promoting complex*), que desempeña un papel central en la degradación selectiva de proteínas durante el ciclo celular; véase la Figura 17–20A.

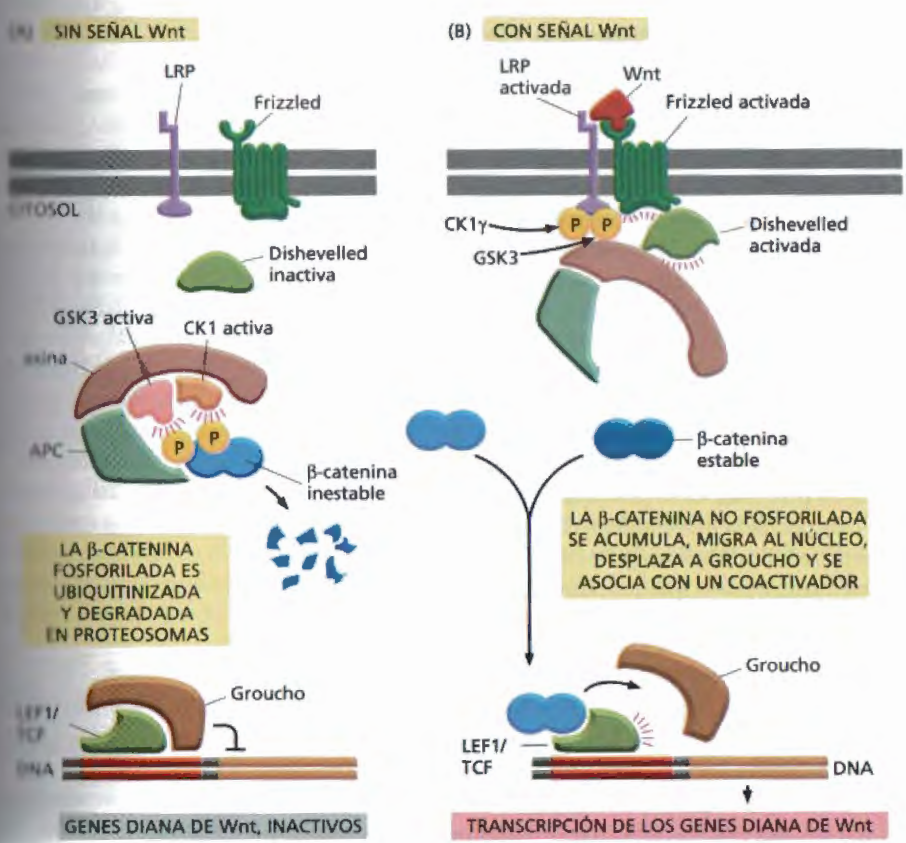


Figura 15–77 La vía de señalización Wnt/β-catenina. (A) En ausencia de señal Wnt, la β-catenina que no está unida a la cola citosólica de proteínas cadherina (no se muestra) es captada por un complejo de degradación que contiene APC, axina, GSK3, y CK1. En este complejo, la β-catenina es fosforilada por CK1 y después por GSK3, disparando su ubiquitinización y posterior degradación en proteosomas. Los genes que responden a Wnt se mantienen inactivos por la proteína correpresora Groucho unida a la proteína reguladora de genes LEF1/TCF. (B) La unión de Wnt a Frizzled y a LRP une ambos tipos de receptores, lo cual provoca el reclutamiento del complejo de degradación a la membrana plasmática y la fosforilación de la cola citosólica de LRP por GSK3 y después por CK1γ. La axina se une a LRP fosforilado y es inactivada y/o degradada. El complejo de degradación, al quedarse sin axina, se inactiva bloqueando así la fosforilación y la ubiquitinización de la β-catenina, lo cual permite que la β-catenina no fosforilada se acumule y se transloque al núcleo. Para que la vía de señalización actúe son necesarias Dishevelled y probablemente una proteína G; ambas se unen a Frizzled y Dishevelled resulta fosforilada (no se muestra), pero sus papeles funcionales son desconocidos.

Una vez en el núcleo, la β-catenina se une a LEF1/TCF, desplazando al correpresor Groucho, y actúa como un coactivador estimulando la transcripción de los genes diana de Wnt.

La unión de una proteína Wnt tanto a Frizzled como al receptor LRP une ambos receptores formando un complejo. Mediante un proceso muy poco conocido, ambas clases de proteínas quinasa, GSK3 y después CK1γ, fosforilan la cola citosólica del receptor LRP, permitiendo que esta cola de LRP reclute e inactive a la axina, desmontando así la degradación del complejo en el citoplasma. De esta forma se inhibe la fosforilación y la degradación de la β-catenina, permitiendo que la β-catenina no fosforilada se acumule gradualmente y transloque al núcleo, donde altera el patrón de transcripción génica (Figura 15–77B).

En ausencia de la señalización de Wnt, los genes que responden a Wnt se mantienen silentes mediante un complejo inhibidor de proteínas reguladoras de genes. El complejo incluye proteínas de la familia *LEF1/TCF* unidas a una proteína correpresora de la familia *Groucho* (véase Figura 15–77A). En respuesta a una señal Wnt, la β-catenina entra en el núcleo y se une a las proteínas LEF1/TCF desplazando a Groucho. Ahora, la β-catenina actúa como un coactivador e induce la transcripción de los genes diana de Wnt (véase Figura 17–77B). Así, como en el caso de la señalización por Notch, la señalización de Wnt/β-catenina cambia un interruptor desde represión de la transcripción hasta activación de la transcripción.

Entre los genes activados por β-catenina se encuentra *c-Myc*, que codifica una proteína (c-Myc) que es un potente estimulador de la proliferación y crecimiento celulares (expuesto en el Capítulo 17). En el 80% de cánceres de colon humanos se encuentran mutaciones en el gen *Apc* (se trata en el Capítulo 20). Dichas mutaciones inhiben la capacidad de la proteína de unir β-catenina, de manera que la β-catenina se acumula en el núcleo de la célula donde activa la transcripción de *c-Myc* y otros genes diana de Wnt, incluso en ausencia de señalización Wnt. El crecimiento y la proliferación celulares descontrolados resultantes estimulan el desarrollo de cáncer.

Varias proteínas inhibidoras secretadas regulan la señalización de Wnt durante el desarrollo. Algunas de ellas se unen a los receptores LRP facilitando su regulación hacia abajo (*down-regulation*) mientras que otras compiten con los receptores Frizzled por las Wnt secretadas. Al menos en *Drosophila*, Wnt activa circuitos de retroalimentación negativa en los que los genes diana de Wnt codifican proteínas que colaboran en la inhibición de la respuesta; algunas de estas proteínas inhiben Dishevelled y otras son inhibidores secretados.

Las proteínas Hedgehog se unen a Patched y eliminan su efecto inhibidor sobre Smoothened

Las proteínas Wnt y las proteínas Hedgehog actúan de forma similar. Ambas son moléculas señal de secreción que actúan como mediadores locales y como morfógenos en mucho de procesos de desarrollo en invertebrados y en vertebrados. Ambas se modifican mediante la unión covalente de lípidos y para su acción dependen de proteoglucanos de heparán sulfato secretados o unidos a la superficie celular (se describe en el Capítulo 19) y activan proteínas latentes reguladoras de genes inhibiendo su proteolisis. Ambas cambian un interruptor de represión transcripcional a activación transcripcional y una excesiva señalización a través de una de ambas vías en las células adultas conduce al cáncer. Incluso utilizan las mismas proteínas de señalización intracelular y a veces colaboran para mediar en una respuesta.

Las **proteínas Hedgehog** se descubrieron en *Drosophila*, donde esta familia de proteínas sólo tiene un miembro. Una mutación en el gen que la codifica a *Hedgehog* produce una larva recubierta de prolongaciones espinosas (dentículos) parecida a un erizo (*hedgehog*). En vertebrados al menos existen tres genes que codifican proteínas Hedgehog: *Sonic, Desert* e *Indian hedgehog*. Las formas activas de todas las proteínas Hedgehog están acopladas covalentemente al colesterol y a una cadena de ácido graso. La adición de colesterol se produce mediante un proceso poco habitual en el que un precursor de la proteína se corta a sí misma produciendo una proteína señalizadora más pequeña que contiene colesterol. Sin embargo, casi todo lo que sabemos sobre las vías de señalización corriente abajo activadas por Smoothened procede de estudios genéticos en moscas, por lo que a continuación se resumirá la vía encontrada en la mosca.

Las respuestas a las proteínas Hedgehog están mediadas por tres proteínas transmembrana: Patched, Smoothened e iHoh. **Patched** se puede predecir que cruza la membrana plasmática doce veces y, a pesar de que la mayor parte de ella se encuentra en vesículas intracelulares, se une a la proteína Hedgehog. Las proteínas **iHog** tienen cuatro o cinco dominios semejantes a inmunoglobulinas y dos o tres dominios semejantes a fibronectina de tipo III; se encuentran sobre la superficie celular y parece que actúan como receptores de las proteínas Hedgehog, probablemente actuando como correceptores con Patched. **Smoothe-**

ned es una proteína transmembrana de 7 pasos con una estructura muy similar a la de Frizzled. En ausencia de una señal Hedgehog, Patched a través de un mecanismo desconocido mantiene a Smoothened secuestrada e inactiva en vesículas intracelulares. La unión de Hedgehog a iHog y a Patched inhibe la actividad de Patched e induce su endocitosis y degradación. El resultado de ello es que Smoothened se fosforila, se transloca a la superficie celular y transmite la señal corriente abajo.

Los efectos corriente abajo están mediados por una proteína latente reguladora de genes denominada **Cubitus interruptus** (**Ci**). En ausencia de una señal Hedgehog, Ci es ubiquitinizada y cortada proteolíticamente en los proteosomas. Pero en vez de degradarse por completo, se procesa formando una proteína más pequeña que se acumula en el núcleo, donde actúa como un represor transcripcional y facilita el silenciamiento de algunos genes diana de Hedgehog. El procesado proteolítico de la proteína Ci depende de su fosforilación por tres proteínas serina/treonina quinasa: PKA y dos quinasas también utilizadas en la vía Wnt, denominadas GSK3 y CK1. Como en la vía Wnt, el procesamiento proteolítico ocurre en un complejo multiproteico que incluye una serina/treonina quinasa (denominada *Fused*) y una proteína de armazón (llamada *Costal2*) que se asocia de forma estable con Ci, recluta las otras tres quinasas y se une al complejo a los microtúbulos, manteniendo así a Ci fuera del núcleo (**Figura 15–78A**).

Cuando la vía Hedgehog está activada y, por tanto, Smoothened está liberada de la membrana plasmática, recluta los complejos proteicos que contienen Ci, Fused y Costal2. Costal2 ya no es capaz de unir a las otras tres quinasas de forma que Ci ya no es fragmentada. Ahora, la proteína Ci no procesada puede entrar en el núcleo y activar la transcripción de genes diana de Hedgehog (Figura 15–78B). Entre los genes activados por Ci se encuentra el propio *Patched*; el incremento resultante de la proteína Patched en la superficie celular inhibe cualquier nueva señalización de Hedgehog –lo cual constituye un nuevo ejemplo de retroalimentación negativa.

Aún quedan por determinar muchos de los pasos de la vía de señalización de Hedgehog. Por ejemplo, no se conoce cómo Patched mantiene inactiva e intracelularmente a Smoothened. Dado que la estructura de Patched parece la de una proteína transportadora transmembrana, se ha propuesto que puede transportar una pequeña molécula al interior de la célula que mantenga a Smoothened secuestrada en vesículas.

Menos aún se conoce sobre la vía de señalización de Hedgehog en células de vertebrados. Además de existir al menos tres tipos de proteínas Hedgehog en vertebrados, hay tres proteínas reguladoras de genes semejantes a Ci (*Gli1*, *Gli2* y *Gli3*) corriente abajo de Smoothened. Únicamente se ha demostrado que Gli3 sufre un procesamiento proteolítico semejante al de Ci y que actúa como un represor transcripcional o como un activador transcripcional. Parece que tanto Gli1 como Gli2 sólo actúan como activadores transcripcionales. Además, en vertebrados cuando Smoothened está activada se localiza en un lugar muy específico de la membrana plasmática: la superficie del cilio primario que se proyecta desde la superficie de la mayor parte de tipos celulares de vertebrados (como se describe en el Capítulo 16). El cilio primario actúa como un centro de señalización de Hedgehog y las proteínas Gli también se concentran allí. Esta distribución probablemente incrementa la velocidad y la eficiencia del proceso de señalización.

La señalización de Hedgehog puede promover la proliferación celular y una señalización excesiva de Hedgehog puede conducir a un cáncer. Por ejemplo, las mutaciones que inactivan uno de los dos genes *Patched* en humanos, lo cual produce una señalización excesiva de Hedgehog, se presentan con frecuencia en *carcinoma de células basales* de la piel, la forma de cáncer más común en los caucasianos. Una pequeña molécula llamada *ciclopamina*, sintetizada por un lirio de las praderas, se utiliza para tratar cánceres asociados con una señalización excesiva de Hedgehog. Bloquea la señalización de Hedgehog uniéndose con fuerza a Smoothened e inhibiendo su actividad. Se identificó originalmente porque causa defectos graves en el desarrollo de la progenie de la oveja de las praderas, como un único ojo central (una condición denominada *ciclopia*), que también se encuentra en las ratas que son deficientes en señalización de Hedgehog.

Muchos estímulos de estrés e inflamatorios actúan mediante una vía de señalización dependiente de NFκB

Las **proteínas NFκB** son proteínas reguladoras de la expresión génica en estado latente, que se presentan en la mayoría de células animales y son clave en la mayoría de respuestas infla-

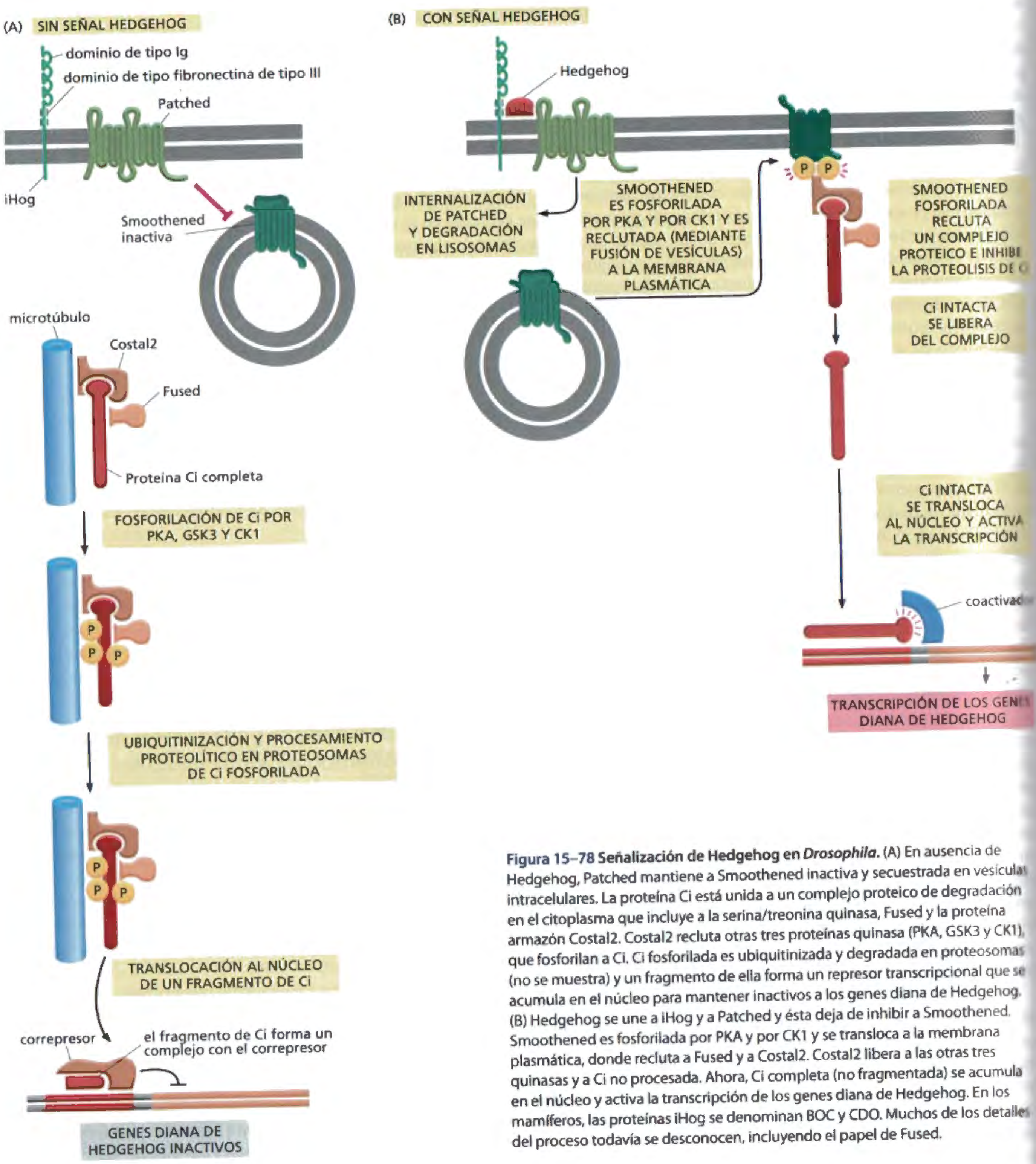


Figura 15–78 Señalización de Hedgehog en *Drosophila*. (A) En ausencia de Hedgehog, Patched mantiene a Smoothened inactiva y secuestrada en vesículas intracelulares. La proteína Ci está unida a un complejo proteico de degradación en el citoplasma que incluye a la serina/treonina quinasa, Fused y la proteína armazón Costal2. Costal2 recluta otras tres proteínas quinasa (PKA, GSK3 y CK1), que fosforilan a Ci. Ci fosforilada es ubiquitinizada y degradada en proteosomas (no se muestra) y un fragmento de ella forma un represor transcripcional que se acumula en el núcleo para mantener inactivos a los genes diana de Hedgehog. (B) Hedgehog se une a iHog y a Patched y ésta deja de inhibir a Smoothened. Smoothened es fosforilada por PKA y por CK1 y se transloca a la membrana plasmática, donde recluta a Fused y a Costal2. Costal2 libera a las otras tres quinasas y a Ci no procesada. Ahora, Ci completa (no fragmentada) se acumula en el núcleo y activa la transcripción de los genes diana de Hedgehog. En los mamíferos, las proteínas iHog se denominan BOC y CDO. Muchos de los detalles del proceso todavía se desconocen, incluyendo el papel de Fused.

matorias y de inmunidad innata. Estas respuestas ocurren como reacción a infecciones o lesiones y ayudan a proteger a los organismos pluricelulares estresados y a sus células (se trata en el Capítulo 24). Una respuesta inflamatoria excesiva o inapropiada en animales puede también dañar el tejido y causar un intenso dolor, y una inflamación crónica puede conducir a un cáncer; como en el caso de las señalizaciones de Wnt y de Hedgehog en varios cánceres humanos se presentan. Las proteínas NFκB también tienen papeles importantes durante el desarrollo normal en vertebrados. Por ejemplo, el miembro *Dorsal* de la familia NFκB de *Drosophila* desempeña un papel crucial en la especificación del eje dorso-ventral en el desarrollo del embrión de la mosca (se describe en el Capítulo 22).

Varios receptores de superficie celular activan la vía de señalización de NFκB. Los *receptores Toll* en *Drosophila* y los *receptores semejantes a Toll* en vertebrados, por ejemplo, reconocen patógenos y activan esta vía disparando respuestas inmunitarias innatas (se discute en el Capítulo 24). Los receptores para el *factor de necrosis tumoral α* (*TNFα*: ***tumor necrosis factor α***) y para la *interleuquina-1* (*IL1*), que son citoquinas de vertebrados especialmente importantes en la inducción de respuestas inflamatorias, también activan esta vía. Los receptores Toll, semejantes a Toll e IL1 pertenecen a la misma familia de proteínas, mientras que los receptores TNF pertenecen a otra familia diferente; sin embargo, todos actúan de forma similar activando NFκB. Cuando están activados, inician una cascada de ubiquitinización multiproteica y fosforilación que libera NFκB de un complejo proteico inhibidor, de forma que ahora se puede translocar hasta el núcleo y activar la transcripción de centenares de genes que participan en las respuestas inflamatoria e inmunitaria innata.

En mamíferos, hay cinco proteínas NFκB (*RelA*, *RelB*, *c-Rel*, *NFκB1* y *NFκB2*), que forman una gran variedad de homodímeros y heterodímeros, cada uno de los cuales activa un conjunto característico de genes. Las proteínas inhibidoras denominadas **IκB** se unen fuertemente a los dímeros manteniéndolos en un estado inactivo en el citoplasma de las células no estimuladas. En mamíferos hay tres IκB principales (IκBα, β y ε) y las señales que liberan los dímeros de NFκB inician una vía de señalización que conduce a la fosforilación, ubiquitinización y degradación de las proteínas IκB. La fosforilación de IκB está mediada por una *IκB quinasa* (*IKK*: ***IκB kinase***), que es un complejo multiproteico que contiene dos proteína serina/treonina quinasa (IKKα e IKKβ) y una proteína reguladora denominada *NEMO* (***NFκB essential modifier***; modificador esencial de NFκB) o *IKKγ* (**Figura 15–79**).

Entre los genes activados por NFκB cuando se ha liberado, está el gen que codifica IκBα, una de las tres isoformas de IκB que mantienen a NFκB inactivo en el citosol de las células en reposo. Esta activación conduce a la resíntesis de la proteína IκBα, que se une a NFκB inactivándolo y genera un circuito de retroalimentación negativa (**Figura 15–80A**). Experimentos con respuestas inducidas con TNFα así como estudios de modelaje de respuestas por ordenador indican que la retroalimentación negativa produce dos tipos de respuestas de NFκB, dependiendo de la duración del estímulo de TNFα. Las exposiciones cortas (de duración menor a una hora) a TNFα producen un corto periodo de activación de NFκB que es independiente de la duración del estímulo de TNFα; la retroalimentación negativa a través de IκBα inhibe la respuesta pasada aproximadamente una hora. Por el contrario, la exposición prolongada produce ligeras oscilaciones de activación de NFκB, en las que cada activación

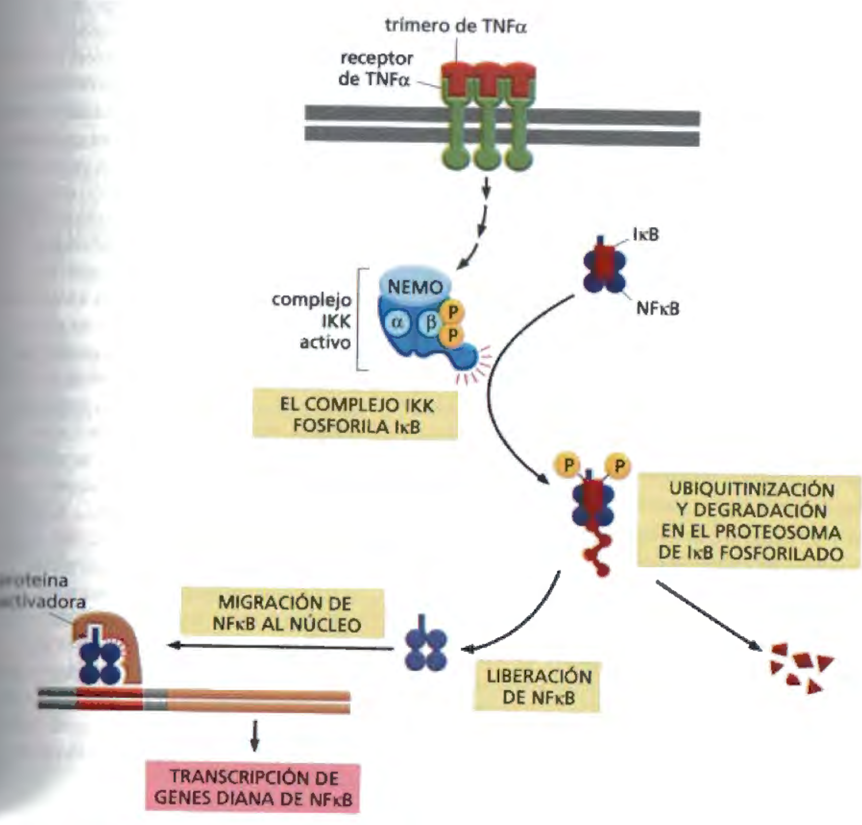


Figura 15–79 Activación de la vía NFκB por TNFα. Tanto TNFa como sus receptores, son trímeros. La unión de TNFα provoca la reorganización de las fracciones citosólicas de los receptores, agrupadas, que entonces pueden reclutar diversas proteínas intracelulares de señalización, lo cual produce la activación de una proteína serina/treonina quinasa, que fosforila y activa la IκB quinasa (IKK). IKK es un heterotrímero formado por dos subunidades quinasa (IKKα e IKKβ) y una subunidad reguladora llamada NEMO. Entonces, IKKβ fosforila a IκB en dos residuos serina, lo que marca a la proteína para su ubiquitinización y degradación en proteosomas. El NFκB liberado migra al núcleo donde, en colaboración con proteínas coactivadoras, estimula la transcripción de sus genes diana.

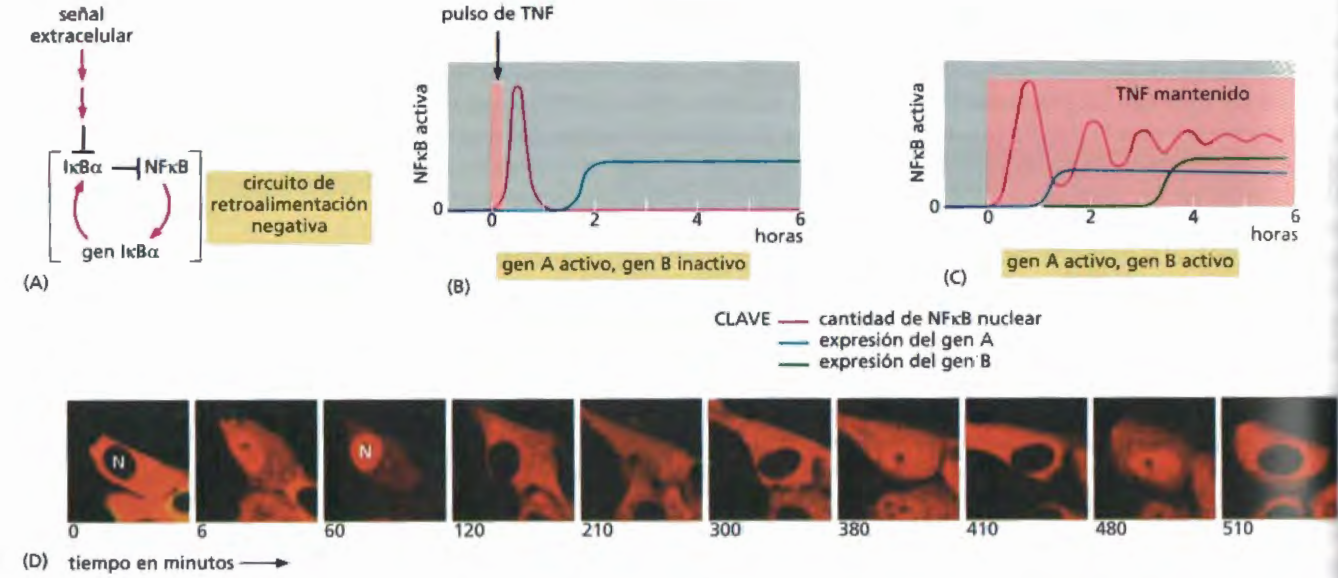


Figura 15–80 La retroalimentación negativa en la señalización de NFκB induce oscilaciones en la activación de NFκB. (A) Dibujo en el que se muestra que la NFκB activada estimula la transcripción de IκBα, proteína que actúa corriente arriba y secuestra en el citoplasma a NFκB; si el estímulo es persistente la nueva IκBα acabada de sintetizar será ubiquitinizada y degradada, liberando de nuevo NFκB activa que puede volver al núcleo y activar la transcripción (véase Figura 15–79). (B) Una corta exposición a TNFα produce un único pulso corto de activación de NFκB, que empieza en cuestión de minutos y acaba alrededor de una hora más tarde. Esta respuesta activa la transcripción del gen A pero no la del gen B. (C) Una exposición mantenida a TNFα durante 6 horas produce oscilaciones en la activación de NFκB que se van debilitando con el tiempo. Esta respuesta activa la transcripción de ambos genes; el gen B se activa únicamente tras varias horas, lo cual indica que la transcripción del gen B requiere la activación prolongada de NFκB, por razones que todavía se desconocen. (D) Micrografías con el microscopio de fluorescencia confocal tomadas a intervalos de tiempo de un estudio diferente de estimulación con TNFα que muestran las oscilaciones de NFκB en una célula en cultivo como indica el desplazamiento periódico al núcleo (N) de una proteína de fusión compuesta por NFκB unida a una proteína roja fluorescente. En la célula situada en la parte superior de las micrografías, NFκB está activa y en el interior del núcleo a los 6, 60, 210, 380 y 480 minutos, pero está exclusivamente en el citoplasma a los 0, 120, 300, 410 y 510 minutos. (A-C, basado en datos de A. Hoffmann et al., *Science* 298:1241-1245, 2002, y adaptado de A.Y. Ting y D. Endy, *Science* 298:1189-1190, 2002; D, de D.E. Nelson et al., *Science* 306:704-708, 2004. Todo con la autorización de la AAAS.)

va seguida por una inactivación mediada por IκBα, seguida por la destrucción de IκBα y la reactivación de NFκB, y así sucesivamente; las oscilaciones pueden persistir durante varias horas antes de desvanecerse, incluso aunque se mantenga el estímulo. Resulta importante que los dos tipos de respuestas inducen patrones diferentes de expresión génica, como que algunos genes diana de NFκB sólo se activan en respuesta a la activación oscilatoria prolongada de NFκB (Figura 15–80B, C y D). La retroalimentación negativa a través de IκBα es necesaria en ambos tipos de respuestas: en células deficientes en IκBα, incluso las exposiciones más cortas a TNFα inducen una activación mantenida de NFκB, sin oscilaciones, y se activan todos los genes sensibles a NFκB.

Hasta aquí se ha descrito la señalización celular principalmente en animales, con algunos comentarios sobre levaduras y bacterias. Pero, como se indica a continuación, la señalización intracelular es tan importante en animales como en plantas, aunque la mayoría de los mecanismos y de las moléculas implicadas sean diferentes.

Resumen

Algunas vías de señalización, importantes durante el desarrollo en animales, dependen de procesos proteolíticos para controlar la actividad y la localización de proteínas latentes reguladoras de genes. Los receptores Notch son una de estas proteínas latentes reguladoras de genes que se activan por corte cuando Delta (o un ligando relacionado) situado en otra célula se unen a ellos; el fragmento proteolítico de la cola de Notch situado en el citosol migra hasta el núcleo donde estimula la transcripción de genes que responden a Notch. Por el contrario, en la vía de señalización por Wnt/β-catenina, se inhibe la proteolisis de la proteína latente reguladora de la expresión génica, β-catenina, cuando una proteína Wnt secretada se une a las proteínas receptoras Frizzled y LRP; como resultado de ello, la β-catenina se acumula en el núcleo y activa la transcripción de genes diana de Wnt.

La señalización por Hedgehog en moscas actúa de manera similar a la señalización por Wnt. En ausencia de señal, la proteína citoplasmática reguladora de genes bifuncional Ci es fragmentada proteolíticamente formando un represor transcripcional que silencia los genes diana de Hedgehog. La unión de Hedgehog a sus receptores (Patched e iHog) inhibe el procesamiento proteolítico de Ci; la forma no-procesada de Ci se acumula en el núcleo donde activa la transcripción de los genes diana de Hedgehog. En las señalizaciones por Notch, Wnt y Hedgehog, la señal extracelular dispara un interruptor que pasa de represión transcripcional a activación transcripcional.

La señalización a través de la proteína latente reguladora de la expresión NFκB también depende de proteolisis. Por lo general, las proteínas NFκB se mantienen en un estado inactivo mediante las proteínas IκB inhibidoras en el citoplasma. Una gran variedad de estímulos extracelulares, incluyendo citoquinas proinflamatorias, desencadena la fosforilación y ubiquitinización de IκB, lo que la marca para su degradación; este fenómeno permite que NFκB entre en el núcleo donde activa la transcripción de sus genes diana. NFκB también activa la transcripción del gen que codifica IκBα, generando un circuito de retroalimentación negativa que puede producir oscilaciones prolongadas de la actividad de NFκB si la señal extracelular se mantiene.

SEÑALIZACIÓN EN PLANTAS

En las plantas, como en los animales, las células están en constante comunicación entre ellas. Las células de las plantas se comunican coordinando sus actividades en respuesta a los cambios en las condiciones de luz, oscuridad y temperatura, que guían el ciclo de crecimiento, floración y fructificación de las plantas. Las células de las plantas también se comunican coordinando las actividades de sus raíces, troncos y hojas. En esta sección final, se procederá a considerar cómo las células de las plantas se comunican entre ellas mediante señales, y cómo responden a la luz. Se conoce poco sobre los receptores y los mecanismos de señalización intracelulares implicados en la comunicación celular en plantas, todo lo cual se conoce mucho mejor en animales; la explicación se centrará principalmente en las diferencias que hay entre plantas y animales respecto a los receptores y sus mecanismos. Se describen algunos de los detalles y mecanismos del desarrollo de las plantas en el Capítulo 22.

La pluricelularidad y la comunicación celular evolucionaron independientemente en plantas y animales

Tanto las plantas como los animales son seres eucariotas, pero evolucionaron de forma separada durante más de mil millones de años. Parece que su último antepasado común fue un organismo eucariota unicelular que tenía mitocondrias pero no cloroplastos; el linaje de las plantas adquirió los cloroplastos después de la divergencia de animales y plantas. Los fósiles más antiguos de animales y plantas pluricelulares datan de hace al menos 600 millones de años. Así, parece que la pluricelularidad de animales y plantas evolucionó de forma independiente, empezando cada cual a partir de un organismo eucariota unicelular diferente, hace entre 1600 y 600 millones de años (**Figura 15–81**).

Si la pluricelularidad evolucionó independiente en plantas y animales, las moléculas y los mecanismos utilizados para la comunicación celular tienen que haber evolucionado separadamente y debería esperarse que fuesen diferentes. Sin embargo, se espera que exista algún grado de parecido puesto que los genes de plantas y animales han divergido a partir del mismo conjunto de genes del último antepasado común unicelular. Así, mientras que tanto plantas como animales utilizan para transmitir señales el óxido nítrico, el GMP cíclico, el Ca^{2+} y las GTPasas de la familia Rho, en el genoma de *Arabidopsis thaliana* –una pequeña planta con flores–, no existen homólogos de los receptores nucleares de las familias Ras, JAK, STAT, TGFβ, Notch, Wnt o Hedgehog. De manera similar, parece que las plantas no utilizan el AMP cíclico en la señalización intracelular.

La mayor parte de lo que se conoce sobre los mecanismos moleculares implicados en señalización en plantas procede de los estudios genéticos llevados a cabo en *Arabidopsis*. Aunque por lo general las moléculas específicas utilizadas en comunicación celular en plantas son diferentes de las utilizadas en animales, las estrategias generales suelen ser muy similares. Por ejemplo, ambos utilizan receptores de superficie celular acoplados a enzimas, como se describirá a continuación.

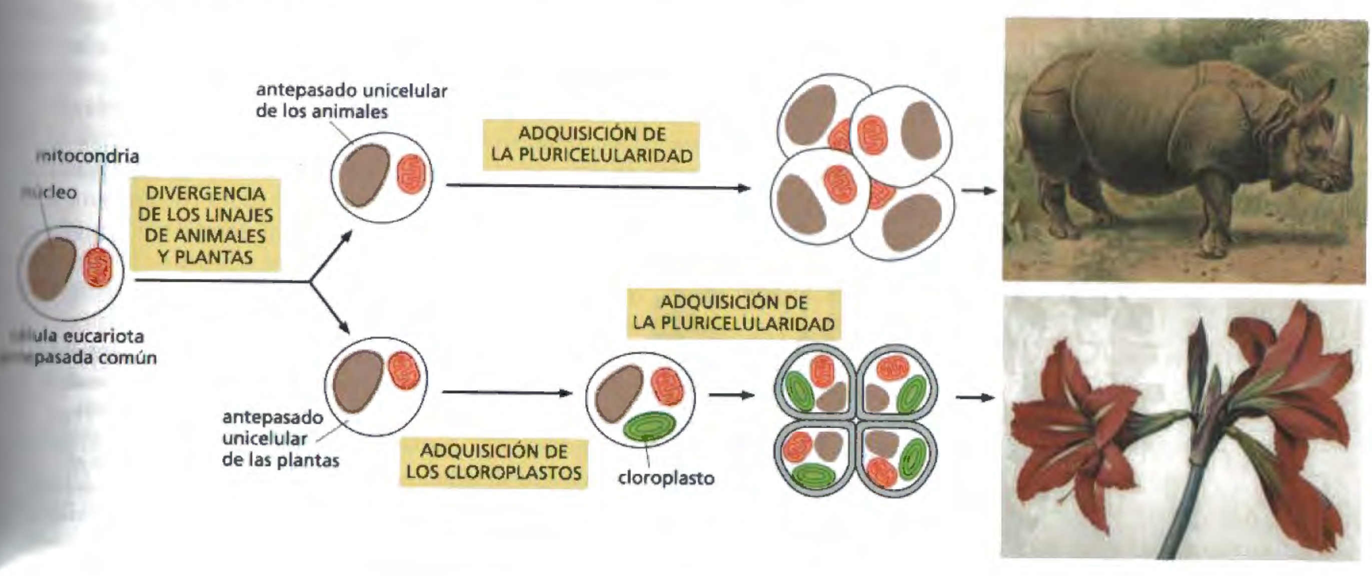


Figura 15–81 Divergencia propuesta de los linajes de plantas y animales desde un antepasado eucariota unicelular común. El linaje de las plantas adquirió los cloroplastos después de que los dos linajes hubieran divergido. Los dos linajes originaron de manera independiente organismos pluricelulares: plantas y animales. (Dibujos por cortesía de John Innes Foundation.)

Los receptores serina/treonina quinasa actúan como receptores de superficie celular en plantas

Mientras que en animales la mayoría de receptores de superficie celular están acoplados a proteínas G (GPCR), la mayoría de receptores de las plantas están asociados a enzimas. Además, mientras que en los mamíferos la mayor clase de receptores asociados a enzimas son receptores de la clase tirosina quinasa (RTK), en las plantas este tipo de receptor es muy poco habitual. Sin embargo, las plantas tienen muchas tirosinas quinasa citosólicas, y la fosforilación y desfosforilación de tirosinas desempeña un papel importante en la señalización en células vegetales. En lugar de RTK, las plantas tienen una gran diversidad de *receptores serina/treonina quinasa* transmembrana. Aunque son muy diferentes en muchos aspectos a los correspondientes de las células animales, se parecen a ellos en que tienen unos dominios serina/treonina quinasa citoplasmático y de unión al ligando extracelular. Los tipos más abundantes de estos receptores presentan una disposición en tándem de secuencias repetidas ricas en leucinas extracelulares (**Figura 15–82**), por lo que se denominan **receptores quinasa con secuencias repetidas ricas en leucina (LRR**: *leucine-rich repeat*).

En el genoma de *Arabidopsis* existen codificados cerca de 175 receptores quinasa LRR. Uno de los mejor caracterizados es el complejo *receptor Clavata1/Clavata2* (*Clv1/Clv2*). Las mutaciones que inactivan alguno de estos dos receptores causan la producción de flores con órganos florales extra y con un crecimiento progresivo tanto de los brotes como de los *meristemos* florales, que son grupos de células madre que se autorrenuevan y generan las células que darán lugar a ramas, hojas y flores (descrito en el Capítulo 22). Se cree que la molécula señal extracelular que se une al receptor es una pequeña proteína denominada *Clv3*, que es segregada por células vecinas. La unión de Clv3 al receptor Clv1/Clv2, suprime el crecimiento de los meristemos, ya sea inhibiendo la división celular o, más probablemente, estimulando la diferenciación celular (**Figura 15–83**A).

La vía de señalización intracelular que va desde el receptor Clv1/Clv2 hasta la respuesta celular no se conoce apenas, pero sabemos que incluye una proteína serina/treonina fosfatasa que inhibe la señalización. Otras proteínas de la vía de señalización incluyen GTPasas de la familia Rho y una proteína reguladora de la expresión génica que está lejanamente relacionada con las proteínas homeodominio de los animales. Las mutaciones que inactivan esta proteína reguladora de la expresión génica tienen el efecto opuesto al de las mutaciones que inactivan el receptor Clv1/Clv2: la división celular está muy disminuida en los meristemos de los brotes y la planta produce flores con muy pocos órganos. Así pues, parece que la vía de señalización intracelular activada por el receptor Clv1/Clv2 estimula la diferenciación celular inhibiendo la proteína reguladora de la expresión génica que normalmente inhibe la diferenciación celular (Figura 15–83B).

Otro receptor quinasa LRR de *Arabidopsis*, denominado *Bri1*, forma parte de un receptor de hormonas esteroideas de la superficie celular. Las plantas sintetizan una clase de esteroides que se denominan **brasinosteroides**, porque fueron inicialmente identificados en la familia de las mostazas Brassicaceae, que incluye *Arabidopsis*. Estas moléculas de señalización de las plantas regulan el crecimiento y la diferenciación de la planta a través de su ciclo celular. La unión de un brasinosteroide al receptor quinasa de superficie celular Bri1 inicia una cascada de señalización que utiliza la proteína quinasa GSK3 y una proteína fosfatasa para regular la fosforilación y la degradación de determinadas proteínas reguladoras

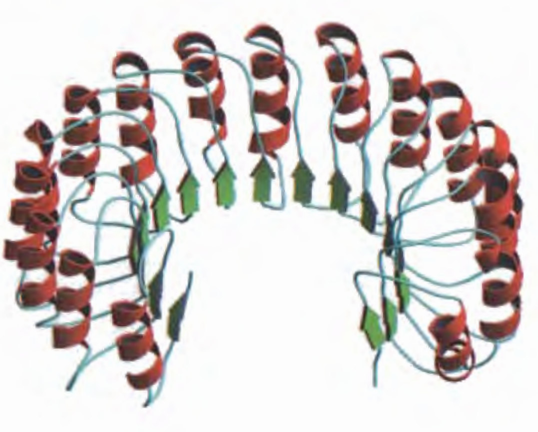


Figura 15–82 Estructura tridimensional de secuencias repetidas ricas en leucina similar a la del LRR de los receptores serina/treonina quinasa. Varias copias de repeticiones como ésta se hallan en el dominio extracelular de los receptores LRR quinasa, donde participan en la unión de la molécula señal. (Cortesía de David Lawson.)

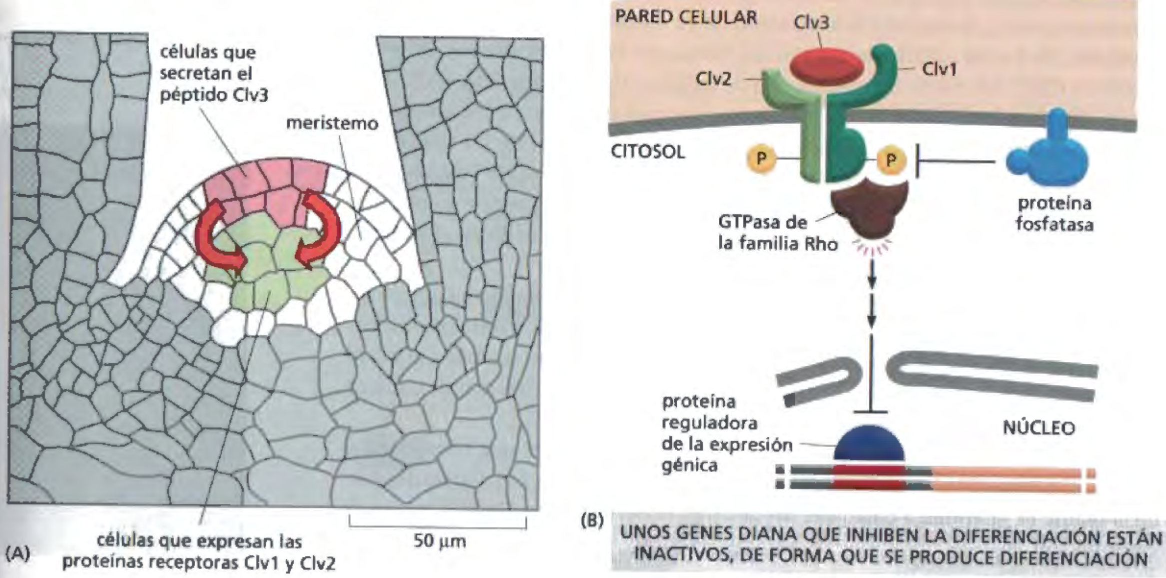


Figura 15–83 Modelo hipotético de cómo Clv3 y el receptor Clv1/Clv2 regulan la proliferación y/o diferenciación celular en el meristemo de los brotes. (A) Las células de la capa externa del meristemo (*rosa*) secretan la proteína Clv3, que se une a la proteína del receptor Clv1/Clv2 de las células diana situadas en una región adyacente, más central del meristemo (*verde*), y estimula la diferenciación de las células diana. (B) Algunas partes de la vía de señalización intracelular activada por la unión de Clv3. Parece que la proteína receptora CLV es un homodímero o un heterodímero, que se autofosforila en residuos serina y treonina, activando así el receptor y conduciendo a la activación de una GTPasa de tipo Rho. La vía de señalización después de este punto no está clara, pero conduce a la inactivación de una proteína reguladora de la expresión génica en el núcleo que bloquea la transcripción de genes que podrían inhibir la diferenciación. La fosfatasa desfosforila el receptor, que de ese modo regula negativamente la vía de señalización.

de genes en el núcleo y, por tanto, la transcripción específica de algunos genes. Las plantas mutantes que son deficientes en el receptor quinasa Bri1 son insensibles a los brasinosteroides, por lo que son matas.

Los receptores quinasa LRR son sólo una de las muchas clases de receptores transmembrana serina/treonina quinasa de plantas. Al menos existen seis familias adicionales, cada una de las cuales tiene su propio conjunto característico de dominios extracelulares. Por ejemplo, las *quinasas receptoras de lectina* tienen dominios extracelulares que unen moléculas señal tipo carbohidrato. El genoma de *Arabidopsis* codifica más de 300 receptores serina/treonina quinasa, lo que hace de ellos la mayor familia de receptores conocida en plantas. Muchos de ellos están implicados en respuestas de defensa frente a patógenos.

El etileno bloquea la degradación de proteínas reguladoras de genes específicas en el núcleo

Varios **reguladores del crecimiento** (también llamados **hormonas vegetales**) contribuyen a coordinar el desarrollo de las planta. Entre ellos se incluyen el *etileno*, la *auxina*, las *citoquininas*, las *giberelinas*, el *ácido abscísico* así como los brasinosteroides. Todos los reguladores de crecimiento son pequeñas moléculas producidas por la mayoría de las células de la planta. Difunden fácilmente a través de las paredes celulares y pueden actuar de forma local o ser transportadas influenciando células lejanas. Cada regulador de crecimiento puede tener varios efectos. El efecto específico dependerá de las condiciones ambientales, del estado nutricional de la planta, de la capacidad de respuesta de la célula diana y de los otros reguladores de crecimiento que estén actuando.

Un ejemplo importante es el **etileno**. Esta pequeña molécula gaseosa (**Figura 15–84**A) puede afectar el desarrollo de la planta de varias maneras; puede por ejemplo estimular la maduración de los frutos, la abscisión de la hoja y la senescencia de la planta. También actúa como una señal de estrés en respuesta a heridas, infecciones, inundación, etcétera. Por ejemplo, cuando el brote de una semilla germinada encuentra un obstáculo, como una piedra enterrada en el suelo, la semilla responde de tres maneras. Primero, engrosa su tallo, el cual puede luego ejercer más fuerza sobre el obstáculo. Segundo, acoraza la punta del brote incrementando la curvatura de una estructura especializada en forma de gancho. Tercero, disminuye la tendencia del brote a crecer alejándose de la dirección de la gravedad evitando así el obstáculo. Esta *triple respuesta* está controlada por el etileno (Figura 15–84B y C).

Las plantas tienen varios receptores de etileno, que están localizados en el retículo endoplasmático y que están relacionados estructuralmente entre sí. Son proteínas transmembrana de multipaso, diméricas, con un dominio de unión a etileno que tiene un átomo de cobre y un dominio que interactúa con una proteína denominada *CTR1* cuya secuencia está relacionada con la Raf MAP-quinasa-quinasa-quinasa de la que hemos tratado

(véase Figura 15–60). La función de CTR1 en la vía de señalización de etileno depende de su actividad serina/treonina quinasa y de la asociación de su dominio N-terminal con los receptores de etileno. De forma sorprendente, son los receptores vacíos los que son activos y mantienen activa a CTR1. Mediante un mecanismo de señalización desconocido, CTR1 activa, estimula la ubiquitinización y la degradación en proteosomas de una proteína nuclear reguladora de genes denominada *EIN3*, necesaria para la transcripción de los genes que responden a etileno. De esta manera, los receptores vacíos, pero activos y CTR1 activa mantienen desactivados los genes que responden a etileno. La proteína EIN recibe su nombre del descubrimiento de que las plantas que presentan mutaciones que inactivan el gen que codifica esta proteína son insensibles al etileno (***e**thylene **in**sensitive*).

La unión de etileno inactiva el receptor alterando su conformación de forma que ya no se puede unir a CTR1. Como resultado de ello, CTR1 es inactivada y la vía de señalización corriente abajo que emana de ella queda bloqueada; la proteína EIN3 ya no se ubiquitiniza ni por tanto se degrada, de forma que ahora puede activar la transcripción de un gran número de genes que responden al etileno (**Figura 15–85**).

Una estrategia algo diferente participa en la regulación de los genes que responden a *auxina*. Además, el sistema a través del cual la auxina controla el sentido y el patrón del crecimiento de la planta es diferente a cualquier mecanismo observado en animales, como se tratará a continuación.



Figura 15–84 La triple respuesta mediada por el etileno, que se produce cuando el brote en crecimiento de una semilla en germinación encuentra un obstáculo enterrado. (A) Estructura del etileno. (B) Antes de que se produzca el encuentro con el obstáculo, el brote crece recto y es largo y fino. (C) Después del encuentro, el brote se engruesa y el gancho protector (en la parte superior) incrementa su curvatura para proteger la punta del brote. Ésta también altera su dirección de crecimiento para crecer alrededor del obstáculo. (Cortesía de Melanie Webb.)

La localización regulada de los transportadores de auxina determina el crecimiento de la planta

La hormona vegetal **auxina**, un indol-3-ácido acético (**Figura 15–86**A), se une a proteínas receptoras del núcleo. Colabora en el crecimiento de la planta hacia la luz y hacia arriba en lugar de hacia un lado y en el crecimiento de la raíz hacia abajo. También regula la iniciación y el posicionamiento de los órganos y ayuda a la planta a que florezca y dé frutos. Como el

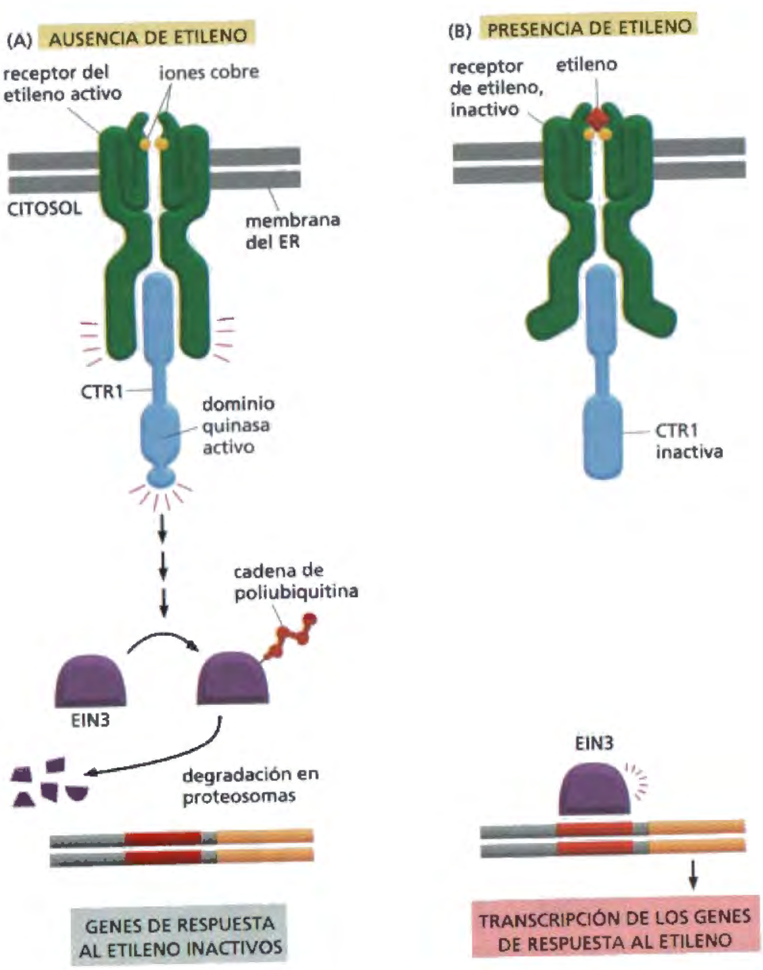


Figura 15–85 Visión actual de la vía de señalización del etileno. (A) En ausencia de etileno tanto el receptor como CTR1 son activos causando la ubiquitinización y destrucción de la proteína EIN3, la proteína del núcleo reguladora de genes que es responsable de la transcripción de los genes de respuesta al etileno. (B) La unión de etileno inactiva a los receptores y rompe la interacción entre los receptores y CTR1. Ahora la proteína EIN3 no es degradada, por lo que puede activar la transcripción de los genes de respuesta al etileno.

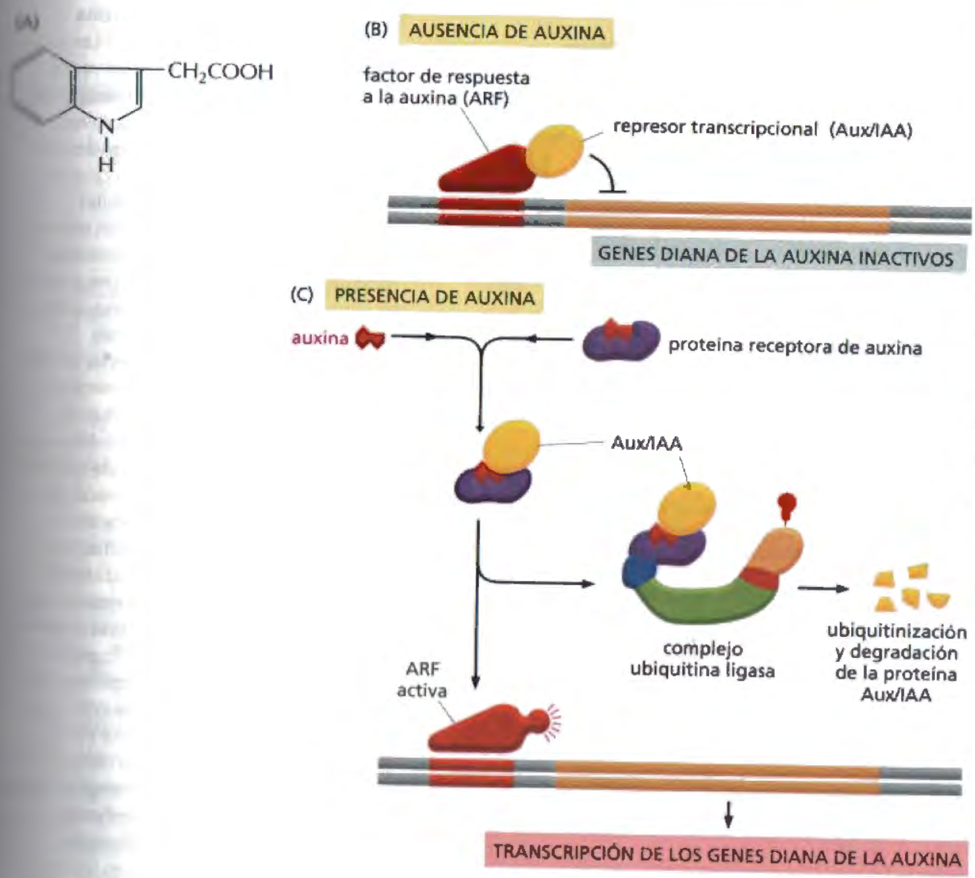


Figura 15–86 Vía de señalización de la auxina. (A) Estructura de la auxina, el ácido 3-indol acético. (B) En ausencia de auxina una proteína represora de la transcripción (llamada Aux/IAA) se une y suprime la actividad de una proteína reguladora de genes (llamada ARF: *auxin-response factor*; factor de respuesta a la auxina), que es necesario para la transcripción de los genes de respuesta a la auxina. (C) Las proteínas receptoras de la auxina están localizadas principalmente en el núcleo y forman parte del complejo ubiquitina ligasa (no se muestra). Cuando el receptor es activado por la unión de la auxina, el complejo receptor-auxina recluta los complejos ubiquitina ligasa que ubiquitinizan las proteínas Aux/IAA, marcándolas para su degradación en proteosomas. Ahora ARF queda libre para activar la transcripción de los genes de respuesta a la auxina. Existen muchas proteínas ARF, AUX/IAA y receptores de auxina que actúan, como ilustra esta figura.

...deno, modifica la expresión génica controlando la degradación de proteínas reguladoras de genes en el núcleo, pero en lugar de bloquear la ubiquitinización y degradación de proteínas reguladoras de genes necesarias para la expresión de genes diana, estimula la ubiquitinización y degradación de proteínas represoras que en las células no estimuladas bloquean la transcripción de estos genes (Figura 15–86B y C).

La auxina es única en la manera en que es transportada. A diferencia de las hormonas animales, que por lo general son secretadas por un órgano endocrino específico y son transportadas hasta las células diana por el sistema circulatorio, las auxinas tienen su propio sistema de transporte. Unas proteínas unidas a la membrana plasmática que son específicas de *transporte de influjo* y de *transporte de eflujo*, desplazan la auxina hacia adentro y hacia fuera de las células vegetales, respectivamente. Diferentes familias de genes codifican los transportes de influjo y de eflujo, y ambas familias de proteínas están reguladas de forma independiente. Los transportes de eflujo están compuestos por *proteínas Pin* y las células pueden distribuirlos de forma asimétrica en la membrana plasmática para conseguir que el eflujo de auxina sea direccional. Por ejemplo, una columna de células que tengan sus transportadores de eflujo de auxina confinados en la membrana plasmática basal, transportará la auxina desde la parte superior de la planta hasta la parte inferior.

En algunas regiones de la planta, la localización de los transportadores de auxina y, por tanto, el sentido del flujo de auxina, es muy dinámica y regulada. Una célula puede redistribuir con rapidez los transportadores controlando el tráfico de las vesículas que los contienen. Por ejemplo, los transportadores de eflujo de auxina se reciclan entre las vesículas intracelulares y la membrana plasmática. Una célula puede redistribuir estos transportadores sobre su superficie, inhibiendo su endocitosis en un dominio de la membrana plasmática, y acumularlos. Un ejemplo de este proceso se produce en la raíz, donde la gravedad afecta el sentido del crecimiento. Normalmente, los transportadores de eflujo de auxina están distribuidos de forma simétrica en la cabeza de la raíz. Sin embargo, en cuestión de minutos, tras un cambio en el vector de sentido de la gravedad, los transportadores de eflujo se redistribuyen a un lado de las células de forma que la auxina será bombeada hacia el lado de la raíz que apunta hacia abajo. Dado que la auxina inhibe la elongación de las células de la raíz, este redireccionamiento de los transportadores de auxina hace que la punta de la raíz se oriente y vuelva a crecer hacia abajo (**Figura 15–87**).

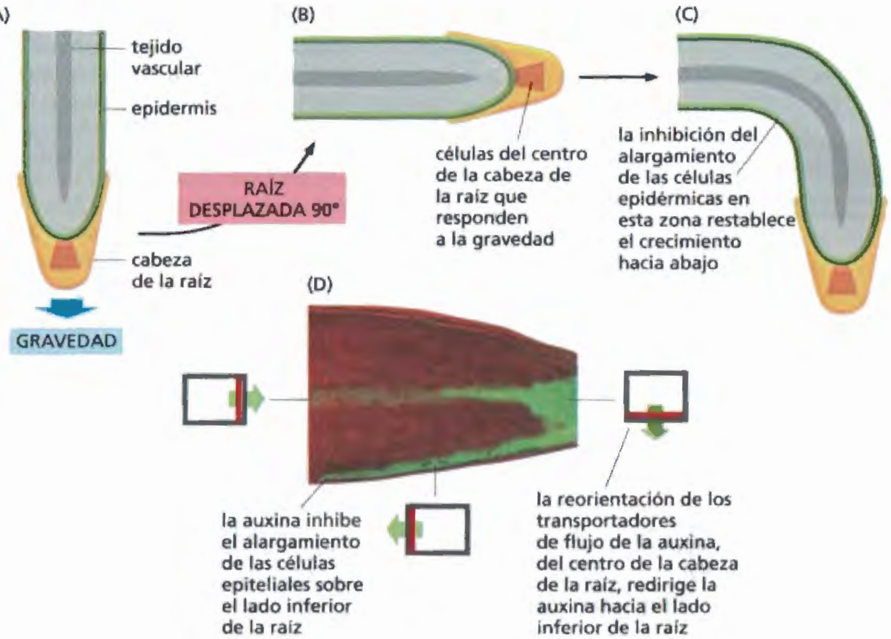


Figura 15–87 El transporte de auxina y el gravitropismo de la raíz. (A-C) Las raíces responden a un cambio de 90° del vector de gravedad y ajustan su nuevo sentido de crecimiento de forma que de nuevo apunte hacia abajo. Las células que responden a la gravedad están en el centro de la cabeza de la raíz mientras que son las células epidérmicas, situadas más atrás (en el lado inferior), las que disminuyen su velocidad de elongación para recuperar el crecimiento hacia abajo. (D) Las células que responden a la gravedad de la cabeza de la raíz redistribuyen los transportadores de eflujo de auxina en respuesta al desplazamiento de la raíz. Este hecho redirige el flujo de auxina principalmente a la parte inferior de la raíz que ha sido desplazada, donde inhibe la elongación de las células epidérmicas. Se muestra la distribución asimétrica de la auxina resultante en una raíz de *Arabidopsis*; la auxina ha sido detectada directamente utilizando un gen reportero de respuesta a la auxina que codifica una proteína unida a la proteína fluorescente verde (GFP: *green fluorescent protein*); las células epidérmicas del lado inferior de la raíz son de color verde mientras que las del lado superior no lo son, lo cual refleja la distribución asimétrica de la auxina. La distribución de los transportadores de eflujo de la auxina en la membrana plasmática de las células de diferentes regiones de la raíz (se muestra en *rectángulos grises*) se indican en *rojo* y el sentido del eflujo de auxina en *flechas verdes*. (Las fotografías de fluorescencia de D son de T. Paciorek et al., *Nature* 435:1251-1256, 2005. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

En los meristemos apicales de las yemas, la distribución de transportadores de eflujo de auxina también es dinámica y está regulada. En este caso, el transporte direccional de la auxina ayuda a determinar la distribución regular de las hojas y de las flores (véase Figura 22–122).

Los fitocromos detectan luz roja y los criptocromos detectan luz azul

El desarrollo de las plantas está muy influenciado por las condiciones ambientales. A diferencia de los animales, las plantas no pueden desplazarse cuando las condiciones se vuelven desfavorables; tienen que adaptarse o morirán. La influencia ambiental más importante sobre las plantas es la luz, que es su fuente de energía y tiene un papel principal a lo largo de todo su ciclo vital –desde la germinación, a través del desarrollo de la plántula, hasta la floración y la senescencia. Las plantas han desarrollado un gran conjunto de proteínas sensibles a la luz que detectan la cantidad, la calidad, la dirección y la duración de la luz. A estas proteínas se les denomina *fotorreceptores*. Sin embargo, dado que el término fotorreceptor también se utiliza para las células sensibles a la luz de la retina de los animales (véase Figura 15–48), utilizaremos el término *fotoproteína* de forma alternativa.

Todas las fotoproteínas detectan la luz gracias a un cromóforo ligado covalentemente que absorbe la luz, que cambia su forma en respuesta a la luz y luego induce un cambio en la conformación de la proteína.

Las fotoproteínas vegetales mejor conocidas son los **fitocromos**, que están presentes en todas las plantas y en algunas algas, pero ausentes en los animales. Son serinas/treoninas quinasa diméricas y citoplasmáticas que responden de manera diferencial y reversible a la luz roja y rojo-lejana: mientras que normalmente la luz roja activa la actividad quinasa del fitocromo, la luz rojo-lejana la inactiva. Parece que cuando se activa por la luz roja, el fitocromo se autofosforila y luego fosforila a una o más proteínas adicionales de la célula. En algunas respuestas a la luz, el fitocromo activado se transloca al núcleo, donde activa proteínas reguladoras de la expresión génica alterando la transcripción génica (**Figura 15–88**). En otros casos, el fitocromo activado activa una proteína latente reguladora de la expresión génica del citoplasma, la cual se translocará al núcleo donde regulará la transcripción génica. En otros casos, la fotoproteína desencadena vías de señalización en el citosol que modifican el comportamiento de la célula sin la participación del núcleo.

A pesar de que los fitocromos tienen actividad serina/treonina quinasa, parte de su estructura es parecida a las histidinas quinasa implicadas en la quimiotaxis bacteriana descrita. Este hallazgo sugiere que los fitocromos vegetales evolucionaron a partir de las histidinas quinasa bacterianas y más tarde cambiaron su especificidad de sustrato de histidina a serina y treonina.

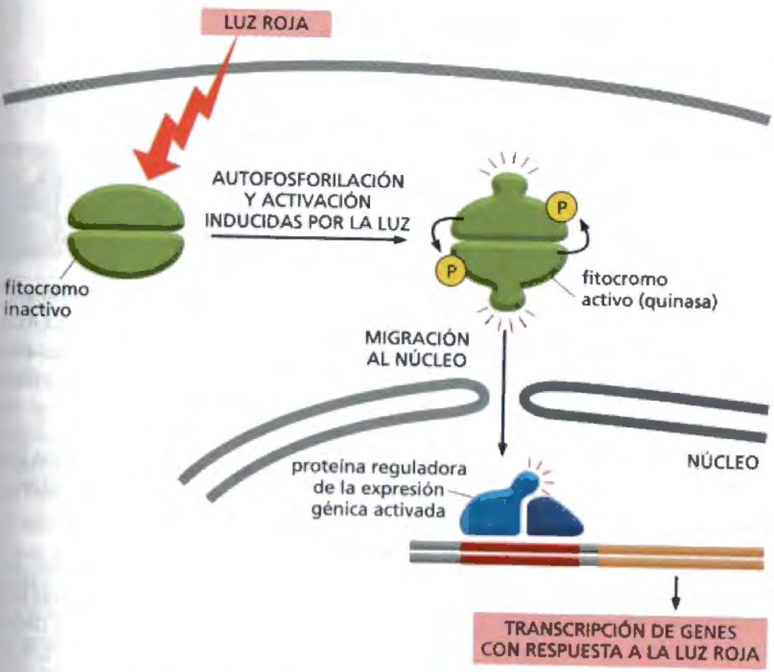


Figura 15–88 Visión actual de una vía a través de la cual los fitocromos median una respuesta a la luz en células de vegetales. Cuando el fitocromo, que es una proteína quinasa dimérica, es activado por la luz roja, se autofosforila y se desplaza hacia el núcleo, donde activa proteínas reguladoras de la expresión génica y estimula el proceso de transcripción de genes de respuesta a la luz roja.

Las plantas detectan la luz azul utilizando fotoproteínas de otros dos tipos: la fototropina y los criptocromos. La **fototropina** está asociada a la membrana plasmática y es parcialmente responsable del *fototropismo*, la tendencia de las plantas a crecer hacia la luz. El fototropismo se produce por elongación celular direccional estimulada por la auxina, aunque las conexiones entre la fototropina y la auxina no se conocen.

Los **criptocromos** son flavoproteínas sensibles a la luz azul. Están relacionados desde un punto de vista estructural con las enzimas sensibles a la luz azul llamadas *fotoliasas*, que están implicadas en la reparación del daño del DNA inducido por luz ultravioleta en todos los organismos excepto en la mayoría de los mamíferos. A diferencia de los fitocromos, los criptocromos también se encuentran en animales, donde desempeñan un papel importante en la regulación de los relojes circadianos que actúan en la mayoría de las células y ciclan con un ritmo de 24 horas (se expone con más detalle en el Capítulo 7). A pesar de que se cree que los criptocromos han evolucionado a partir de las fotoliasas, no tienen actividad de reparación del DNA.

En este capítulo se ha explicado cómo las señales extracelulares influencian el comportamiento celular. Una diana intracelular crucial para esas señales es el citoesqueleto, que determina la forma celular y es responsable del movimiento celular, como se expone en el capítulo siguiente.

Resumen

Se cree que en las plantas y los animales, la pluricelularidad y los mecanismos de comunicación celular han evolucionado de forma independiente, partiendo en cada caso de un organismo eucariota unicelular diferente que, a su vez, había evolucionado de un ancestro eucariota unicelular común. Por ello no es de extrañar que los mecanismos utilizados para la señalización entre células de animales y en plantas tengan similitudes y diferencias. Por ejemplo, mientras que los animales utilizan sobre todo receptores GPCR, las plantas utilizan mayoritariamente receptores acoplados a enzimas del tipo de receptores serina/treonina quinasa, especialmente unos con secuencias repetidas ricas en leucina extracelulares. Varias hormonas vegetales o reguladores del crecimiento, entre los que se encuentra el etileno y la auxina, ayudan a coordinar el desarrollo de la planta. El etileno actúa a través de receptores intracelulares parando la degradación de proteínas nucleares reguladoras de genes, las cuales entonces pueden activar la transcripción de genes de respuesta al etileno. Los receptores de otras hormonas vegetales, incluyendo la auxina, también regulan la degradación de determinadas proteínas reguladoras de genes, aunque los detalles entre estas respuestas varían. La auxina señaliza de una forma nada habitual, ya que tiene su propio sistema de transporte, altamente regulado, en el que el posicionamiento dinámico de transportadores de auxina, unidos a membrana plasmática, controlan el sentido del flujo de auxina y, por tanto, el sentido del creci-

miento de la planta. La luz desempeña un importante papel en la regulación del desarrollo vegetal. Estas respuestas a la luz están mediadas por varias fotoproteínas sensibles a la luz, entre las que se encuentran los fitocromos, que responden a la luz roja, y los criptocromos y la fototropina, que son sensibles a la luz azul.

PROBLEMAS

¿Qué afirmaciones son ciertas? Explica por qué sí o por qué no

15–1 Todos los receptores que participan en la señalización paracrina, sináptica y endocrina tienen la misma afinidad por sus respectivas moléculas ligando.

15–2 Todos los mediadores intracelulares pequeños (segundos mensajeros) son solubles en agua y difunden libremente por el citosol.

15–3 En la regulación de los interruptores moleculares, siempre las proteína quinasa y los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF) activan las proteínas mientras que las proteínas fosfatasa y las proteínas activadoras de las GTPasa (GAP) siempre inactivan las proteínas.

15–4 En contraste con las vías de señalización más directas utilizadas por los receptores nucleares, las cascadas catalíticas de mediadores intracelulares proporcionan numerosas posibilidades de amplificación de la respuesta a señales extracelulares.

15–5 La unión de ligandos extracelulares a receptores tirosina quinasa activa dominios catalíticos intracelulares del mismo receptor mediante la propagación de cambios de conformación a través de la bicapa lipídica mediante una sola hélice α transmembrana.

15–6 Las proteínas tirosina fosfatasa muestran una especificidad exquisita por sus sustratos, mientras que las proteínas serina/treonina fosfatasa tienen una especificidad muy amplia.

15–7 A pesar de que parece que las plantas y los animales han evolucionado a organismos pluricelulares de forma independiente, en su comunicación célula a célula utilizan prácticamente las mismas proteínas señalizadoras y los mismos segundos mensajeros.

Resolver los siguientes problemas

15–8 Suponer que la concentración de una hormona circulantes es de 10^{-10} M y que la K_d de la unión de esta hormona a su receptor es de 10^{-8} M. ¿Qué porcentaje de los receptores estarán unidos a una hormona? Si cuando el 50% de los receptores están unidos a una hormona no se produce ninguna respuesta fisiológica significativa, ¿cuánto tiene que aumentar la concentración de la hormona para provocar una respuesta? El porcentaje de receptores (R) unidos a una hormona (H) formando un complejo hormona-receptor (R-H) es $[R\text{-}H]/([R] + [R\text{-}H]) = [R\text{-}H]/[R]_{TOT} = [H]/([H] + K_d)$.

15–9 Las células se comunican de maneras que se parecen a las comunicaciones humanas. Decidir cuáles de las siguientes maneras de comunicación humana son análogas a señalización celular autocrina, paracrina, endocrina y sináptica.

A. Una conversación telefónica
B. Hablar con la gente en una fiesta
C. Un anuncio por radio
D. Hablar consigo mismo

15–10 ¿Por qué las respuestas a señales en las que particip[...] cambios en proteínas que ya están presentes en la célula se pr[...]ducen en cuestión de milisegundos mientras que las respuest[...] que requieren cambios en la expresión de genes requieren ent[...] minutos y horas?

15–11 ¿A qué se debe que células diferentes pueden respond[...] de manera diferente a la misma molécula señalizadora, inclu[...] cuando estas células tienen los mismos receptores?

15–12 ¿Por qué la fosforilación/desfosforilación, de form[...] opuesta por ejemplo a la unión alostérica de pequeñas molécul[...] ha evolucionado en el sentido de tener un papel tan determina[...]te en la activación e inhibición de proteínas en las vías de señal[...]zación?

15–13 Considerar una vía de señalización que se produce a tr[...]vés de tres proteínas quinasa, las cuales se activan de forma se[...]cuencial por fosforilación. En un caso, las quinasas están unid[...] formando un complejo señalizador mediante una proteína de a[...]mazón; en el otro caso, las quinasas difunden libremente (Figura P15–1). Analizar las propiedades de estos dos tipos de organizació[...] en términos de amplificación de la señal, velocidad y potencial de entrecruzamiento entre las vías de señalización.

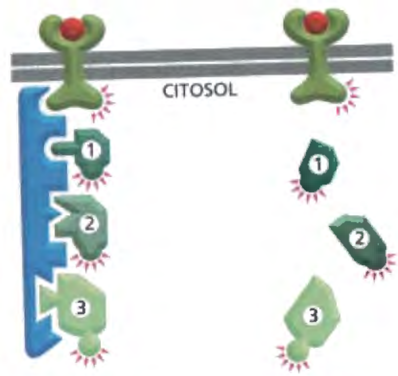


Figura P15–1 Una cascada de proteínas quinasa organizada por una proteína de armazón o compuesta por componentes que difunden libremente (Problema 15–13).

15–14 Describir tres vías en las cuales un incremento gradual [...] la señal extracelular se pueda transformar en una respuesta ce[...]lar abrupta o de todo o nada.

15–15 La activación ("maduración") de los oocitos de rana [...] señalizada a través de un módulo de señalización MAP-quin[...] Un incremento de la concentración de la hormona progeste[...] dispara el módulo estimulando la traducción de mRNA de M[...] que es la MAP-quinasa-quinasa-quinasa de rana (Figura P15[...] Resulta sencillo seguir el grado de maduración debido a la ap[...]ción de una mancha blanca en medio de la superficie marrón [...]



Figura P15–2 La activación de la MAP-quinasa por progesterona conduce a la maduración del oocito (Problema 15–15). (Por cortesía de Helfrid Hochegger.)

oocito (véase Figura P15–2). Para determinar la curva dosis/respuesta de la activación de la MAP-quinasa inducida por progesterona, se colocan 16 oocitos en cada una de seis placas de plástico y se añaden diferentes concentraciones de progesterona. Tras una noche de incubación se rompen los oocitos para preparar un extracto de ellos y determinar el estado de fosforilación de la MAP-quinasa (en este caso, activación) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (**Figura P15–3A**). Este análisis muestra una respuesta gradual de la MAP-quinasa a concentraciones crecientes de progesterona.

Antes de haber roto los oocitos, se observa que no todos los de cada placa tienen la mancha blanca. ¿Es posible que algunos oocitos hayan sufrido una activación parcial y todavía no hayan alcanzado el estado de la mancha blanca? Para responder a esta cuestión se repite el experimento pero esta vez se analiza la activación de la MAP-quinasa en cada oocito individualmente. De forma sorprendente, cada oocito tiene una MAP-quinasa activa o inactiva por completo (Figura P15–3B). ¿De qué forma una respuesta individual de todo o nada da lugar a una respuesta gradual de la población?

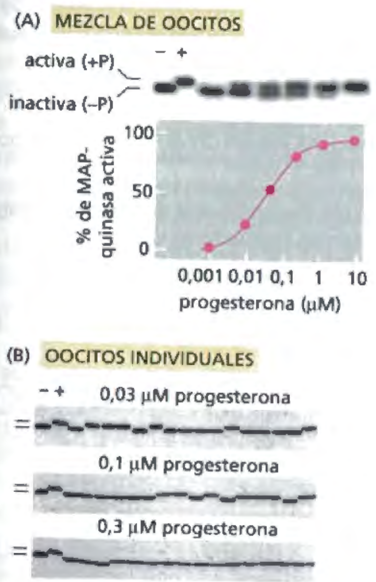


Figura P15–3 Activación de oocitos de rana (Problema 15–15). (A) Fosforilación de la MAP-quinasa en una mezcla de oocitos. (B) Fosforilación de la MAP-quinasa en oocitos individuales. La MAP-quinasa se detectó por análisis inmunológico utilizando un anticuerpo específico de MAP-quinasa. Los dos primeros carriles de cada gel contienen MAP-quinasa no-fosforilada, inactiva (–) y MAP-quinasa fosforilada activa (+). (De J.E. Ferrel Jr y E.M. Machleder, *Science* 280: 895-898, 1998. Con la autorización de la AAAS.)

15–16 Proponer tipos específicos de maduración del gen para la subunidad reguladora de la PKA que puedan conducir a una activación permanente o a una inactivación de la PKA.

15–17 La fosforilasa quinasa integra señales procedentes de vías de señalización dependientes de AMP cíclico o dependientes de Ca^{2+} que controlan la degradación de glucógeno en las células del hígado y del músculo (**Figura P15–4**). La fosforilasa quinasa está compuesta por cuatro subunidades. Una es la proteína quinasa que cataliza la adición del fosfato a la glucógeno fosforilasa, activándola para la degradación del glucógeno. Las otras tres subunidades son proteínas reguladoras que controlan la actividad de la subunidad catalítica. Dos de ellas tienen sitios que se fosforilan por la PKA, la cual es activada por AMP cíclico. La otra subunidad es la calmodulina, que se une a Ca^{2+} cuando la concentración citosólica aumenta. Las subunidades reguladoras controlan el equilibrio entre las conformaciones activa e inactiva de la subunidad catalítica. ¿De qué forma esta distribución permite a la fosforilasa quinasa actuar como un interruptor para las diferentes vías que estimulan la degradación de glucógeno?

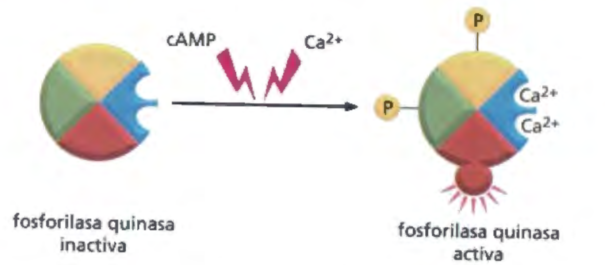


Figura P15–4 Integración de las vías de señalización dependiente de AMP cíclico (cAMP) y dependiente de Ca^{2+} por la fosforilasa quinasa en las células musculares y las células hepáticas (Problema 15–17).

15–18 En principio se puede aumentar la forma de Ras unida a GTP y, por tanto, activada, activando un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) o inactivando una proteína activadora de la GTPasa (GAP). ¿Por qué las vías de señalización mediadas por Ras siempre incrementan Ras-GTP a través de la activación de GEF y no de la inactivación de GAP?

15–19 La vía de señalización de la polaridad planar de Wnt asegura normalmente que cada célula del ala de una *Drosophila* tenga un solo pelo. La sobreexpresión del gen *Frizzled* producida por un promotor de estrés térmico (hs-*Fz*) hace que muchas células tengan varios pelos (**Figura P15–5A**). Este fenotipo es suprimido si hs-*Fz* se combina con una deleción heterozigota (Dsh^{Δ}) del gen *Dishevelled* (Figura P15–5B). ¿Estos resultados permiten ordenar la acción de Frizzled y de Dishevelled en la vía de señalización? Si es así, ¿cuál es el orden? Explicar el razonamiento.

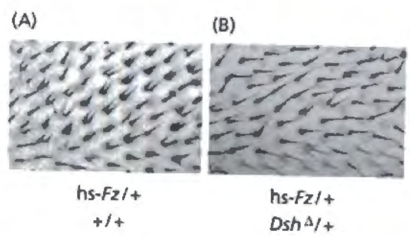


Figura P15–5 Patrón de crecimiento de pelos sobre células de ala en dos *Drosophila* genéticamente diferentes (Problema 15–19). (De C.G. Winter et al., *Cell* 105: 81-91, 2001. Con la autorización de Elsevier.)

BIBLIOGRAFÍA

General

Bradshaw RA & Dennis EA (eds) (2003) Handbook of Cell Signaling. Elsevier: St Louis.

Science's Signal Transduction Knowledge Environment (Stke): www.stke.org

Principios generales de la comunicación celular

Ben-Shlomo I, Yu Hsu S, Rauch R et al (2003) Signaling receptome: a genomic and evolutionary perspective of plasma membrane receptors involved in signal transduction. *Sci STKE* 187:RE9.

Bourne HR (1995) GTPases: a family of molecular switches and clocks. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 349:283–289.

Ferrell JE Jr (2002) Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability. *Curr Opin Cell Biol* 14:140–148.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M et al (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835–839.

Murad F (2006) Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med* 355:2003–2011.

Papin JA, Hunter T, Palsson BO & Subramaniam S (2005) Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. *Nature Rev Mol Cell Biol* 6:99–111.

Pawson T & Scott JD (2005) Protein phosphorylation in signaling—50 years and counting. *Trends Biochem Sci* 30:286–290.

Pires-daSilva A & Sommer RJ (2003) The evolution of signalling pathways in animal development. *Nature Rev Genet* 4:39–49.

Robinson-Rechavi M, Escriva Garcia H & Laudet V (2003) The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci* 116:585–586.

Seet BT, Dikic I, Zhou MM & Pawson T (2006) Reading protein modifications with interaction domains. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:473–483.

Singla V & Reiter JF (2006) The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* 313:629–633.

Señalización a través de receptores de superficie celular asociados a proteínas G (GPCR) y mediadores intracelulares pequeños

Berridge MJ (2005) Unlocking the secrets of cell signaling. *Annu Rev Physiol* 67:1–21.

Berridge MJ, Bootman MD & Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4:517–529.

Breer H (2003) Sense of smell: recognition and transduction of olfactory signals. *Biochem Soc Trans* 31:113–116.

Burns ME & Baylor DA (2001) Activation, deactivation, and adaptation in vertebrate photoreceptor cells. *Annu Rev Neurosci* 24:779–805.

Cooper DM (2005) Compartmentalization of adenylate cyclase and cAMP signalling. *Biochem Soc Trans* 33:1319–1322.

Hoeflich KP & Ikura M (2002) Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell* 108:739–742.

Hudmon A & Schulman H (2002) Structure-function of the multifunctional Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* 364:593–611.

Kamenetsky M, Middelhaufe S, Bank EM et al (2006) Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. *J Mol Biol* 362:623–639.

Luttrell LM (2006) Transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Methods Mol Biol* 332:3–49.

McConnachie G, Langeberg LK & Scott JD (2006) AKAP signaling complexes: getting to the heart of the matter. *Trends Mol Med* 12:317–323.

Parker PJ (2004) The ubiquitous phosphoinositides. *Biochem Soc Trans* 32:893–898.

Pierce KL, Premont RT & Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3:639–650.

Reiter E & Lefkowitz RJ (2006) GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* 17:159–165.

Rhee SG (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* 70:281–312.

Robishaw JD & Berlot CH (2004) Translating G protein subunit diversity into functional specificity. *Curr Opin Cell Biol* 16:206–209.

Shaywitz AJ & Greenberg ME (1999) CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68:821–861.

Señalización a través de receptores de superficie celular asociados a enzimas

Baker MD, Wolanin PM & Stock JB (2006) Signal transduction in bacterial chemotaxis. *BioEssays* 28:9–22.

Dard N & Peter M (2006) Scaffold proteins in MAP kinase signaling: more than simple passive activating platforms. *BioEssays* 28:146–156.

Darnell JE Jr, Kerr IM & Stark GR (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264:1415–1421.

Downward J (2004) PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol* 15:177–182.

Jaffe AB & Hall A (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:247–269.

Massague J & Gomis RR (2006) The logic of TGFβ signaling. *FEBS Lett* 580:2811–2820.

Mitin N, Rossman KL & Der CJ (2005) Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr Biol* 15:R563–574.

Murai KK & Pasquale EB (2003) Eph'ective signalling: forward, reverse and crosstalk. *J Cell Sci* 116:2823–2832.

Pawson T (2004) Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* 116:191–203.

Qi M & Elion EA (2005) MAP kinase pathways. *J Cell Sci* 118:3569–3572.

Rawlings JS, Rosler KM & Harrison DA (2004) The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117:1281–1283.

Roskoski R Jr (2004) Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 324:1155–1164.

Schlessinger J (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211–225.

Sahin M, Greer PL, Lin MZ et al (2005) Eph-dependent tyrosine phosphorylation of ephexin1 modulates growth cone collapse. *Neuron* 46:191–204.

Schwartz MA & Madhani HD (2004) Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 38:725–748.

Shaw RJ & Cantley LC (2006) Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 44:424–430.

Wassarman DA, Therrien M & Rubin GM (1995) The Ras signalling pathway in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* 5:44–50.

Wullschleger S, Loewith R & Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124:471–484.

Vías de señalización dependientes de proteolisis regulada por proteínas latentes reguladoras de genes

Bray SJ (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:678–689.

Clevers H (2006) Wntβ-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127:469–480.

Hoffmann A & Baltimore D (2006) Circuitry of nuclear factor κB signaling. *Immunol Rev* 210:171–186.

Huangfu D & Anderson KV (2006) Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates. *Development* 133:3–14.

Señalización en plantas

Benavente LM & Alonso JM (2006) Molecular mechanisms of ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Mol Biosyst* 2:165–173.

Chen M, Chory J & Fankhauser C (2004) Light signal transduction in higher plants. *Annu Rev Genet* 38:87–117.

Dievart A & Clark SE (2004) LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development* 131:251–261.

Teale WD, Paponov IA & Palme K (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:847–859.

16
El citoesqueleto

Para que las células funcionen tienen que organizarse espacialmente e interaccionar de forma mecánica con su entorno. Deben disponer de una morfología correcta, ser físicamente resistentes y poseer una estructura interna adecuada. Muchas de ellas tienen que sufrir cambios de forma y desplazarse de un lugar a otro. Todas las células tienen que reordenar sus componentes internos al crecer, dividirse o adaptarse a las circunstancias que cambian. Las células eucariotas han adquirido un gran desarrollo de todas estas funciones espaciales y mecánicas que dependen de un sistema de filamentos denominado **citoesqueleto** (**Figura 16–1**).

El citoesqueleto tira de los cromosomas durante la mitosis y después divide la célula en dos. Conduce y dirige el tráfico intracelular de orgánulos y transporta materiales desde un punto de la célula a otro. Sostiene la frágil membrana plasmática y proporciona el sostén mecánico que permite a la célula soportar el estrés sin ser destruida por los cambios ambientales. A algunas células, como los espermatozoides, les proporciona la capacidad de nadar, a otras, como por ejemplo fibroblastos y células blancas sanguíneas, la posibilidad de atravesar superficies. Otorga a las células musculares la maquinaria para la contracción muscular y permite a las neuronas extender los axones y dendritas. Dirige el crecimiento de la pared celular vegetal y controla la enorme diversidad de formas de las células eucariotas.

La gran variedad de funciones del citoesqueleto depende del comportamiento de tres familias de proteínas, que se ensamblan formando tres tipos principales de filamentos. Cada tipo de filamento presenta distintas propiedades mecánicas, distinta dinámica y distintos papeles y funciones biológicos, pero los tres tipos comparten ciertos principios fundamentales. Estos principios proporcionan la base para la comprensión general sobre cómo trabaja el citoesqueleto y cómo los distintos elementos cooperan entre sí. De la misma forma que nuestros ligamentos, huesos y músculos deben trabajar juntos, los tres sistemas de filamentos del citoesqueleto deben funcionar colectivamente para proporcionar a la célula su forma, su fuerza y su capacidad para moverse.

En este capítulo, describiremos los tres tipos principales de filamentos intermedios, los principios básicos que regulan su ensamblaje y desensamblaje, y sus peculiaridades individuales. Después se explicará cómo interactúan otras proteínas con los tres sistemas filamentosos principales, capacitando a las células para establecer y mantener un orden interno, para cambiar y remodelar su superficie, para desplazar orgánulos de una forma dirigida desde un punto a otro y, cuando sea preciso, desplazarse hacia nuevos destinos.

En este capítulo

EL AUTOENSAMBLAJE Y LA ESTRUCTURA DINÁMICA DE LOS FILAMENTOS DEL CITOESQUELETO 965

CÓMO REGULAN LAS CÉLULAS LOS FILAMENTOS DE SU CITOESQUELETO 992

MOTORES MOLECULARES 1010

EL CITOESQUELETO Y EL COMPORTAMIENTO CELULAR 1025

EL AUTOENSAMBLAJE Y LA ESTRUCTURA DINÁMICA DE LOS FILAMENTOS DEL CITOESQUELETO

La mayoría de las células eucariotas tienen tres tipos de filamentos del citoesqueleto que son responsables de su organización espacial y de sus propiedades mecánicas. Los *filamentos intermedios* proporcionan fuerza y resistencia al estrés mecánico. Los *microtúbulos* determinan las posiciones de los orgánulos rodeados de membrana y dirigen el transporte intracelular. Los *filamentos de actina* determinan la forma de la superficie celular y son necesarios para la locomoción. Pero estos filamentos del citoesqueleto no serían eficientes sin cientos de proteínas accesorias que unen los filamentos al resto de componentes celulares y entre sí. Este gran conjunto de *proteínas accesorias* es esencial para el ensamblaje controlado de los filamentos en localizaciones específicas e incluye a las *proteínas motoras*, maquinaria molecular que convierte la energía de la hidrólisis del ATP en fuerza mecánica que puede desplazar los orgánulos a lo largo de los filamentos o a los filamentos entre sí.

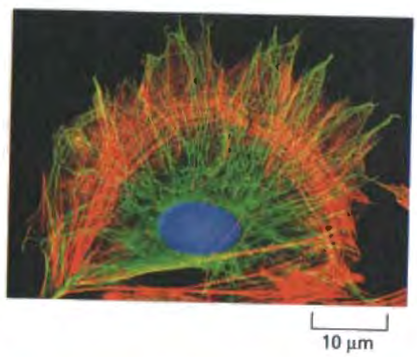


Figura 16–1 El citoesqueleto. Una célula en cultivo ha sido fijada y marcada para mostrar dos de los sistemas más importantes del citoesqueleto, los microtúbulos (*verde*) y los filamentos de actina (*rojo*). El DNA del núcleo se ha marcado en *azul*. (Por cortesía de Albert Tousson.)

En esta sección, se describirán las propiedades de las proteínas que forman los filamentos del citoesqueleto. Nos centraremos en su capacidad para la formación de estructuras autoorganizadas y polarizadas. Veremos cómo, debido a los singulares mecanismos que permiten el dinamismo de los filamentos del citoesqueleto, la célula es capaz de responder rápidamente a cualquier eventualidad que le pueda suceder.

Los filamentos del citoesqueleto son dinámicos y adaptables

Los sistemas del citoesqueleto son dinámicos y adaptables, organizados de forma más parecida a los rastros de las hormigas que a las grandes autopistas. El rastro de una hormiga puede perdurar horas y se extiende desde el hormiguero hasta la fuente de alimento, pero las hormigas no son estáticas dentro de la hilera. Si las hormigas buscadoras encuentran un nuevo lugar que es mejor para alimentarse, o las que se encuentran en ese lugar inicial lo limpian y se van, la estructura dinámica se reorganiza con una rapidez impresionante. De forma parecida, las grandes estructuras del citoesqueleto pueden cambiar o perdurar de acuerdo con las necesidades, de modo que subsisten durante periodos de tiempo que van desde menos de un minuto a la totalidad de la vida de la célula. Pero los componentes individuales que forman parte de estas estructuras están constantemente en un estado fluctuante. Así pues, igual que las alteraciones en las hileras que forman las hormigas, cuando las condiciones cambian, la reorganización celular estructural requiere energía adicional.

La regulación del comportamiento dinámico y del ensamblaje de los filamentos del citoesqueleto permite a las células eucariotas formar un conjunto enorme de estructuras a partir de los tres tipos de filamentos básicos. Las micrografías del **Panel 16–1** muestran algunas de estas estructuras. Los microtúbulos, que a menudo se encuentran dispuestos en forma de estrella en el citoplasma originándose a partir del centro de una célula en interfase, pueden reorganizarse con rapidez formando el *huso mitótico* bipolar durante la división celular. También pueden formar prolongaciones móviles en la superficie de la célula llamadas *cilios* y *flagelos*, o haces íntimamente alineados que actúan a modo de pista para el transporte de materiales a lo largo de los axones neuronales. En las células vegetales, las hileras organizadas de microtúbulos cooperan formando el patrón de síntesis de la pared celular.

Los filamentos de actina, que se encuentran por debajo de la membrana plasmática de las células animales, proporcionan fuerza y forma a su delgada capa lipídica. También pueden formar muchos tipos de prolongaciones citoplasmáticas en la superficie celular. Algunas de ellas son estructuras dinámicas, tales como los *filopodios* o *lamelipodios*, que las células utilizan para explorar el territorio y arrastrarse de un lugar a otro. El *anillo contráctil* de actina se ensambla de forma transitoria para dividir en dos a la célula; haces más estables permiten a las células adherirse a un sustrato subyacente y permitir la contracción muscular. Los haces regulares de *estereocilios*, en la superficie de las células epiteliales pilosas del oído interno, están formados por filamentos de actina estables que vibran como cuerdas rígidas en respuesta al sonido, y los *microvilli*, organizados de forma parecida en la superficie de las células epiteliales intestinales, aumentan el área superficial apical incrementando así la superficie de absorción de los nutrientes.

Los filamentos intermedios rodean la superficie interna de la envoltura nuclear, formando una red protectora para el DNA; en el citosol, se ensamblan generando rígidos cables que mantienen en oposición las capas de células epiteliales, ayudan a las neuronas a extender axones largos y compactos y permiten formar apéndices resistentes como cabellos y uñas.

Un ejemplo importante y espectacular de reorganización rápida del citoesqueleto se produce durante la división de la célula, como se muestra en la **Figura 16–2** para un fibroblasto creciendo en una placa de cultivo de tejidos. Después de la replicación de los cromosomas, el haz de microtúbulos en interfase que se extiende a lo largo del citoplasma se reconfigura formando el *huso mitótico* bipolar, que tiene la importante función de segregar de forma precisa las dos copias de cromosomas replicados en los dos núcleos hijos. Al mismo tiempo, las estructuras especializadas de actina que permiten a los fibroblastos arrastrarse a lo largo de la superficie de la placa se desensamblan y así la célula deja de desplazarse, se redondea y adquiere una forma más esférica. La actina y su proteína motora asociada miosina forman entonces un cinturón alrededor de la parte central, el *anillo contráctil*, que se constriñe igual que un músculo fino y divide a la célula en dos. Cuando ha finalizado la división, el citoesqueleto de los dos fibroblastos hijos se ensambla de nuevo en sus estructuras de interfase para convertir las dos células hijas esféricas en versiones más pequeñas de la célula madre extendida y reptante. En un fibroblasto, esta secuencia de acontecimientos dura alre-

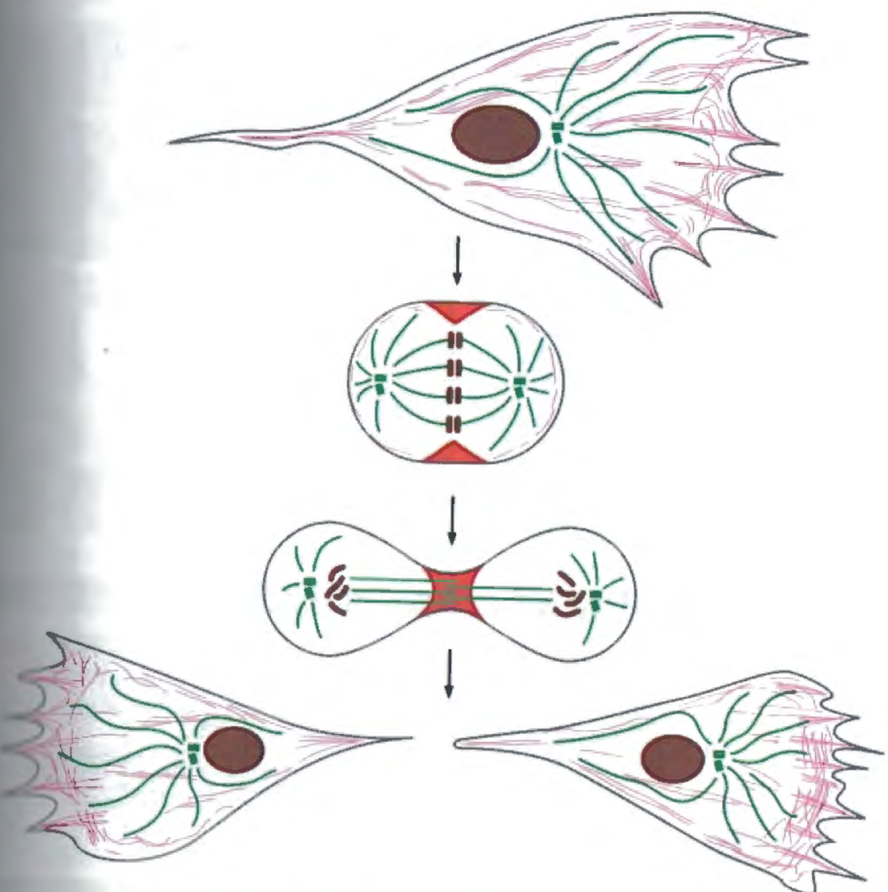


Figura 16–2 **Cambios rápidos de la organización del citoesqueleto asociados con la división celular.** El fibroblasto del esquema tiene un citoesqueleto de actina dinámico y polarizado (se muestra en *rojo*) que se ensambla empujando el extremo de avance hacia la derecha. El citoesqueleto de microtúbulos (se muestra en *verde*) ayuda a la polarización del citoesqueleto de actina y consiste en largos microtúbulos que irradian a partir de un centro organizador de microtúbulos localizado enfrente del núcleo. Cuando la célula se divide, el haz polarizado de microtúbulos se redistribuye formando el huso mitótico bipolar que es responsable del alineamiento y separación de los cromosomas duplicados (*marrón*). Los filamentos de actina forman un anillo contráctil en el centro de la célula que induce su división en dos células hijas después de la separación de los cromosomas. Una vez finalizada la división celular, las dos células hijas reorganizan ambos citoesqueletos, actina y microtúbulos, en versiones más reducidas que los de la célula madre, permitiéndoles adoptar sus formas independientes.

alrededor de una hora; en algunos casos, tales como las primeras divisiones nucleares del embrión de *Drosophila*, el citoesqueleto de actina y los microtúbulos pueden reorganizarse por completo en menos de cinco minutos (**Figura 16–3**).

Muchas células necesitan también reorganizaciones rápidas del citoesqueleto para su funcionamiento normal durante la interfase. Por ejemplo, el *neutrófilo*, un tipo de célula sanguínea de la línea blanca, persigue y engulle bacterias y hongos que accidentalmente han accedido a las partes del cuerpo, por lo general estériles, a través de cortes de la piel. Al igual

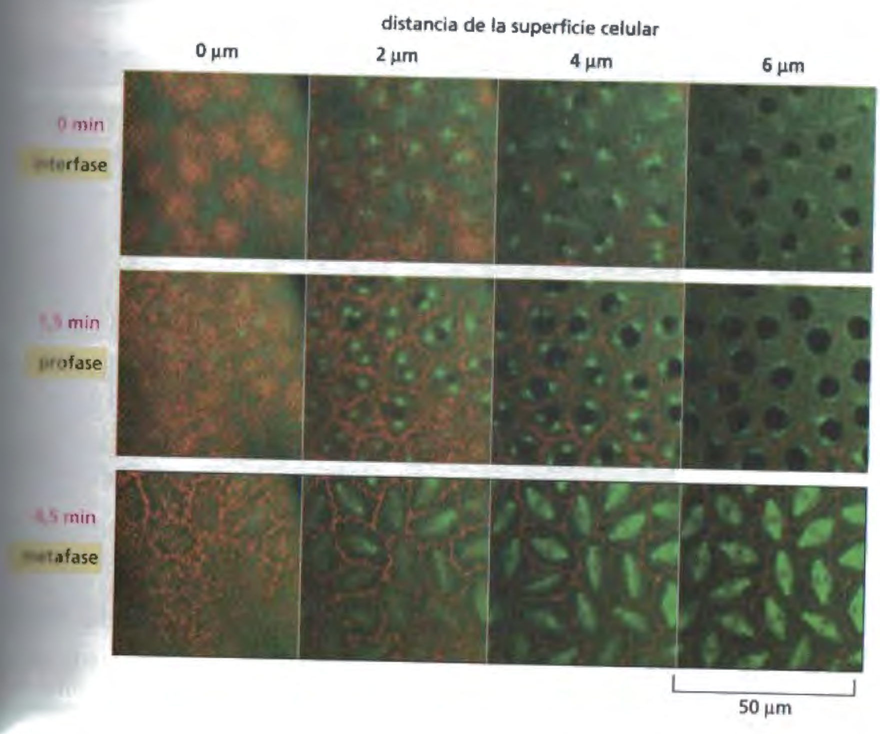
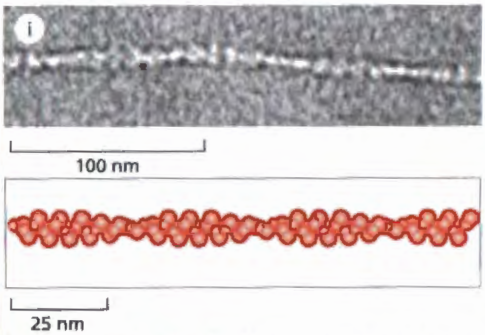
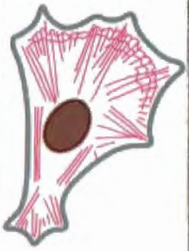


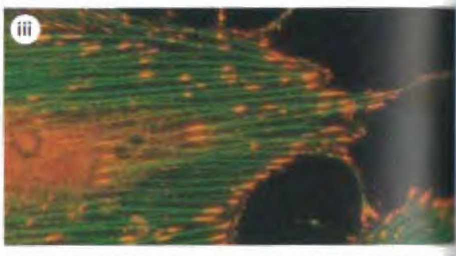
Figura 16–3 **Cambios rápidos que se producen en la organización del citoesqueleto observados durante el desarrollo de un embrión temprano de *Drosophila*.** <TTCT> En esta célula plurinuclear gigante, las primeras divisiones celulares se producen cada 10 minutos o menos en un citoplasma común. Las reorganizaciones rápidas de los filamentos de actina (*rojo*) y de los microtúbulos (*verde*) observadas en el embrión vivo son necesarias para separar los cromosomas en la mitosis, mientras se evita que cada núcleo colisione con sus vecinos. (Cortesía de William Sullivan.)

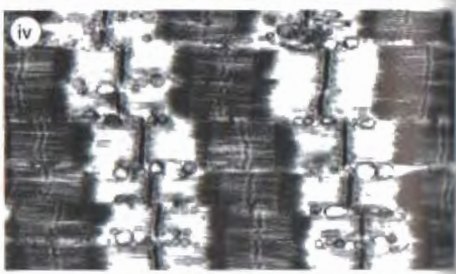
FILAMENTOS DE ACTINA







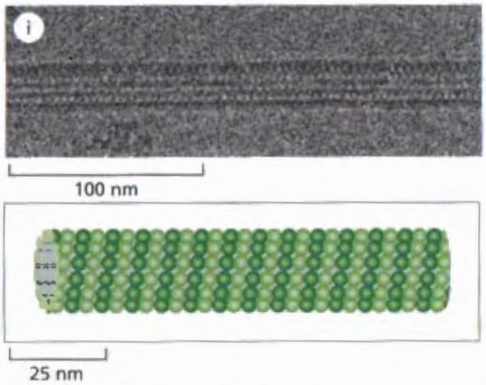




Los filamentos de actina (también conocidos como *microfilamentos*) son dos polímeros helicoidales de la proteína actina. Aparecen como estructuras flexibles, con un diámetro entre 5-9 nm, organizados en una gran variedad de haces lineales, de redes bidimensionales y geles tridimensionales. Aunque los filamentos de actina están dispersos en el citoplasma de la célula, se encuentran muy concentrados en el *córtex*, justo por debajo de la membrana plasmática.

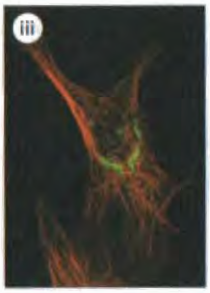
Electromicrografías por cortesía de Roger Craig (i y iv); P. T. Matsudaira y D.R. Burgess (ii); Keith Burridge (iii).

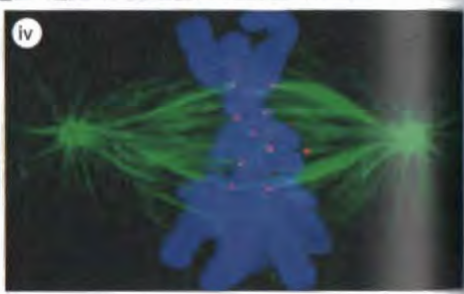
MICROTÚBULOS







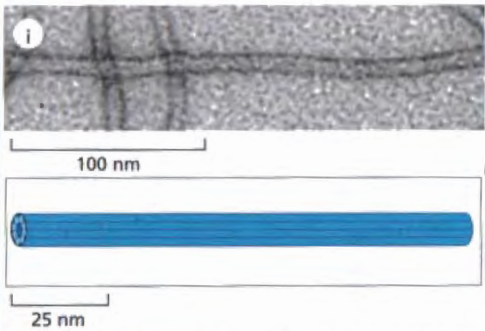




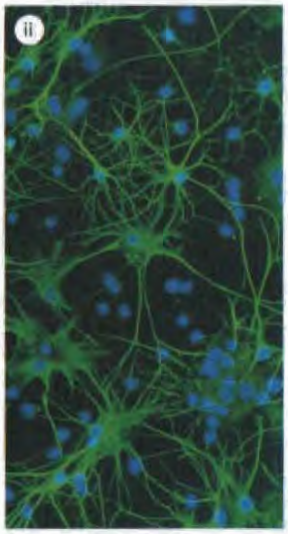
Los microtúbulos son cilindros largos y huecos formados por la proteína tubulina. Con un diámetro externo de 25 nm son mucho más rígidos que los filamentos de actina. Los microtúbulos son largos y rectos y normalmente tienen un extremo unido a un centro organizador de microtúbulos (MTOC) llamado *centrosoma*.

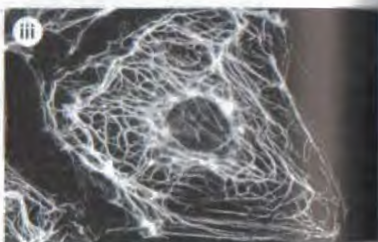
Electromicrografías por cortesía de Richard Wade (i); D.T. Woodrow y R.W. Link (ii); David Shima (iii); A. Desai (iv).

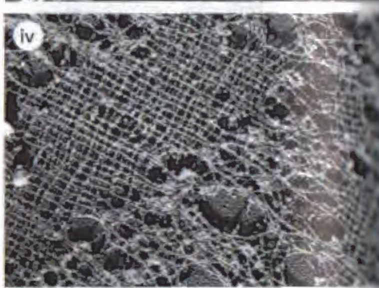
FILAMENTOS INTERMEDIOS











Los filamentos intermedios son estructuras parecidas a cuerdas, de un diámetro de unos 10 nm; están formados por las proteínas de los filamentos intermedios, que constituyen una familia numerosa y heterogénea de proteínas. Uno de los tipos de filamentos intermedios forma una malla llamada lámina nuclear que se localiza debajo de la membrana nuclear interna. Otros filamentos intermedios se extienden a lo largo del citoplasma proporcionando a las células resistencia mecánica. En un tejido epitelial, se extienden por el citoplasma desde una unión celular hasta otra y proporcionan resistencia al epitelio entero.

Electromicrografías por cortesía de Roy Quinlan (i); Nancy L. Kedersha (ii); Mary Osborn (iii); Ueli Aebi (iv)

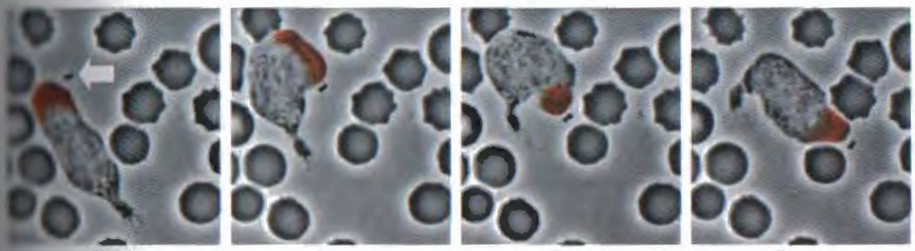


Figura 16–4 Un neutrófilo a la caza de una bacteria. <TGTA> En esta preparación de sangre humana, un grupo de bacterias (*flecha blanca*) está a punto de ser capturado por un neutrófilo. Mientras la bacteria se desplaza, el neutrófilo reensambla rápidamente su densa red de actina del extremo en avance (*rojo*) para dirigirse hacia el lugar donde están las bacterias. El rápido proceso de ensamblaje y desensamblaje del citoesqueleto de actina en esta célula le permite cambiar la orientación y dirección de su movimiento en pocos segundos. (A partir de un vídeo grabado por David Rogers.)

que la mayoría de células que se arrastran, los neutrófilos avanzan extendiendo estructuras protuberantes en el extremo de avance formadas por nuevos filamentos de actina polimerizados. Cuando la evasiva presa bacteriana se mueve en una dirección diferente, el neutrófilo debe reorganizar sus polarizadas estructuras protuberantes en cuestión de segundos (**Figura 16–4**). Ambos tipos de reorganizaciones rápidas del citoesqueleto se describirán con más detalle en la sección final de este capítulo.

El citoesqueleto también puede formar estructuras estables

En las células que han conseguido una morfología estable y diferenciada tales como las neuronas maduras o las células epiteliales, los elementos dinámicos del citoesqueleto deben proporcionar también estructuras altamente estables para la organización celular. En las células epiteliales especializadas que recubren órganos como el intestino y el pulmón, las protuberancias del citoesqueleto de la superficie celular incluyendo microvilli y cilios son capaces de mantener una longitud, un diámetro y una localización constante a lo largo de toda la vida de la célula. Para los haces de actina en el centro de los microvilli de las células epiteliales intestinales, esto sólo significa unos cuantos días. Sin embargo, los haces de actina del centro de los estereocilios de las células pilosas del oído interno deben mantener su organización estable durante toda la vida del animal, puesto que estas células no se renuevan. Aun así, los filamentos de actina individuales se mantienen dinámicos de una forma impresionante y se remodelan y sustituyen de forma continua cada 48 horas de media, incluso dentro de estas estructuras de la superficie celular estables que persisten durante décadas.

Además de formar protuberancias especializadas y estables en la superficie celular, el citoesqueleto es responsable de la polaridad celular, permitiendo en las células diferenciar una parte apical y una parte basal así como partes laterales. La información de la polaridad codificada por la organización del citoesqueleto a menudo debe mantenerse toda la vida de la célula. Las células epiteliales polarizadas como las que revisten la pared del intestino, por ejemplo, utilizan haces organizados de microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios para mantener diferencias funcionales críticas entre la *superficie apical* que absorbe nutrientes desde el lumen del intestino por donde pasa el alimento a la *superficie basolateral* donde la célula transfiere los nutrientes a través de la membrana plasmática hacia la circulación sanguínea. Deben mantener también uniones adhesivas fuertes con las células vecinas para permitir que esta capa de células sirva de barrera física efectiva (**Figura 16–5**).

Incluso una célula pequeña y morfológicamente sencilla como la de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* necesita una polaridad grande y estable. La característica más notable de la estructura de estas células es su elevada asimetría, evidente en la manera en que se dividen por yemas generando una célula hija pequeña y una célula madre más grande. Esta asimetría es debida a la orientación polar del citoesqueleto de actina. En estas células se producen dos tipos de ensamblaje de los filamentos de actina: cables de actina (largos haces de filamentos de actina) y fragmentos de actina (ensamblajes pequeños de filamentos asociados con el córtex celular que indican los lugares de endocitosis mediada por actina). Las células de levadura proliferantes deben ser muy polarizadas para permitir a la célula crecer una yema en un lugar concreto de la superficie celular, mientras que el lado opuesto crece de forma uniforme. En este proceso, los fragmentos de actina se encuentran en una concentración elevada en el extremo en crecimiento de la yema, con los cables de actina alineados y apuntando hacia ellos. Esta organización de actina dirige la secreción de la nueva pared celular y de otros materiales hacia el lugar de gemación (**Figura 16–6**). La organización polarizada de las estructuras de actina influye a la vez en la orientación del huso mitótico de forma que un conjunto completo de cromosomas replicados pueden ser dirigidos hacia la célula hija al final del proceso de la división celular.

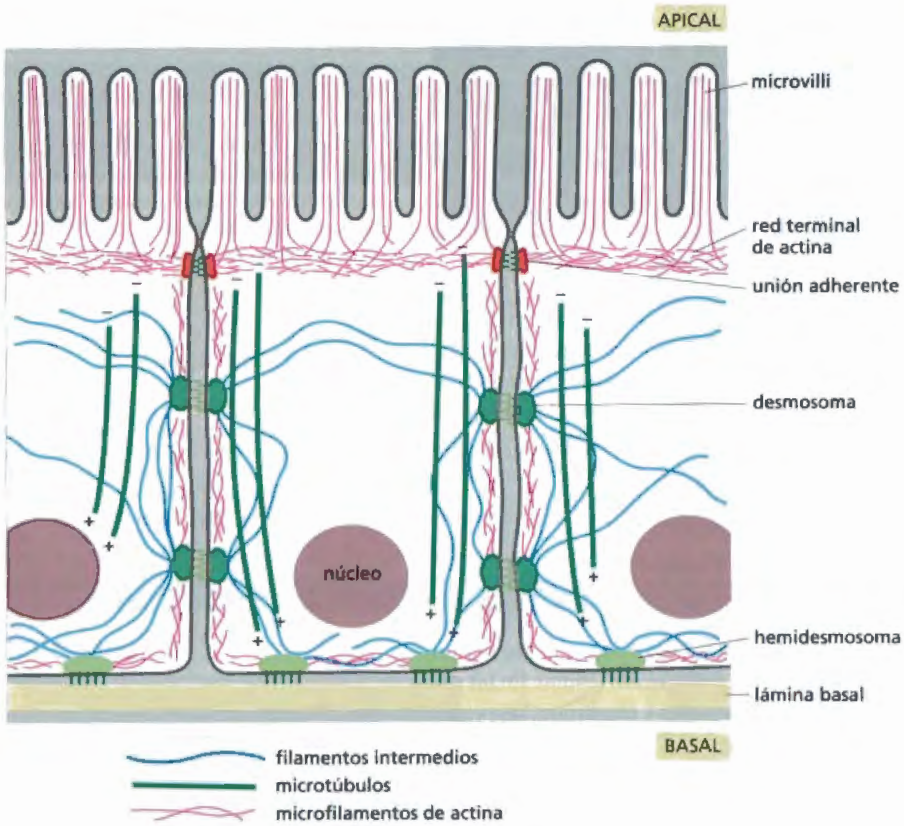


Figura 16-5 Organización del citoesqueleto en células epiteliales polarizadas. Todos los componentes del citoesqueleto cooperan produciendo las formas características de las células especializadas incluyendo las células epiteliales que tapizan el intestino delgado. En la superficie apical (superior), mirando hacia el lumen intestinal, los haces de filamentos de actina (*rojo*) forman los microvilli que aumentan la superficie de la que dispone la célula para la absorción de los nutrientes a partir de los alimentos. Justo por debajo de los microvilli, una banda circular de filamentos de actina contribuye a la formación de las uniones célula-célula que impiden que el contenido del lumen intestinal sea vertido al organismo. Los filamentos intermedios (*azul*) están anclados a otros tipos de estructuras adhesivas incluyendo desmosomas y hemidesmosomas que conectan las células epiteliales en una lámina robusta y las adhieren a la matriz extracelular subyacente en la cara basal de la célula; estas estructuras adhesivas tan importantes serán tratadas en el Capítulo 19. Los microtúbulos (*verde*) se distribuyen verticalmente desde la superficie apical de la célula hasta la superficie basal y proporcionan un sistema global coordinado que permite dirigir a los componentes de nueva síntesis hacia sus localizaciones específicas.

Pequeñas subunidades proteicas forman cada uno de los tipos de filamentos del citoesqueleto

A menudo las estructuras del citoesqueleto recorren la célula desde un extremo a otro, extendiéndose decenas o incluso centenares de micras, aunque por lo general cada una de las moléculas proteicas sólo miden unos cuantos nanómetros. La célula construye las grandes estructuras mediante el ensamblaje repetitivo de grandes cantidades de pequeñas subunidades, de la misma forma que muchos ladrillos forman un rascacielos. Dado que las subunidades son pequeñas, difunden con rapidez por el citoplasma, mientras que los filamentos no. De esta forma, las células pueden reorganizarse estructuralmente de forma rápida, desensamblando filamentos en un sitio y ensamblándolos en otro sitio más lejano (**Figura 16–7**).

Los filamentos intermedios se forman a partir de subunidades más pequeñas que los convierten en alargados y fibrosos, mientras que los filamentos de actina y los microtúbulos se forman a partir de subunidades que hacen que sean compactos y globulares; las *subunidades de actina* forman los filamentos de actina, las *subunidades de tubulina* forman los mi-

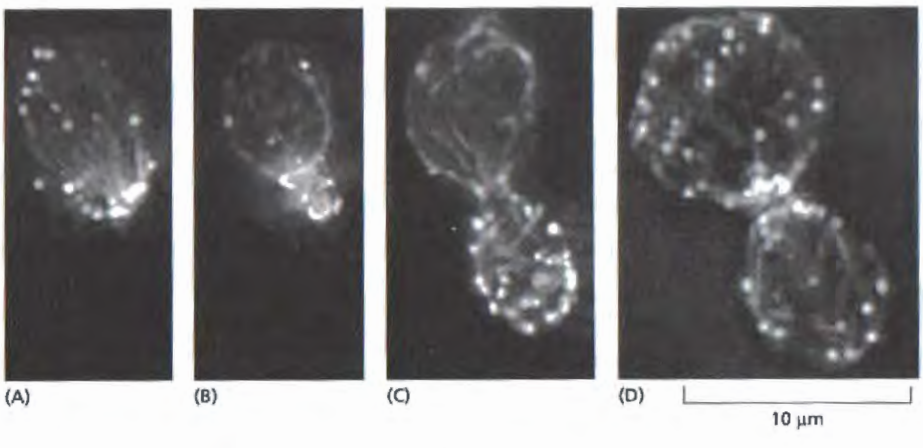


Figura 16-6 Polaridad de los parches y cables de actina en el ciclo celular de la levadura. Las estructuras de actina filamentosa en las células de levadura, marcadas con faloidina fluorescente, están formadas por los parches de actina (manchas circulares brillantes) y los cables de actina (líneas extendidas). (A) En una célula madre antes de la formación de la yema, la mayoría de los parches se encuentran acumulados en un extremo. Los cables están alineados y apuntan hacia el conjunto de parches, lugar donde aparecerá la yema. (B) Mientras la yema crece, la mayoría de parches permanecen en esta región. Los cables de la célula madre continúan apuntando hacia este lugar de crecimiento de la nueva pared celular. (C) Los parches están distribuidos casi de forma uniforme sobre la superficie de la yema, que ya tiene casi el tamaño final. (D) Inmediatamente después de la división celular, las células madre e hija forman nuevos parches, concentrados cerca del lugar de división, aunque ambas células tienen todos los cables orientados al azar. (De T.S. Karpova et al., *J. Cell Biol.* 142: 1501-1517, 1998. Con la autorización de The Rockefeller University Press.)

microtúbulos. Los tres tipos de filamentos del citoesqueleto se forman a partir de ensamblajes helicoidales de sus subunidades (véase Figura 3–26), que se autoasocian, utilizando combinaciones de contactos proteicos entre extremos y laterales. Las diferencias en la estructura de las subunidades y la resistencia de las fuerzas que las unen generan las diferencias críticas en cuanto a estabilidad y propiedades mecánicas que caracterizan cada tipo de filamento.

Las uniones covalentes entre sus subunidades mantienen juntos a la mayoría de polímeros biológicos, incluyendo DNA, RNA y proteínas. Por el contrario, interacciones no-covalentes débiles mantienen juntos los tres tipos de "polímeros" del citoesqueleto. En consecuencia, su ensamblaje y desensamblaje puede producirse rápidamente, sin necesidad de formar o de romper enlaces covalentes.

En el interior de la célula, cientos de diferentes proteínas accesorias están asociadas al citoesqueleto y regulan la distribución espacial y el comportamiento dinámico de los filamentos transformado la información recibida a través de las vías de señalización en acciones del citoesqueleto. Estas proteínas accesorias se unen a los filamentos o a sus subunidades y determinan los lugares de ensamblaje de nuevos filamentos, regulan la ruptura de los filamentos formando subunidades, cambian la cinética de ensamblaje y desensamblaje, transforman la energía en fuerza y unen los filamentos unos a otros o a otras estructuras celulares como los orgánulos del citoesqueleto o a la membrana plasmática. En estos procesos las proteínas accesorias someten al citoesqueleto al control de las señales extracelulares e intracelulares, incluyendo las que producen las grandes transformaciones del citoesqueleto durante cada ciclo celular. Su acción conjunta permite a la célula eucariota mantener la estructura interna altamente organizada y flexible que posee y posibilita el desplazamiento.

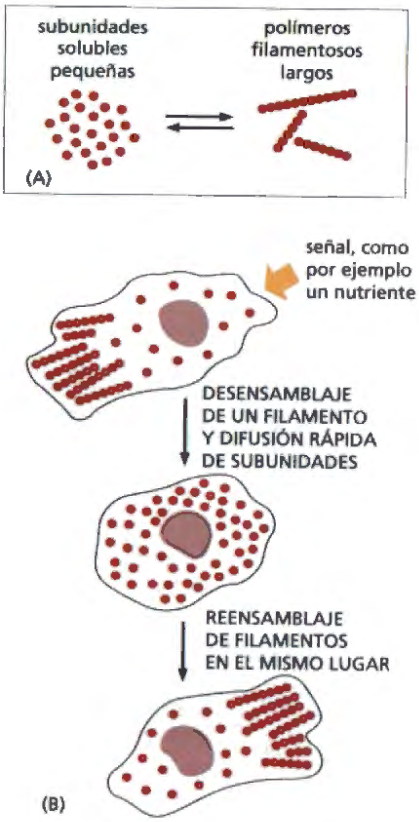


Figura 16–7 El citoesqueleto durante los cambios en la forma celular. La formación de los filamentos proteicos a partir de subunidades proteicas mucho más pequeñas permite un ensamblaje y desensamblaje regulado, lo que redefine la forma del citoesqueleto. (A) Formación de un filamento a partir de una proteína pequeña. (B) Rápida reorganización del citoesqueleto en una célula respondiendo a una señal externa.

Los filamentos formados por protofilamentos múltiples tienen propiedades ventajosas

En general, se considera que la unión de subunidades proteicas formando un filamento es una simple reacción de asociación. Una subunidad libre se une al extremo de un filamento que ya contiene n subunidades, formando un filamento que tendrá una longitud de $n + 1$. La unión adicional de cada subunidad en el extremo de un polímero genera un nuevo extremo al que puede unirse una nueva subunidad. Sin embargo, en las células los resistentes filamentos del citoesqueleto no se construyen simplemente uniendo subunidades de esta forma, como si se tratara de una cuerda lineal. Por ejemplo serían suficientes cerca de mil monómeros de tubulina en línea para abarcar el diámetro de una célula pequeña eucariota, pero un filamento formado de esta forma no tendría suficiente resistencia para resistir la energía ambiental, a menos que cada subunidad estuviera unida con fuerza a sus vecinas. Esta unión tan fuerte limitaría la velocidad de desensamblaje de los filamentos y transformaría el citoesqueleto en una estructura estática y poco útil.

Los polímeros del citoesqueleto combinan resistencia y adaptabilidad, ya que están construidos de múltiples **protofilamentos** –largas cuerdas lineales formadas por subunidades unidas extremo con extremo– que también se asocian de forma lateral; estos protofilamentos se enrollan unos alrededor de otros formando una hélice. La adición o pérdida de una subunidad en el extremo de un protofilamento genera o rompe un conjunto de enlaces longitudinales y uno o dos conjuntos de enlaces laterales. Sin embargo, para que un filamento se rompa por la mitad hace falta que desaparezcan enlaces longitudinales en distintos protofilamentos al mismo tiempo (**Figura 16–8**). La gran diferencia energética entre ambos procesos permite a los filamentos del citoesqueleto resistir a las rupturas térmicas, mientras que sus extremos son estructuras dinámicas, en los que la adición o la pérdida de subunidades se pueden producir rápidamente.

De forma parecida a otras interacciones proteína-proteína, las subunidades de los filamentos del citoesqueleto se unen a través de un gran número de interacciones hidrofóbicas y de enlaces no-covalentes débiles (véase Figura 3–4). La localización y el tipo de los enlaces que se producen entre las subunidades son distintos para los diferentes filamentos del citoesqueleto. Por ejemplo, los filamentos intermedios se ensamblan formando fuertes contactos laterales entre las partes sobreenrolladas de las hélices α, que se extienden sobre la mayor parte de la longitud de cada una de las subunidades fibrosas. Dado que cada una de las subunidades está distanciada en el filamento, los filamentos intermedios toleran los estiramientos y las rotaciones, y forman estructuras rígidas parecidas a cuerdas (**Figura 16–9**). Por el contrario, los microtúbulos se generan a partir de subunidades globulares que se mantienen juntas principalmente mediante enlaces longitudinales, de forma que los enlaces

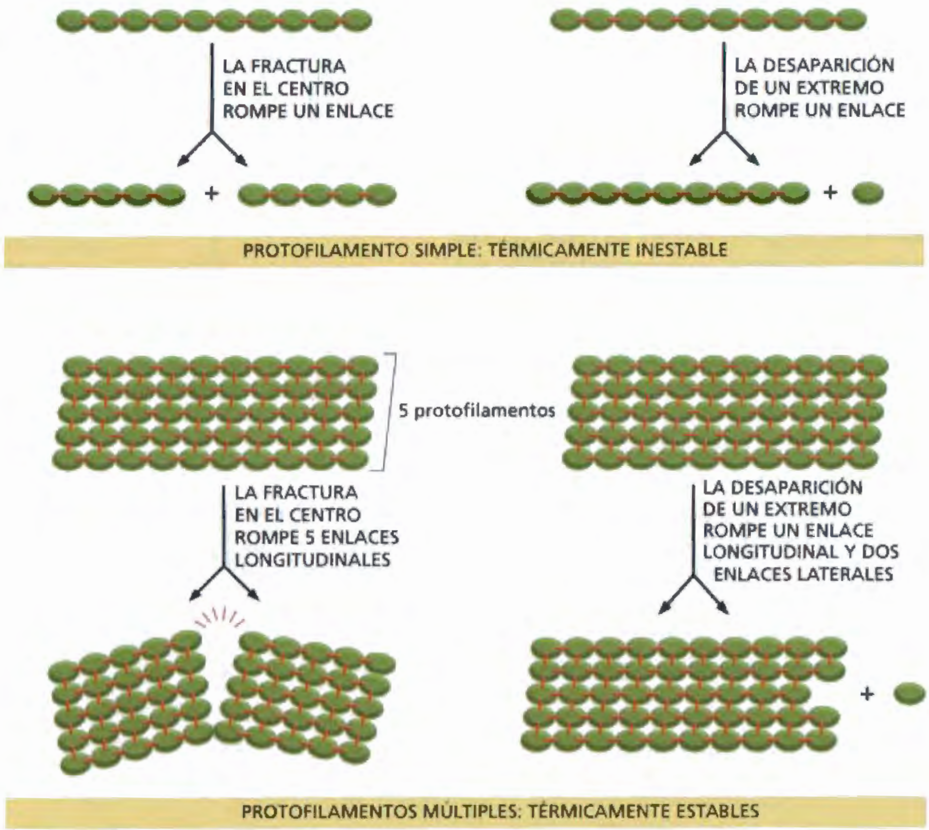


Figura 16–8 Estabilidad térmica de los filamentos del citoesqueleto con extremos dinámicos. La formación de un filamento del citoesqueleto a partir de más de un protofilamento permite el dinamismo de sus extremos, de forma que los filamentos resisten la ruptura térmica. En este ejemplo hipotético, el filamento estable está formado por cinco protofilamentos. Los puentes que mantienen unidas las subunidades en los filamentos se muestran en *rojo*.

laterales que unen a 13 protofilamentos son mucho más débiles. Por esta razón, los microtúbulos se rompen con más facilidad cuando se curvan que los filamentos intermedios.

La nucleación es la etapa limitante en la velocidad de formación de los polímeros del citoesqueleto

La organización en protofilamentos múltiples de los polímeros del citoesqueleto supone importantes consecuencias adicionales. Oligómeros cortos formados por unas cuantas subunidades pueden ensamblarse de forma espontánea, pero son inestables y se desensamblan fácilmente puesto que cada monómero sólo está unido a unos cuantos monómeros distintos. Para que se forme un filamento grande, las subunidades se tienen que ensamblar en un agregado inicial, o núcleo, que está estabilizado mediante muchos contactos subunidad-subunidad y que a partir de entonces puede alargarse con rapidez mediante la adición de más subunidades. El proceso inicial de ensamblaje de este núcleo se llama *nucleación* del filamento, y puede durar bastante tiempo, dependiendo del número de subunidades que se deban unir para formar el núcleo inicial.

La inestabilidad de los pequeños agregados genera una barrera cinética a la nucleación, que puede observarse con facilidad en una solución de actina o tubulina puras (las subuni-



Figura 16–9 Un filamento resistente formado por subunidades fibrosas alargadas con contactos laterales fuertes. Los filamentos intermedios están organizados de esta forma y, por tanto, son especialmente resistentes a las fuerzas de replegamiento y estiramiento aunque se doblan fácilmente.

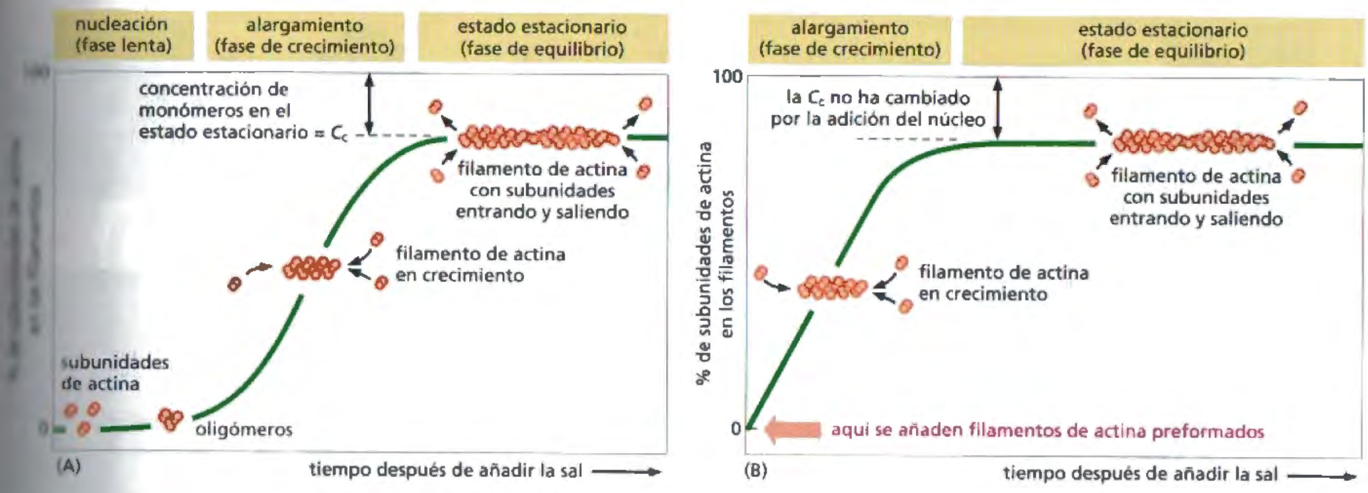


Figura 16–10 Polimerización de actina en función del tiempo en un tubo de ensayo. (A) La polimerización empieza cuando aumenta la concentración salina de una solución de subunidades puras de actina. (B) La polimerización empieza de la misma forma, pero con fragmentos de filamentos de actina preformados que actúan como lugar de nucleación para el crecimiento del filamento. Tal como se indica, el porcentaje (%) de subunidades libres refleja la concentración crítica (C_C), el punto en el cual no existe intercambio neto de polímero.

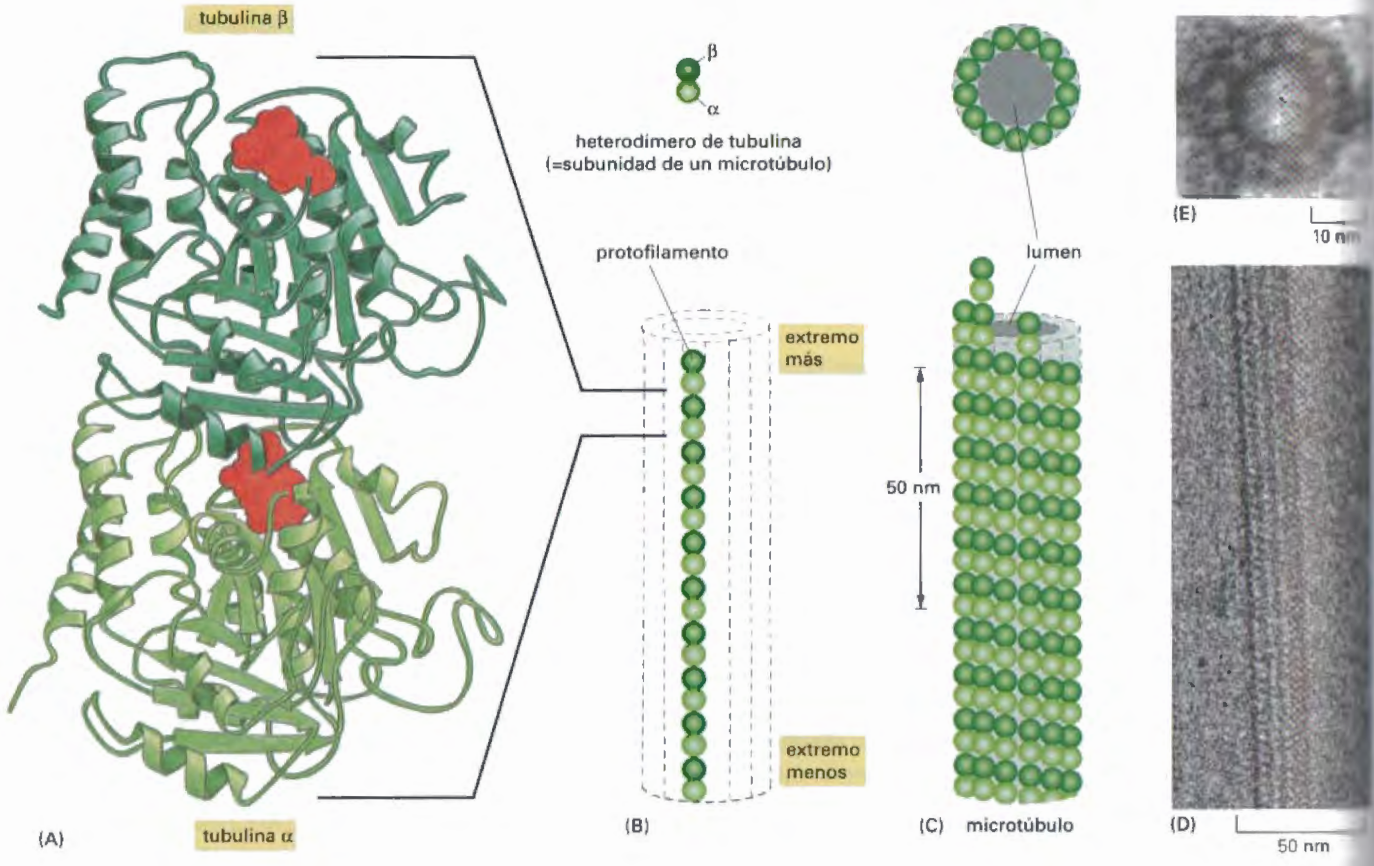
unidades de los filamentos de actina y de los microtúbulos, respectivamente). Cuando se inicia la polimerización en un tubo de ensayo que contenga los componentes individuales (aumentando la temperatura o la concentración de sales), se produce una fase inicial de calma (lag) en la que no se observan filamentos. Sin embargo, en esta fase inicial unos cuantos agregados pequeños e inestables tienen éxito y se transforman en formas filamentosas más estables de forma que a esta fase inicial le sucede una fase de elongación rápida del filamento en la que las subunidades se añaden rápidamente a los extremos del filamento nucleado (**Figura 16–10A**). Por último, el sistema llega a una fase de equilibrio en la que la velocidad de adición de nuevas subunidades en los extremos del filamento se equilibra con su velocidad de disociación. La concentración de subunidades libres en solución en este punto recibe el nombre de *concentración crítica*, C_c. Como se explica en el **Panel 16–2** (pp. 978–979), el valor de la concentración crítica es igual a la constante de velocidad de pérdida dividida por la constante de velocidad de adición, es decir, $C_c = k_{off} / k_{on}$.

La fase inicial del crecimiento de los filamentos se elimina si los filamentos terminales preexistentes (tales como fragmentos de filamentos que se han formado químicamente) se añaden a la solución al principio de la reacción de polimerización (Figura 16–10B). La célula aprovecha esta necesidad de nucleación: utiliza proteínas especiales para catalizar la nucleación de filamentos en lugares determinados y determinan la localización en la que se ensamblen nuevos filamentos. En el fondo, la regulación de la nucleación de los filamentos es una manera para que las células controlen su forma y su movimiento.

Las subunidades de actina y de tubulina se ensamblan cabeza con cola dando lugar a filamentos polares

Los microtúbulos están formados por subunidades de **tubulina**. Cada subunidad de tubulina es un heterodímero formado por dos tipos de proteínas globulares íntimamente relacionadas denominadas *tubulina α* y *tubulina β*, que están unidas con fuerza ente sí mediante enlaces no-covalentes (**Figura 16–11**). Estas dos proteínas sólo se encuentran en este heterodímero. Cada monómero α o β tiene un lugar de unión para una molécula de GTP. El GTP unido a un monómero de tubulina α queda físicamente atrapado en la interfase del dímero y nunca puede ser hidrolizado o expulsado; puede ser considerado como parte integral de la estructura heterodimérica de la tubulina. Por el contrario, el nucleótido de la subunidad de tubulina β aparece tanto en forma de GTP como de GDP y puede ser hidrolizado. Como se expondrá más adelante, la hidrólisis del GTP situado en este lugar tiene un efecto importante en la dinámica de los microtúbulos.

Un microtúbulo es una estructura cilíndrica hueca formada por 13 protofilamentos paralelos, cada uno de los cuales está formado por moléculas de tubulina α y tubulina β que se alternan. Cuando los heterodímeros de tubulina se ensamblan formando el microtúbulo cilíndrico hueco, se producen dos tipos de contactos proteína–proteína. A lo largo del eje longitudinal del microtúbulo, la "cabeza" de una molécula de tubulina β se une con la "cola" de la molécula de tubulina α del heterodímero adyacente. Este tipo de unión es muy parecida a la que mantiene juntos a los monómeros α y β formando un dímero; la energía de unión es



muy elevada. Perpendicularmente a estas interacciones se forman contactos laterales entre protofilamentos vecinos. En esta dimensión, los contactos laterales principales se forman entre monómeros del mismo tipo (α-α, β-β). Ambos tipos de contactos se repiten en la lámina helicoidal regular del microtúbulo. Debido a que los contactos múltiples en la lámina mantienen a las subunidades en su lugar, la adición o sustracción de subunidades se produce casi exclusivamente en los extremos del microtúbulo (véase la Figura 16–8). Estos contactos múltiples entre subunidades convierten a los microtúbulos en estructuras rígidas difíciles de doblegar. La rigidez de un filamento se caracteriza por su *longitud continua*, una propiedad del filamento que describe cuál debe ser su longitud antes que las fluctuaciones térmicas aleatorias provoquen su curvamiento. La longitud continua de un microtúbulo es de algunos milímetros y los convierte en los elementos estructurales más rígidos y rectos de la mayoría de células animales.

Las subunidades de cada uno de los protofilamentos de un microtúbulo se ensamblan a partir de subunidades que apuntan en la misma dirección y los protofilamentos están alineados en paralelo (en la Figura 16–11, por ejemplo, en cada heterodímero la tubulina α está hacia abajo y la tubulina β hacia arriba). Así pues, el microtúbulo tiene una estructura diferencial polarizada, con las tubulinas α expuestas en un extremo y las tubulinas β expuestas en el otro extremo.

La subunidad de actina es una cadena polipeptídica globular simple y no es un dímero sino que es un monómero. Como en el caso de la tubulina, cada subunidad de actina dispone de un lugar de unión para un nucleótido, pero para la actina los nucleótidos son el ATP (o ADP) en vez del GTP (o GDP) (**Figura 16–12**). De forma similar a la tubulina, las subunidades de actina se ensamblan cabeza con cola generando filamentos con distinta polaridad estructural. Se puede considerar que un filamento de actina está formado por dos protofilamentos paralelos que giran uno sobre el otro siguiendo una hélice de rotación hacia la derecha. Los filamentos de actina son relativamente flexibles y se curvan con facilidad comparados con los microtúbulos huecos y cilíndricos, con una longitud continua de sólo unas cuantas decenas de micras. Pero en una célula viva, proteínas accesorias (véase más adelante) unen y entrecruzan los filamentos unos con otros, haciendo que estas grandes estructuras de actina sean mucho más resistentes que los filamentos individuales.

Figura 16–11 Estructura de un microtúbul[o] y sus subunidades. (A) La subunidad de ca[da] protofilamento es un heterodímero de tubulina, formado por un par de monóme[ros] de tubulina α y de tubulina β, íntimamente unidos entre sí. La molécula de GTP en el monómero de tubulina está unida de tal forma que puede considerarse parte integ[ral] de la proteína. Por el contrario, la molécula [de] GTP en el monómero de tubulina β no está unida tan íntimamente, pero tiene un pap[el] muy importante en la dinámica del filamen[to]. Ambos nucleótidos se representan en *rojo*. En (B) se muestra esquemáticamente una molécula de tubulina (un heterodímero α-[β]) y un protofilamento. Cada protofilamento está formado por muchas subunidades adyacentes que tienen la misma orientació[n]. (C) El microtúbulo es un tubo formado por 13 protofilamentos alineados en paralelo. (D) Segmento corto de un microtúbulo observado con el microscopio electrónico. (E) Electromicrografía de un corte transvers[al] de un microtúbulo que muestra el anillo de 13 protofilamentos. (D, por cortesía de Richard Wade; E, por cortesía de Richard Linck.)

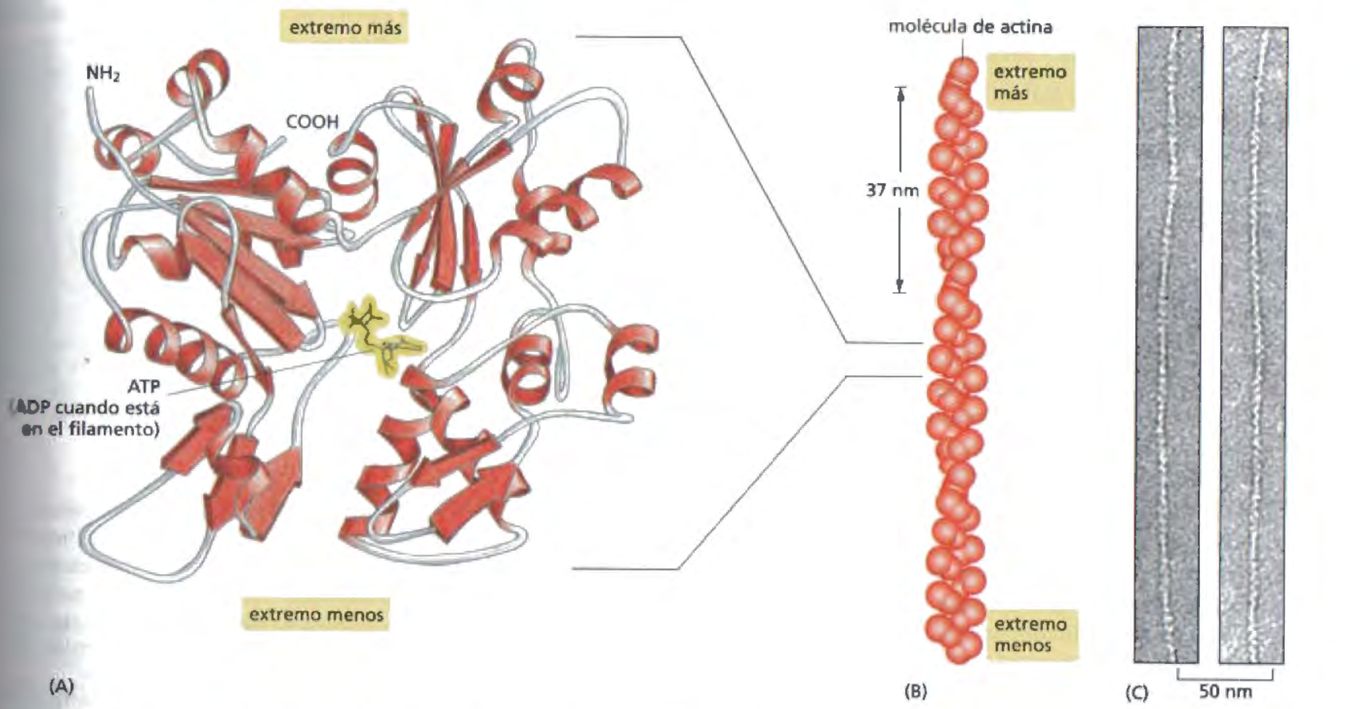


Figura 16–12 Estructura de un monómero y de un filamento de actina. (A) El monómero de actina tiene un nucleótido (ATP o ADP) unido en una ranura profunda en el centro de la molécula. (B) Disposición de los monómeros en el filamento. Aunque a menudo el filamento se describe como una hélice simple de monómeros, también se puede imaginar como dos protofilamentos que se mantienen unidos entre sí por contactos laterales y que se enroscan uno alrededor de otro como dos hebras paralelas de una hélice, con un giro repetido cada 37 nm. Dentro del filamento todas las subunidades tienen la misma orientación. (C) Electromicrografías de filamentos de actina contrastados negativamente. (C, cortesía de Roger Craig.)

Microtúbulos y filamentos de actina tienen dos extremos distintos que crecen a velocidades diferentes

La orientación paralela y regular de sus subunidades proporciona a los filamentos de actina y a los microtúbulos su polaridad estructural. Esta orientación determina que los dos extremos de cada polímero sean distintos, de manera que tienen un efecto muy importante en las velocidades de crecimiento de los filamentos. La unión de una subunidad al extremo de un filamento de n subunidades, genera un filamento de $n + 1$ subunidades. En ausencia de hidrólisis de ATP o de GTP, la diferencia de energía libre y, en consecuencia, la constante de equilibrio (y la concentración crítica), para la adición de una subunidad a un extremo del polímero, serán las mismas que para la adición al otro extremo del polímero. En este caso, las constantes de asociación de ambos extremos k_{on} / k_{off} serán idénticas, aunque los valores absolutos de ambas constantes pueden ser distintos.

En un filamento de estructura polar, las constantes cinéticas para la asociación y la disociación k_{on} y k_{off} respectivamente son a menudo mucho mayores en un extremo que en el otro. Así pues, si se permite que un exceso de subunidades purificadas se ensamble a fragmentos marcados de filamentos preformados, se observa que uno de los extremos de cada fragmento se alarga mucho más rápido que el otro (**Figura 16–13**). Si los filamentos se diluyen rápidamente de forma que la concentración de subunidades disminuye por debajo de la concentración crítica, el extremo de crecimiento rápido se despolimeriza también a la misma velocidad. El más dinámico de los dos extremos de un filamento, donde tanto el crecimiento como la disociación se producen rápidamente, se llama **extremo más**, y el otro recibe el nombre de **extremo menos**.

En los microtúbulos, las subunidades α están expuestas en el extremo menos y las subunidades β en el extremo más. En los filamentos de actina, la ranura de unión de ATP en el monómero está dirigida hacia el extremo menos. (Por razones históricas, los extremos más de los filamentos de actina se conocen como extremos "romos" –*barbed*– y los extremos menos como "puntiagudos" –*pointed*– debido a la apariencia de flecha de las cabezas de miosina cuando se unen al filamento.)

El alargamiento del filamento se produce de forma espontánea cuando la variación de energía libre (ΔG) para la unión de una subunidad soluble es inferior a 0. Este fenómeno ocurre cuando la concentración de las subunidades en solución supera la concentración crítica. Así mismo, la despolimerización se produce rápidamente cuando la variación de energía libre es superior a cero. Una célula puede combinar procesos energéticamente desfavorables con estos procesos espontáneos; así pues, la célula puede usar la energía libre liberada durante la polimerización o la despolimerización espontáneas de los filamentos para realizar un trabajo mecánico, en particular, para empujar o estirar una carga que lleve adherida el fi-

lamento. Por ejemplo, el alargamiento de los microtúbulos puede ayudar a empujar las membranas hacia el exterior y su despolimerización puede estirar a los cromosomas mitóticos separándolos de sus homólogos durante la anafase. De forma parecida, la elongación de los filamentos de actina interviene en la formación del extremo director de las células móviles, como analizaremos más adelante.

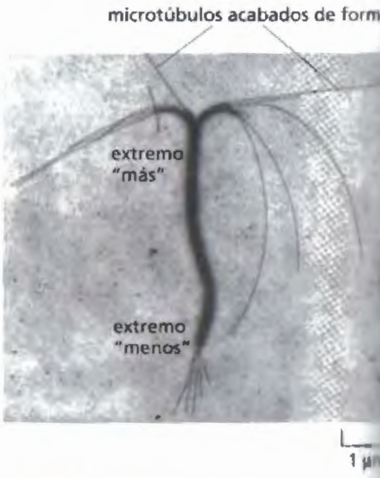


Figura 16–13 Crecimiento preferencial de microtúbulos en los extremos "más". Tanto los filamentos de actina como los microtúbulos crecen más rápido por un extremo que por el otro. En este caso, un haz estable de microtúbulos obtenido del axonema de un cilio (descrito más adelante) se incuba durante un tiempo cor con subunidades de tubulina en condicion de polimerización. Los microtúbulos crecen más rápidamente en el extremo "más" del h de microtúbulos, extremo que se encuentr en la parte superior en esta microfotografía. (Por cortesía de Gary Borisy.)

El recambio rotatorio (*treadmilling*) y la inestabilidad dinámica son consecuencias de la hidrólisis de nucleótidos producida por la tubulina y la actina

La presente explicación de la dinámica de los filamentos ha ignorado un hecho crítico que puede aplicarse tanto a los filamentos de actina como a los microtúbulos. Además de su habilidad para formar polímeros no-covalentes, las subunidades de actina y de tubulina son enzimas capaces de hidrolizar nucleósidos trifosfato, ATP o GTP, respectivamente. En el caso de las subunidades libres, esta hidrólisis se produce muy lentamente, pero se acelera cuando las subunidades se incorporan a los filamentos. Poco después de la incorporación de una subunidad de actina o de tubulina a un filamento, se produce esta hidrólisis; el grupo fosfato es liberado de cada subunidad, pero el nucleósido difosfato permanece atrapado en la estructura del filamento (en la tubulina, el lugar de unión del nucleótido se encuentra en la parte media entre dos subunidades vecinas –véase Figura 16–11–, mientras que en la actina, el nucleótido se encuentra en una ranura cerca del centro de la subunidad –véase Figura 16–12). Así pues, pueden existir dos tipos de estructuras distintas, una, la "forma T" con el nucleótido trifosfato unido (ATP para la actina y GTP para la tubulina), y otra, la "forma D" con el nucleótido difosfato unido (ADP para la actina, GDP para la tubulina).

Cuando el nucleótido se hidroliza, buena parte de la energía libre liberada por la rotura de los enlaces fosfato-fosfato, de alta energía, se almacena en la red del polímero. Esto provoca que la variación de energía libre para de la disociación de la forma D del polímero sea más negativa que la variación de energía libre para la disociación de la forma T del polímero. En consecuencia, la proporción de k_{off}/k_{on} para la forma D del polímero, que es numéricamente igual a su concentración crítica [C_c(D)], es mayor que la proporción correspondiente para la forma T del polímero. Así pues, C_c(D) es mayor que C_c(T). Para ciertas concentraciones de subunidades libres, las formas D se disociarán mientras que las formas T crecerán.

En una célula viva, la mayoría de subunidades libres están en forma T, dado que la concentración libre tanto de ATP como de GTP es alrededor de diez veces más alta que las de ADP y GDP. Cuanto más tiempo haga que las subunidades se hayan unido al polímero, más probable es que hayan hidrolizado su nucleótido. El hecho de que la subunidad del extremo de un filamento esté en forma T o D condicionará las velocidades relativas de hidrólisis y de adición de subunidades. Si la velocidad de unión de subunidades es alta, es decir, el filamento está creciendo rápidamente, será más fácil que se añada una nueva subunidad al polímero antes de que el nucleótido que se ha unido antes haya sido hidrolizado, de forma que el extremo del polímero permanecerá en la forma T, con una *cabeza ATP* o *GTP*. Sin embargo, si la velocidad de unión de las subunidades es baja, se puede producir la hidrólisis del nucleótido trifosfato antes de que se añada la nueva subunidad y el extremo del filamento estará en la forma D.

La velocidad de unión de subunidades al extremo de un filamento es igual al producto de la concentración de subunidades libres por la constante de velocidad k_{on}. La k_{on} es mucho más rápida para el extremo más de un filamento que para el extremo menos, debido a las diferencias estructurales entre ambos extremos del filamento (véase Panel 16–2). A una concentración intermedia de subunidades libres, puede ser que la velocidad de unión de subunidades sea mayor que la hidrólisis de nucleótidos en el extremo más, pero menor que la hidrólisis de nucleótidos en el extremo menos. En este caso, el extremo más de un filamento permanecerá en la conformación T y el extremo menos adoptará la conformación D. Como acabamos de explicar, la forma D tiene una concentración crítica más alta que la forma T (la forma D tiende más fácilmente hacia el desensamblaje, mientras que la forma T tiende más fácilmente hacia el ensamblaje). Si la concentración de subunidades libres en solución se encuentra en un rango intermedio –más alta que la concentración crítica de la forma T (es decir, del extremo más), pero más baja que la concentración crítica de la forma D (es decir, del extremo menos)–, el filamento añadirá subunidades en el extremo más y simultáneamente perderá subunidades en el extremo menos. Este hecho determina la propiedad del **recambio rotatorio** (*treadmilling*) de filamentos (**Figura 16–14** y Panel 16–2).

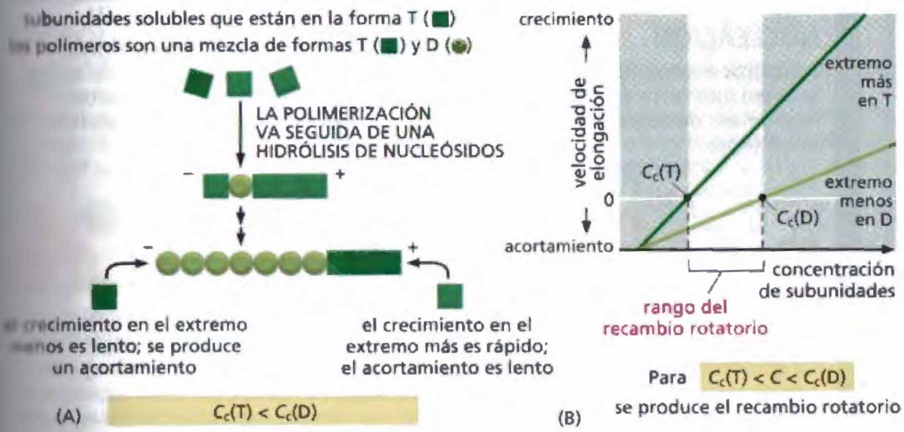


Figura 16–14 Recambio rotatorio de un filamento de actina o de un microtúbulo, debido a la hidrólisis del nucleósido trifosfato tras la adición de una subunidad. (A) Esquema explicativo de la existencia de concentraciones críticas (C_c) distintas en los extremos más y menos. Las subunidades con nucleósidos trifosfato unidos (subunidades de forma T) polimerizan en ambos extremos de un filamento en crecimiento; entonces, el nucleótido es hidrolizado en el entramado del filamento. En este ejemplo, mientras el filamento crece, en el extremo más el proceso de crecimiento es más rápido que el acortamiento y, en este extremo, la subunidad terminal siempre está en la forma T. Sin embargo, en el extremo menos el acortamiento es más rápido que el crecimiento, de forma que las subunidades terminales en este extremo están en la forma D. (B) El recambio rotatorio se produce a concentraciones intermedias de subunidades libres. La concentración crítica para la polimerización en el extremo de un filamento con la forma T es más baja que para el extremo con la forma D. Si la concentración de subunidades se encuentra entre estos dos valores, el extremo más crece mientras que el extremo menos se acorta y se produce el recambio rotatorio.

Durante el recambio rotatorio, las subunidades son reclutadas en el extremo más del polímero en forma T y liberadas del extremo menos en forma D. La hidrólisis de ATP o GTP que se produce origina la diferencia de energía libre de las reacciones de asociación/disociación en los extremos más y menos de los filamentos de actina y de tubulina, haciendo posible este recambio rotatorio. A una determinada concentración intermedia de subunidades, el crecimiento del filamento en el extremo más se equilibra exactamente con la disociación del filamento en el extremo menos. Entonces, las subunidades oscilan rápido entre los estados libre y filamentoso, mientras que la longitud total del filamento permanece constante. Este recambio en estado estacionario necesita un consumo constante de energía a partir de la hidrólisis de los nucleósidos trifosfato. La cantidad de recambio rotatorio que se produce en el interior de la célula no se conoce con certeza, pero *in vitro* se ha observado el recambio de un filamento sencillo es el caso de la actina y en células vivas se ha observado un fenómeno parecido a éste en el caso de microtúbulos individuales (**Figura 16–15**).

Las diferencias cinéticas entre el comportamiento de la forma T y de la forma D tienen otra consecuencia importante para el comportamiento de los filamentos. Si la velocidad de unión de subunidades a un extremo es parecida en magnitud a la velocidad de hidrólisis, hay una probabilidad finita de que este extremo se mantenga en la forma T, porque la hidrólisis finalmente "atrapará" a la unión y transformará el extremo en la forma D. Esta transformación es repentina y al azar, con una cierta probabilidad por unidad de tiempo.

Supongamos que la concentración crítica de subunidades libre es intermedia entre la concentración crítica del extremo en forma T y la concentración crítica del extremo en forma D (es decir, en el mismo rango en el que se observa el recambio rotatorio). En estas condiciones, cualquier extremo que esté en forma T crecerá, mientras que cualquier extremo que esté en forma D se acortará. En un filamento, un extremo podría crecer durante un cierto periodo de tiempo en forma T, para cambiar repentinamente a la forma D y empezar a disociarse con rapidez incluso aunque la concentración de subunidades libre se mantuviera constante. Un tiempo más tarde, podría de nuevo volver a la forma T y crecer de nuevo. Esta interconversión rápida entre un estado en crecimiento y un estado en disociación a una determinada concentración de subunidades libre, se denomina **inestabilidad dinámica** (**Figura 16–16A**). El cambio desde el crecimiento al acortamiento rápido se llama *catástrofe*, mientras que el cambio hacia el crecimiento se conoce como *rescate*. <CCCA>

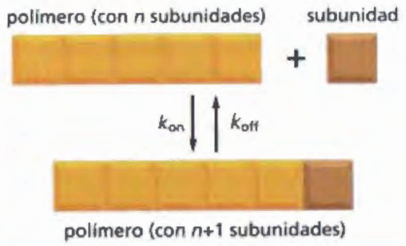
En una población de microtúbulos, en cualquier momento, algunos de los extremos están en forma T y otros están en forma D y la proporción depende de la tasa de hidrólisis y de la concentración de subunidades libres en un momento dado. La diferencia estructural entre



Figura 16–15 Recambio rotatorio de un microtúbulo observado en una célula viva. Una célula fue inyectada con tubulina que se había unido covalentemente al colorante fluorescente rodamina, de forma que una de cada 20 tubulinas era fluorescente. Se observó la fluorescencia de los diferentes microtúbulos con una cámara electrónica muy sensible. El microtúbulo mostrado parece deslizarse de *izquierda* a *derecha*, pero en realidad el enrejado del microtúbulo permanece estacionario (como se muestra por la señal en el microtúbulo que se indica con la flecha *roja*) mientras el extremo más (a la *derecha*) crece y el extremo menos (a la *izquierda*) se acorta. El extremo más también muestra inestabilidad dinámica. (De C.M. Waterman-Storer y E.D. Salmon. *J. Cell Biol.* 139:417-434, 1997. Con la autorización de The Rockefeller University Press.)

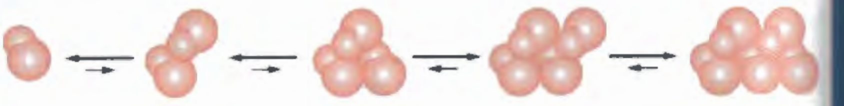
VELOCIDADES DE CRECIMIENTO Y DE ACORTAMIENTO

Un polímero lineal de moléculas proteicas, como por ejemplo un filamento de actina o un microtúbulo, se ensambla (polimeriza) y se desensambla (despolimeriza) mediante la adición y la eliminación de subunidades en los extremos del polímero. La velocidad de adición de estas subunidades (llamadas monómeros) viene dada por la constante k_{on}, cuyas unidades son de M^{-1} seg^{-1}. La velocidad de pérdida viene dada por la constante k_{off} (unidades seg^{-1}).



NUCLEACIÓN

Un polímero helicoidal está estabilizado mediante muchos contactos entre subunidades adyacentes. Para la actina, dos moléculas de actina se unen mediante enlaces relativamente débiles, pero la unión de un tercer monómero de actina formando un trímero proporciona una mayor estabilidad al conjunto.



La adición posterior de monómeros puede tener lugar sobre este trímero, que actúa como núcleo de la polimerización. El lugar de nucleación de la tubulina es mucho más grande y tiene una estructura más compleja (posiblemente un anillo de 13 o más moléculas), pero el principio es el mismo.

El ensamblaje de un núcleo es relativamente lento, lo que explica la fase inicial lenta (fase *lag*, de retraso) producida durante la polimerización. La fase lenta se puede reducir o eliminar por completo si se añaden núcleos prefabricados, tales como fragmentos de microtúbulos o filamentos de actina previamente polimerizados.

CONCENTRACIÓN CRÍTICA

El número de monómeros que se añaden por segundo al polímero (filamento de actina o microtúbulo) será proporcional a la concentración de las subunidades libres ($k_{on}C$), pero las subunidades abandonarán el extremo del polímero a una velocidad constante (k_{off}) que no depende de C. A medida que el polímero va creciendo, las subunidades se van incorporando de forma que C cae hasta alcanzar un valor constante denominado concentración crítica (C_c). A esta concentración, la velocidad de adición de subunidades es igual a la velocidad de pérdida.

En este punto de equilibrio,

$$k_{on}\,C = k_{off}$$

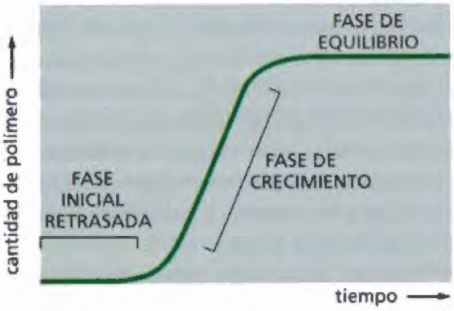
de forma que

$$C_c = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{1}{K}$$

(donde *K* es la constante de equilibrio para la adición de subunidades, véase Figura 3-43).

POLIMERIZACIÓN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO

El ensamblaje de una proteína formando un polímero helicoidal (p.ej., un filamento del citoesqueleto o un flagelo bacteriano), muestra está curva respecto al tiempo:



La fase inicial retrasada (fase lag) corresponde al tiempo que dura la nucleación.

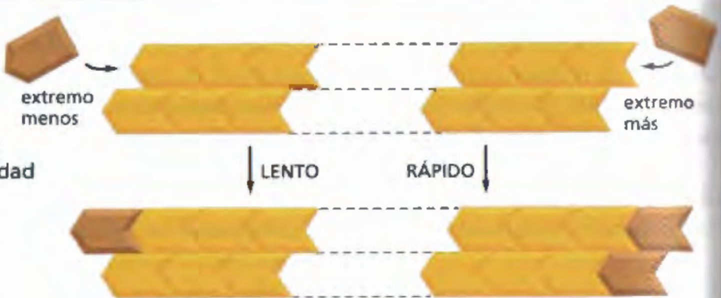
La fase de crecimiento se produce mientras los monómeros se añaden a los extremos expuestos del polímero en crecimiento, provocando la elongación del filamento.

La fase de equilibrio, o estado estacionario, se alcanza cuando el crecimiento del polímero debido a la adición de monómeros está exactamente en equilibrio con el acortamiento del polímero debido a la pérdida de monómeros.

EXTREMOS MÁS Y EXTREMOS MENOS

Los dos extremos de un filamento de actina o de un microtúbulo polimerizan a velocidades distintas. El extremo de crecimiento rápido se llama extremo más, mientras que el extremo de crecimiento lento se llama extremo menos. La diferencia de velocidad de crecimiento de los dos extremos es posible gracias a cambios conformacionales de cada subunidad cuando se incorpora al polímero.





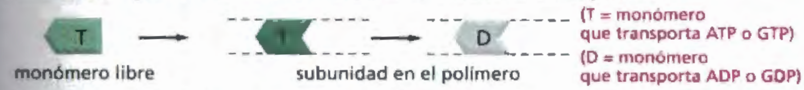
Este cambio conformacional afecta a la velocidad con la que las subunidades se añaden a los dos extremos.

Los valores de k_{on} serán distintos para el extremo más y para el extremo menos del polímero, pero la relación k_{off}/k_{on} y, por tanto, la C_c, será la misma en ambos extremos para el caso de una reacción de polimerización sencilla (sin hidrólisis ni de ATP ni de GTP). Esto es debido a que cuando se pierde una subunidad en un extremo, se rompen exactamente el mismo número de interacciones entre subunidades que cuando se pierde una subunidad en el otro extremo, y el estado final de la subunidad después de la disociación es idéntico en ambos casos. Así pues, la ΔG de la subunidad perdida, que determina la constante de equilibrio para su asociación al extremo, es idéntica en ambos extremos: si el extremo más crece cuatro veces más rápido que el extremo menos, también tiene que disociarse cuatro veces más rápidamente. Por tanto, para $C > C_c$, ambos extremos crecen; para $C < C_c$, ambos se acortan.

La hidrólisis del nucleósido trifosfato que acompaña a la polimerización de la actina y de la tubulina elimina este condicionante.

HIDRÓLISIS DE NUCLEÓTIDOS

Cada molécula de actina transporta una molécula de ATP fuertemente unida, que es hidrolizada formando una molécula de ADP también unida con fuerza a la actina en cuanto se ensambla en el polímero. De manera similar, cada molécula de tubulina transporta una molécula de GTP fuertemente unida, que se convierte en una molécula de GDP unida igual en cuanto la molécula se ensambla en el polímero.



La hidrólisis del nucleótido unido reduce la afinidad de unión de cada subunidad respecto a la subunidad vecina, haciéndola más fácilmente disociable de cada uno de los extremos del filamento (véase Figura 16-16 para un posible mecanismo). Por lo general, es la forma T la que se añade al filamento y es la forma D la que se libera del filamento. Si sólo se consideran los acontecimientos que tienen lugar en el extremo más:



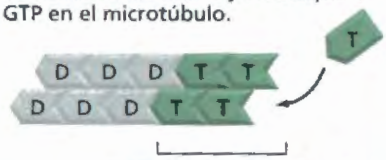
Como antes, el polímero crecerá hasta que $C = C_c$. Por motivos didácticos, podemos considerar que k^D_{on} y k^T_{off} son insignificantes, de forma que podemos decir que el crecimiento del polímero cesa cuando

$$k^T_{on}\, C = k^D_{off} \quad \text{o} \quad C_c = \frac{k^D_{off}}{k^T_{on}}$$

Se trata de un estado estacionario y no de un verdadero equilibrio, ya que el ATP que es hidrolizado puede ser reemplazado por una reacción intercambiadora de nucleótidos de la subunidad libre (D → T).

CASQUETES DE ATP Y DE GTP

La velocidad de adición de subunidades a un filamento de actina o a un microtúbulo en crecimiento puede ser más rápida que la velocidad a la cual se hidroliza el nucleótido que llevan unido. En estas condiciones, las subunidades de los extremos del filamento forman un casquete ("cap") de subunidades que tienen unido el nucleósido trifosfato: un casquete de ATP en el filamento de actina y un casquete de GTP en el microtúbulo.



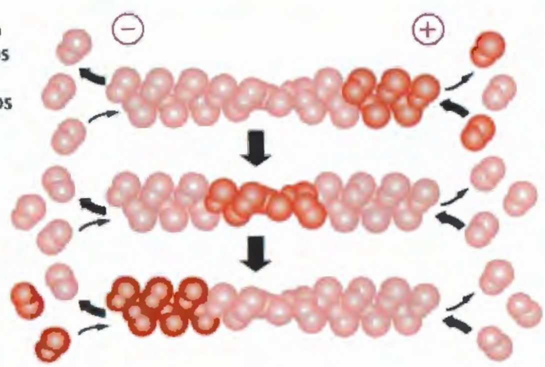
La INESTABILIDAD DINÁMICA y el INTERCAMBIO ROTATORIO son dos comportamientos observados en los polímeros del citoesqueleto. Ambos procesos están asociados con la hidrólisis de nucleótidos trifosfato. Se cree que la inestabilidad dinámica predomina en los microtúbulos mientras que el intercambio rotatorio podría predominar en los filamentos de actina.

INTERCAMBIO ROTATORIO

Una consecuencia de la hidrólisis del nucleótido que acompaña la formación de un polímero es la variación de la concentración crítica en los dos extremos del polímero. Debido a que k^D_{off} y k^T_{on} se refieren a reacciones diferentes, la relación k^D_{off}/k^T_{on} no tiene por qué ser necesariamente la misma en los dos extremos del polímero, siendo:

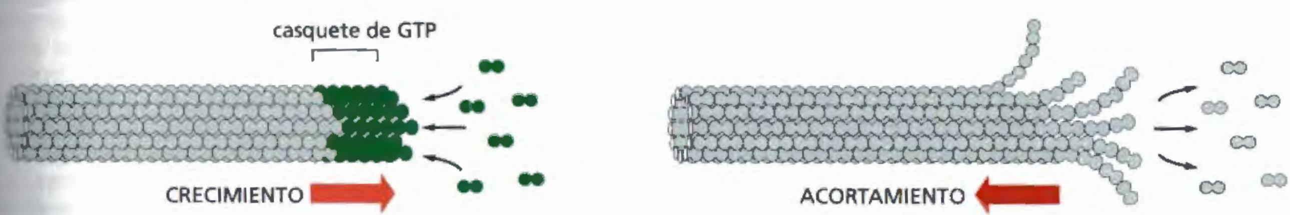
$$C_c \text{ (extremo menos)} > C_c \text{ (extremo más)}$$

Asumiendo que ambos extremos del polímero son accesibles, continuará la polimerización hasta que la concentración del monómero libre supere el valor de C_c para el extremo más, pero esté por debajo de C_c para el extremo menos. En este estado estacionario, las subunidades se ensamblarán al extremo más y se desensamblarán del extremo menos a velocidades idénticas. El polímero mantendrá una longitud constante pero existirá un flujo neto de subunidades a través del polímero, lo que se conoce como intercambio rotatorio.



INESTABILIDAD DINÁMICA

Los microtúbulos se despolimerizan unas 100 veces más rápidamente del extremo que contiene GDP que del extremo que contiene GTP. Un casquete de GTP favorece el crecimiento, pero si se pierde, se produce un acortamiento.



Cada microtúbulo puede alternar periodos de crecimiento lento y de desensamblaje rápido, fenómeno llamado inestabilidad dinámica.

el extremo en forma T y los extremos en forma D es muy grande. Las subunidades de tubulina con el GTP unido al monómero β producen protofilamentos rectos que forman contactos laterales regulares fuertes con otras subunidades. Pero la hidrólisis de GTP a GDP está asociada a un sutil cambio conformacional de la proteína que convierte a los protofilamentos en curvados (Figura 16–16B). En un microtúbulo que esté creciendo rápidamente, el extremo GTP constriñe la curvatura del protofilamento y el extremo parece recto. Pero cuando las subunidades terminales han hidrolizado sus nucleótidos, esta constricción es eliminada y aparece el extremo curvado. Esta liberación cooperativa de la energía de hidrólisis almacenada en el microtúbulo produce un rápido desprendimiento del microtúbulo y, en consecuencia, aparecen anillos y oligómeros curvados de tubulina unida a GTP cerca de los extremos de los microtúbulos en despolimerización (Figura 16–16C).

Los filamentos de actina también sufren fluctuaciones de longitud pero a una escala mucho menor, puesto que en su estado estacionario la longitud fluctúa solamente unas micras o algunos minutos si lo comparamos con las decenas de micras de los microtúbulos en la inestabilidad dinámica. En la mayoría de células eucariotas, se considera que la inestabilidad dinámica predomina en los microtúbulos mientras que el intercambio rotatorio predomina en los filamentos de actina.

El recambio rotatorio y la inestabilidad dinámica facilitan la reorganización rápida del citoesqueleto <AAAT>

Tanto la inestabilidad dinámica como el recambio rotatorio permiten a la célula mantener el mismo contenido de filamentos, mientras que las subunidades oscilan de forma constante entre los filamentos y el citosol. ¿Cuál es el dinamismo de los microtúbulos y de los filamentos de actina dentro de una célula? Un microtúbulo que presente diferencias estructurales importantes entre los extremos en crecimiento y los extremos en disociación, oscila entre crecimiento y disociación cada pocos minutos. Los extremos de los diferentes microtúbulos se pueden observar a tiempo real y estudiar su inestabilidad dinámica (**Figura 16–17**). Debido a su pequeño tamaño y su denso empaquetamiento es mucho más difícil visualizar los extremos de los filamentos de actina individuales en una célula viva. Sin embargo, utilizando técnicas adecuadas basadas en el microscopio de fluorescencia, se puede observar que el recambio de los filamentos de actina es bastante rápido, de forma que cada filamento sólo persiste durante unas pocas decenas de segundos o algunos minutos.

A primera vista, el comportamiento dinámico de los filamentos parece una pérdida de energía. Para mantener constante una concentración de filamentos de actina y de microtúbulos, muchos de los cuales están en proceso de recambio rotatorio o inestabilidad dinámica, la célula tiene que hidrolizar grandes cantidades de nucleósidos trifosfato. Como ya hemos explicado con nuestra analogía inicial de las hormigas, la ventaja de la célula está en la flexibilidad espacial y temporal inherente a un sistema estructural en constante recambio. Las subunidades son pequeñas y pueden difundir con rapidez; una subunidad de actina o de tubulina puede difundir de un lado a otro de una célula eucariota típica en tan sólo uno o dos segundos. Como se ha mencionado, la etapa limitante en la formación de un nuevo filamento es la nucleación, así que estas subunidades de difusión rápida se ensamblan a los extremos de los filamentos preexistentes o en lugares concretos en los que las etapas de nucleación estén catalizadas por proteínas específicas. En cualquier caso, los nuevos filamentos son muy dinámicos y, a menos que sean estabilizados de una forma específica, tienen una existencia efímera. Controlando los lugares de nucleación y de estabilización selectiva, cada célula puede controlar la localización de sus sistemas de filamentos y, por tanto, su estructura. Parece como si la célula estuviese ensayando constantemente una gran variedad de estructuras internas y sólo mantuviese las que le son útiles. Cuando las condiciones externas varían, o cuando aparecen señales internas (como durante las transiciones en el ciclo celular), la célula cambia su estructura de forma rápida (véase Figuras 16–2 a 16–4).

La hidrólisis de los nucleósidos trifosfato ha evolucionado de forma independiente en la actina y la tubulina permitiendo que sus filamentos se despolimericen rápidamente una vez han polimerizado. La actina y la tubulina no están relacionadas en cuanto a su secuencia de aminoácidos: la estructura de la actina tiene una lejana relación con la enzima glucolítica hexoquinasa, mientras que la tubulina también está relacionada de forma muy lejana con una gran familia de GTPasas que incluye las proteínas G heterotriméricas y las GTPasas mo-

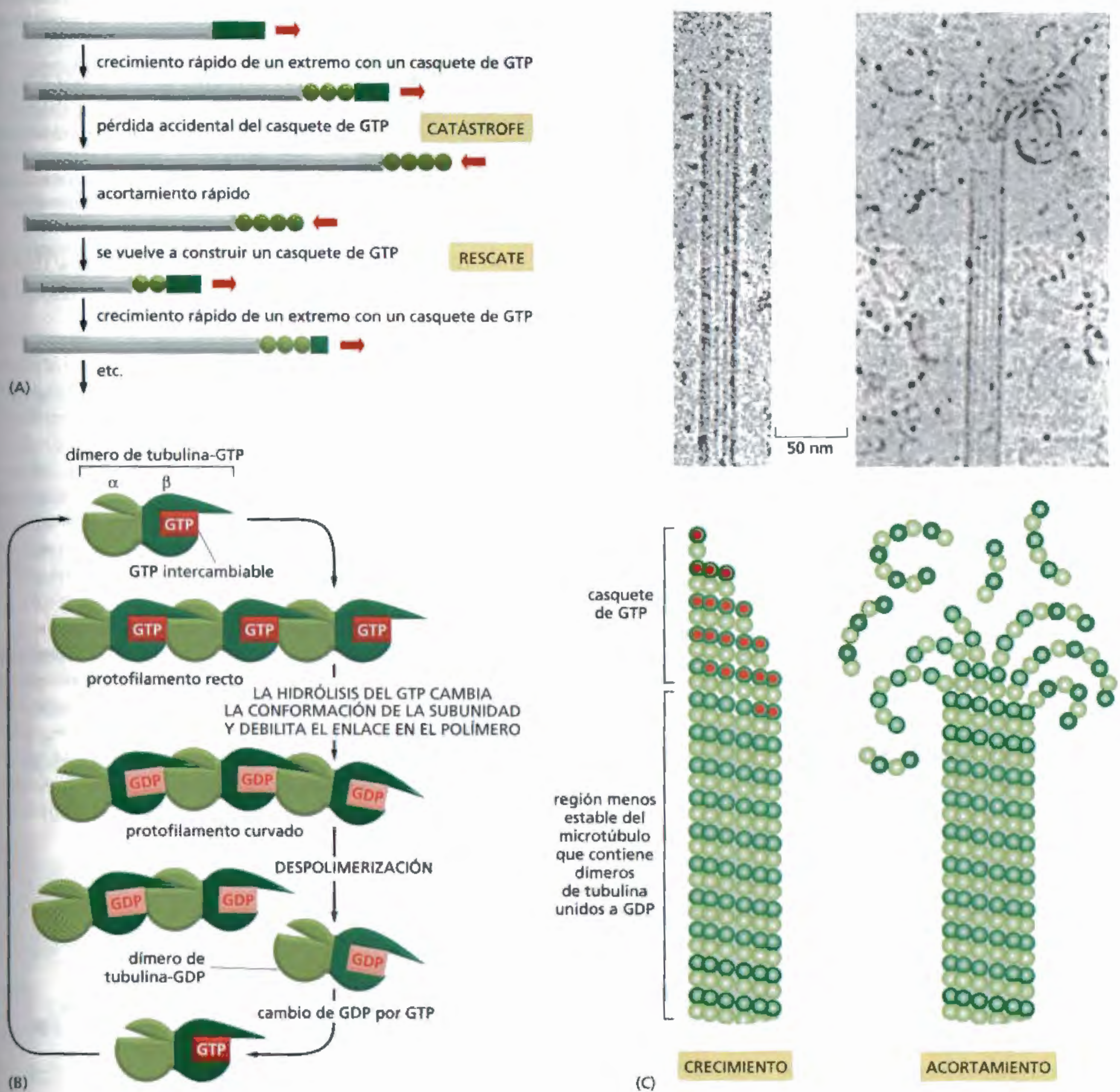


Figura 16–16 La inestabilidad dinámica es debida a las diferencias estructurales entre los extremos de los microtúbulos que crecen y que se acortan. (A) Si la concentración libre de tubulina en solución está entre los valores críticos indicados en la Figura 16–14B, un extremo sencillo de un microtúbulo puede sufrir transiciones entre un estado en crecimiento y un estado de acortamiento. Un microtúbulo en crecimiento tiene en sus extremos subunidades que contienen GTP, formando un casquete de GTP. Si la hidrólisis del nucleótido se produce más rápidamente que la adición de una nueva subunidad, se pierde el casquete y los microtúbulos empiezan a acortarse; este fenómeno se denomina "catástrofe". Pero a este extremo en acortamiento todavía se le pueden unir subunidades que contengan GTP. Si se añaden en cantidad suficiente para formar otro casquete, el microtúbulo crecerá de nuevo, suceso llamado "rescate". (B) Modelo para las consecuencias estructurales de la hidrólisis del GTP en el microtúbulo. La adición de los heterodímeros de tubulina transportando GTP a un extremo del protofilamento provoca el crecimiento en una conformación lineal, lo que favorece el empaquetamiento en la pared cilíndrica del microtúbulo, es decir, lo estabiliza. La hidrólisis del GTP después del ensamblaje cambia la conformación de las subunidades y el protofilamento tiende a deformarse en una forma curvada que es menos capaz de empaquetarse en la pared del microtúbulo. (C) En un microtúbulo intacto, los protofilamentos formados por subunidades que contienen GDP tienden a adoptar una conformación lineal mediante una gran cantidad de enlaces laterales con la pared del microtúbulo, especialmente en el casquete estable de subunidades que contienen GTP. La pérdida del casquete de GTP permite que los protofilamentos que contienen GDP se relajen y adopten su conformación curvada. Este hecho conduce a una disrupción progresiva del microtúbulo y al desensamblaje transitorio de los protofilamentos formando dímeros de tubulina libres. Sobre los esquemas de un microtúbulo creciendo y acortándose, las electromicrografías muestran microtúbulos reales en cada uno de estos dos estados, tal como se observan en preparaciones de hielo vítreo. Obsérvese particularmente la curva de los protofilamentos con GDP en el extremo del microtúbulo que se está acortando. (C, cortesía de E.M. Mandelkow, E. Mandelkow y R.A. Milligan, *J. Cell Biol.* 114:977-991, 1991. Con la autorización de The Rockefeller University Press.)

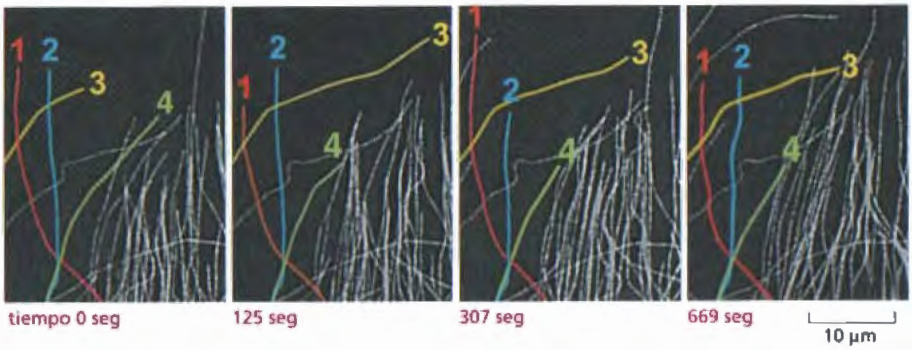


Figura 16–17 Observación directa de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos en una célula viva. <AAAT> Se observaron los microtúbulos de una célula epitelial del pulmón del tritón, después de inyectar en la célula una pequeña cantidad de tubulina marcada con rodamina tal como se muestra en la Figura 16–15. Obsérvese la inestabilidad dinámica de los microtúbulos en el extremo de la célula. Para hacer más comprensible la imagen, se han señalado cuatro microtúbulos; cada uno de ellos muestra acortamientos y crecimientos de forma alterna. (Cortesía de Wendy C. Salmon y Clare Waterman-Storer.)

noméricas tales como Ras (descrito en el Capítulo 3). En ambas familias, el acoplamiento entre la hidrólisis de los nucleótidos y los cambios conformacionales que alteran la función de la proteína parecen ser cambios evolutivos antiguos; sin embargo, el objetivo de ese acoplamiento estructural ha variado a lo largo del tiempo incluyendo la transmisión de señales, la catálisis y la regulación del ciclo de polimerización/despolimerización.

En ciertas estructuras especializadas, algunas regiones del citoesqueleto son menos dinámicas. En una célula totalmente diferenciada, como por ejemplo una neurona, es conveniente que una cierta estructura se mantenga a lo largo del tiempo. Para ello, muchos de sus filamentos de actina y microtúbulos se hallan estabilizados mediante su asociación con otras proteínas. Sin embargo, cuando se tienen que realizar nuevas conexiones en el cerebro, como cuando la información es transferida a la memoria a largo plazo, incluso en una célula tan estable como una neurona tendrán que aparecer nuevas extensiones para realizar nuevas sinapsis. Para ello la neurona necesita disponer de las actividades dinámicas y exploratorias intrínsecas de los filamentos de su citoesqueleto.

La tubulina y la actina han sido altamente conservadas durante la evolución eucariota

La tubulina se encuentra en todas las células eucariotas y existen múltiples isoformas. Las tubulinas humanas tienen secuencias de aminoácidos idénticas a las de las levaduras en un 75%. En los mamíferos existen al menos seis formas de tubulina α y un número parecido de formas de tubulina β, cada una de ellas codificada por un gen distinto. Las distintas formas de tubulina son muy parecidas entre sí y, por lo general, copolimerizarán formando microtúbulos mixtos, al menos en el tubo de ensayo. Sin embargo, en las células pueden tener localizaciones diferentes y, por tanto, realizar funciones sutilmente diferentes. Citemos un ejemplo de interés: los microtúbulos de seis neuronas especializadas sensibles al tacto del nemátodo *Caenorhabditis elegans* contienen una forma específica de tubulina β. Las mutaciones en el gen de esta proteína conducen a la pérdida de la sensibilidad por contacto sin que se produzca ningún otro defecto aparente en el resto de funciones celulares.

De forma parecida a la tubulina, la actina se encuentra en todas las células eucariotas. La mayoría de organismos tienen varios genes que codifican actina; los humanos disponen de seis de estos genes. La actina es una proteína extraordinariamente conservada entre los organismos eucariotas. Por lo general, las secuencias de aminoácidos de las actinas de diferentes especies presentan un 90% de homología. Pero de nuevo, al igual que la tubulina, pequeñas variaciones en la secuencia de aminoácidos de la actina pueden provocar diferencias funcionales significativas. En los vertebrados hay tres isoformas de la actina un poco distintas, llamadas α, β y γ, que se diferencian ligeramente en su secuencia de aminoácidos. La actina α se expresa sólo en las células musculares, mientras que las actinas β y γ se encuentran juntas en casi todas las células no musculares. La actina muscular de las levaduras y de *Drosophila* son idénticas en un 89%, aunque la expresión de la actina de las levaduras en *Drosophila* produce una mosca de apariencia normal pero incapaz de volar.

¿Por qué la secuencia de aminoácidos de la actina y de la tubulina se ha conservado de manera tan estricta durante la evolución eucariota mientras que no ha sucedido lo mismo con las secuencias de otras proteínas del citoesqueleto incluyendo a los filamentos intermedios y a la gran familia de proteínas asociadas? La explicación más sencilla es que la necesidad que un gran número de otras proteínas tengan que interactuar con la superficie de un filamento de actina o microtúbulo ha limitado la variabilidad de estas estructuras. Estudios

genéticos y bioquímicos realizados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* han demostrado que la actina interacciona directamente con docenas de proteínas e indirectamente con muchas otras (**Figura 16–18**). En consecuencia, cualquier mutación que se produjera en la actina, que provocará un cambio deseado en su interacción con una proteína, podría a su vez inducir cambios no deseados en sus interacciones con otras proteínas que se unen al mismo lugar o a un lugar cercano. A lo largo del tiempo, los organismos que han ido evolucionando han encontrado mucho más provechoso mantener la actina y la tubulina y alterar las proteínas de unión a ellas.

La estructura de los filamentos intermedios depende de los enlaces laterales y del sobreenrollamiento

Todas las células eucariotas presentan actina y tubulina. Sin embargo, el tercer tipo en importancia de filamentos del citoesqueleto, los *filamentos intermedios*, sólo forma filamentos citoplasmáticos en algunos metazoos, incluyendo vertebrados, nemátodos y moluscos. Incluso en estos organismos, los filamentos intermedios no son necesarios en el citoplasma de todos los tipos celulares. Las células gliales altamente especializadas (llamadas oligodendrocitos), que fabrican mielina en el sistema nervioso central de los vertebrados, no tienen filamentos intermedios. Los filamentos intermedios son en particular abundantes en el citoplasma de las células sometidas a estrés mecánico y generalmente no se encuentran en animales con exoesqueletos rígidos como los artrópodos o los equinodermos. Parece ser que los filamentos intermedios tienen un papel importante en la transmisión de la fuerza mecánica a los tejidos para los animales blandos.

Los filamentos intermedios citoplasmáticos están íntimamente relacionados con sus ancestros, las *laminas nucleares*, mucho más comunes. Las laminas nucleares son filamentos intermedios, proteínas que forman una red que delimita la membrana interna del núcleo de las células eucariotas, proporcionando lugares de anclaje a los cromosomas y poros nucleares (en el Capítulo 12 se ha descrito su comportamiento dinámico durante la división celular). Algunas veces durante la evolución de los metazoos, los genes de las laminas aparentemente se han duplicado y sus duplicados han evolucionado produciendo los filamentos intermedios citoplasmáticos parecidos a cuerdas

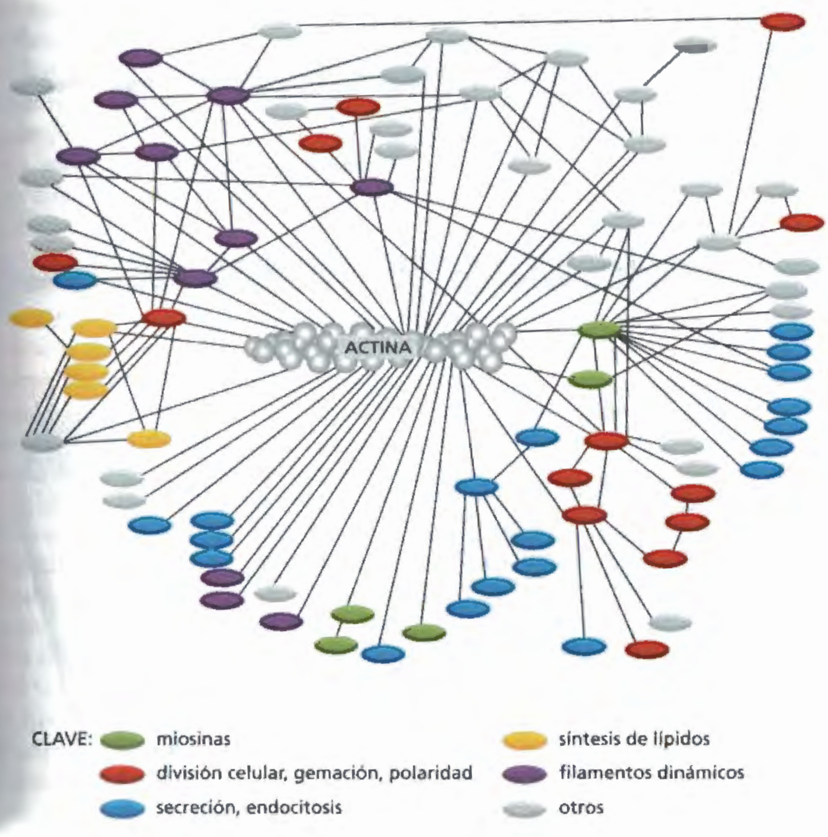


Figura 16–18 La actina en una encrucijada de caminos. En todas las células eucariotas la actina se une a una gran variedad de proteínas accesorias. El esquema muestra la mayoría de las interacciones que han sido demostradas, ya sea usando técnicas genéticas o bioquímicas, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Las proteínas accesorias que actúan en los mismos procesos intracelulares se han representado con el mismo color, como se indica en la clave. (Adaptado de D. Botsein et al., en The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces* [J.R. Broach, J.R. Pringle, E.W. Jones, eds.], Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991.)

Los polipéptidos individuales de los **filamentos intermedios** son moléculas alargadas, que presentan un dominio central en hélice α que se enrosca con otro monómero igual formando una súperhélice. Entonces, un par de dímeros paralelos se asocian de modo antiparalelo formando un tetrámero inestable. Este tetrámero representa la subunidad soluble que sería análoga al dímero de tubulina αβ o al monómero de actina (**Figura 16–19**). A diferencia de la actina y la tubulina, las subunidades de los filamentos intermedios no tienen ningún lugar de unión para nucleósidos trifosfato.

La subunidad tetramérica está formada por dos dímeros apuntando hacia direcciones opuestas, por lo que sus dos extremos son iguales. Por tanto, el filamento intermedio una vez ensamblado no tiene la polaridad estructural que es crítica para los filamentos de actina y los microtúbulos. Los tetrámeros se empaquetan lateralmente entre sí dando lugar al filamento, formado por ocho protofilamentos en paralelo constituidos por tetrámeros. Entonces, cada filamento intermedio tiene una sección transversal de 32 hélices enrolladas. Este gran número de polipéptidos alineados, unidos entre sí mediante interacciones hidrofóbicas laterales fuertes típicas de las proteínas con sobreenrollamientos, proporciona a los filamentos intermedios su apariencia de cuerda. Se pueden deformar fácilmente, con una longitud continua menor de una micra (comparada con los milímetros de los microtúbulos o las cerca de diez micras de la actina) pero es muy difícil romperlos.

Todavía se tiene muy poca información acerca del mecanismo de ensamblaje y desensamblaje de los filamentos intermedios, si lo comparamos con el conocimiento acerca de los microtúbulos y de los filamentos de actina, pero algunos tipos de filamentos intermedios incluyendo a la *vimentina* forman estructuras altamente dinámicas en células tales co-

Figura 16–19 Modelo para la formación de un filamento intermedio. <GCCA> El monómero mostrado en (A) se empareja con un monómero idéntico a él, formando un dímero (B), de forma que la región central –conservada– se alinea en paralelo y se empaqueta conjuntamente formando un sobreenrollamiento. (C) Dos dímeros se alinean, lado contra lado, y forman un tetrámero antiparalelo de cuatro cadenas polipeptídicas. El tetrámero es la subunidad soluble de los filamentos intermedios. (D) Dentro de cada tetrámero los dímeros están suficientemente distanciados uno de otro, lo que les permite la asociación con otro tetrámero. (E) En el filamento intermedio final de 10 nm, los tetrámeros están unidos y forman un haz helicoidal que dispone de 16 dímeros (32 superenrollamientos) en sección transversal. La mitad de estos dímeros apuntan en cada sentido. En el margen superior izquierdo se muestra una electromicrografía del filamento final. (Electromicrografía por cortesía de Roy Quinlan.)

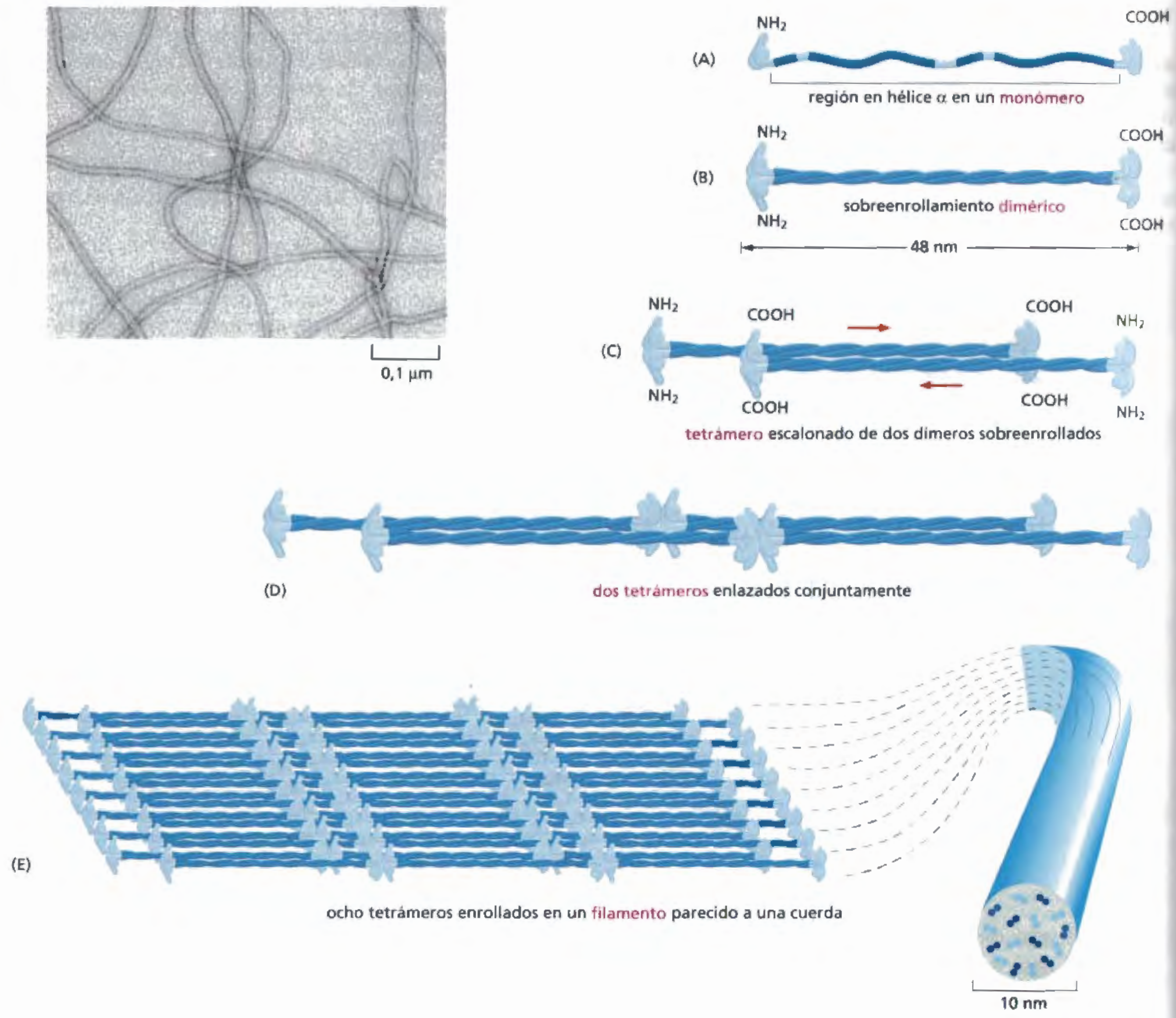


Tabla 16–1 Principales tipos de proteínas de los filamentos intermedios (FI) en las células de los vertebrados

TIPOS DE FI	COMPONENTE POLIPEPTÍDICO	LOCALIZACIÓN
Nuclear	laminas A, B y C	lámina nuclear (revestimiento interno de la envuelta nuclear)
Proteínas relacionadas con la vimentina	vimentina	muchas células de origen mesenquimático
	desmina	músculo
	proteína glial acídica fibrilar	células gliales (astrocitos y algunas células de Schwann)
	periferina	algunas neuronas
Epitelial	queratinas tipo I (ácidas) queratinas tipo II (básicas)	células epiteliales y sus derivados (p. ej., el pelo y las uñas)
Axonal	proteínas de los neurofilamentos (NF-L, NF-M y NF-H)	neuronas

los fibroblastos. En condiciones normales es probable que su desensamblaje está regulado por la fosforilación de proteínas, de la misma forma que la fosforilación regula el desensamblaje de las laminas nucleares en la mitosis (véase Figura 12–20). Lo que evidencia su rápido recambio es que subunidades marcadas microinyectadas en células en cultivo son rápidamente incorporadas a los filamentos intermedios preexistentes –en cuestión de minutos– mientras que la inyección de péptidos derivados de las regiones helicoidales conservadas de las subunidades induce un rápido desensamblaje de la red de filamentos intermedios. Es interesante destacar que esta microinyección también puede inducir el desensamblaje de la red de microtúbulos y de filamentos de actina en algunas células que disponen de los tres tipos de redes de filamentos, lo cual demuestra que en estas células existe una integración mecánica fundamental entre los tres sistemas del citoesqueleto.

Los filamentos intermedios proporcionan estabilidad mecánica a las células animales

Existen una gran variedad de formas de filamentos intermedios, los cuales además presentan bastantes más variaciones de secuencia en sus isoformas que las que existían en las isoformas de actina y de tubulina. Cada dominio central en hélice α tiene 40 o más motivos heptaméricos repetidos, que forman una gran estructura sobreenrollada (véase Figura 3–9). Las diferentes isoformas tienen este dominio muy parecido, pero los dominios globulares N- y C- de los extremos pueden ser muy variados.

Los diferentes tipos celulares expresan familias distintas de filamentos intermedios (**Tabla 16–1**). Las **queratinas** son la familia de filamentos intermedios más diversa; en las células epiteliales humanas hay cerca de 20 tipos distintos y cerca de 10 más son específicas de las uñas y del cabello; el análisis de la secuencia del genoma humano ha revelado que podrían existir cerca de 50 queratinas distintas. Cada filamento de queratina está formado por una cantidad idéntica de cadenas de queratina de tipo I (ácidas) y de tipo II (neutras/básicas); forman heterodímeros, que se unen dos a dos formando la subunidad tetramérica fundamental (véase Figura 16–19). Las redes de queratina entrelazadas se mantienen unidas mediante enlaces disulfuro y pueden sobrevivir incluso después de la muerte de sus células, formando cubiertas resistentes en los animales como es el caso de las capas externas de la piel y del cabello, las uñas, las garras y las escamas. La diversidad de las queratinas es clínicamente muy útil para el diagnóstico de los cánceres epiteliales (carcinomas), puesto que el patrón particular de queratinas expresado proporciona una indicación del tejido epitelial en el que puede haberse originado el cáncer, lo cual puede ser de gran ayuda para escoger el tratamiento más adecuado.

Una sola célula epitelial puede producir varios tipos de queratinas y éstas copolimerizan en la misma red de filamentos (**Figura 16–20**). Los filamentos de queratina proporcionan fuerza mecánica a los tejidos epiteliales en parte porque anclan los filamentos intermedios en los puntos de contacto célula-célula, llamados *desmosomas*, o en los contactos célula-matriz, llamados *hemidesmosomas* (véase Figura 16–5). Estas importantes estructuras de adhesión se describen con más detalle en el Capítulo 19.

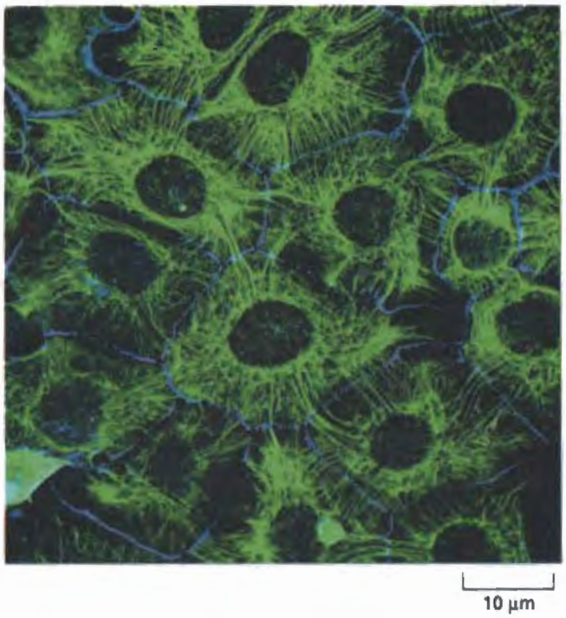
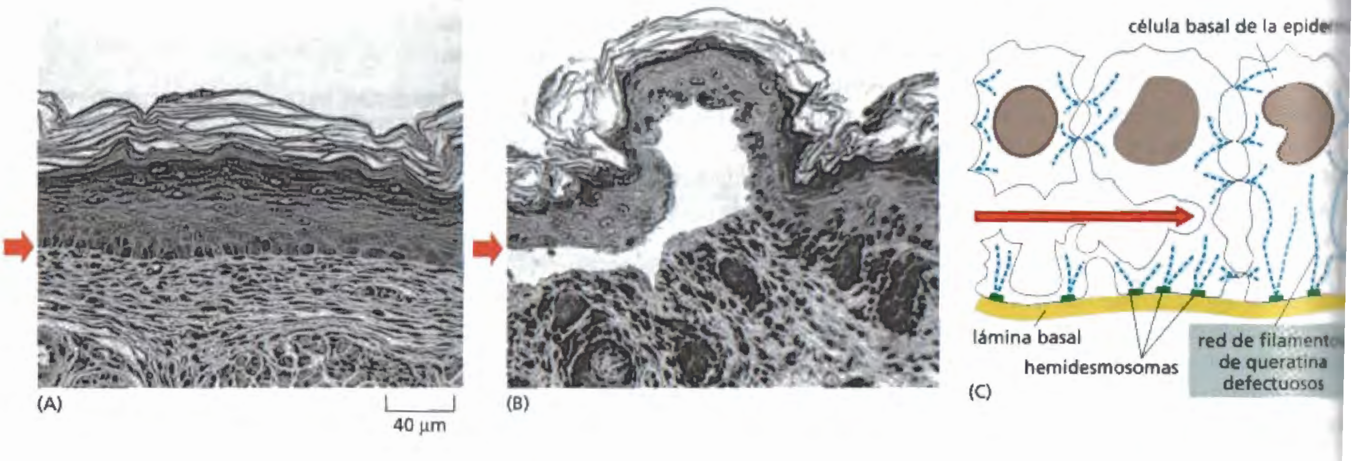


Figura 16-20 Los filamentos de queratina en las células epiteliales. Micrografía de inmunofluorescencia de la red de filamentos de queratina (*verde*) en una capa de células epiteliales en cultivo. Los filamentos de cada célula están conectados a los de las células vecinas a través de desmosomas (descrito en el Capítulo 19). Se ha marcado una segunda proteína (*azul*) para revelar las uniones celulares. (Cortesía de Kathleen Green y Evangeline Amargo.)

Las mutaciones en los genes que codifican las queratinas provoca algunas enfermedades genéticas humanas. Por ejemplo, cuando se expresan queratinas anormales en las capas basales de la epidermis, se produce un trastorno conocido como *epidermolisis bullosa simple*, en la que la piel se descama en respuesta a un estrés mecánico muy débil, el cual rompe las células basales (**Figura 16-21**). Existen otros tipos de enfermedades parecidas entre las que se encuentran desórdenes de los epitelios que revisten el esófago, la boca y la córnea del ojo; están causados por mutaciones en diferentes queratinas cuya expresión es específica de estos tejidos. Todas estas enfermedades se caracterizan por una rotura celular como consecuencia de una lesión mecánica y una desorganización o alteración del citoesqueleto de filamentos de queratina. Muchas de las mutaciones específicas que pueden producir estas enfermedades alteran los extremos del dominio central, demostrando la importancia de esta zona especial de la proteína para el correcto ensamblaje del filamento.

Un segundo tipo de filamentos intermedios, denominados **neurofilamentos**, se encuentran en concentraciones elevadas a lo largo de los axones de las neuronas de los vertebrados (**Figura 16-22**). *In vivo* se ensamblan conjuntamente tres tipos de proteínas de neurofilamentos (NF-L, NF-M, NF-H) formando heteropolímeros que contienen NF-L y uno de los otros dos monómeros. Las proteínas NF-H y NF-M tienen dominios C-terminales muy largos que se unen a los filamentos vecinos y generan estructuras alineadas con un espacio entre filamentos uniforme. Durante el crecimiento axonal se incorporan nuevas subunidades de neurofilamento a lo largo del axón, en un proceso dinámico que implica la unión de nuevas subunidades a lo largo del neurofilamento y también la unión de subunidades a los extremos del filamento. Después de que un axón crezca y conecte con su célula diana, el

Figura 16-21 Aparición de ampollas en la piel provocadas por un gen mutante de la queratina. Un gen mutante que codifica una queratina truncada (sin dominios amino ni carboxilo-terminales) fue expresado en un ratón transgénico. La proteína defectuosa se ensambló con las moléculas de queratina normales y desorganizó la red de filamentos de queratina en las células basales de la piel. Micrografías ópticas de piel normal (A) y de piel mutante (B) muestran que las ampollas se producen a partir de la ruptura de las células de la capa basal de la epidermis mutante (flechas *rojas* cortas). (C) Un esquema de tres células de la capa basal de la epidermis mutante observadas con microscopía electrónica. Las células se rompen (flecha *roja*) entre el núcleo y los hemidesmosomas (tratado en el Capítulo 19), que conectan los filamentos de queratina con la lámina basal subyacente. (De P.A. Coulombe, M.E. Hutton, R. Vassar y E. Fuchs, *J. Cell Biol.* 115:1661-1674, 1991. Con autorización de The Rockefeller University Press.)



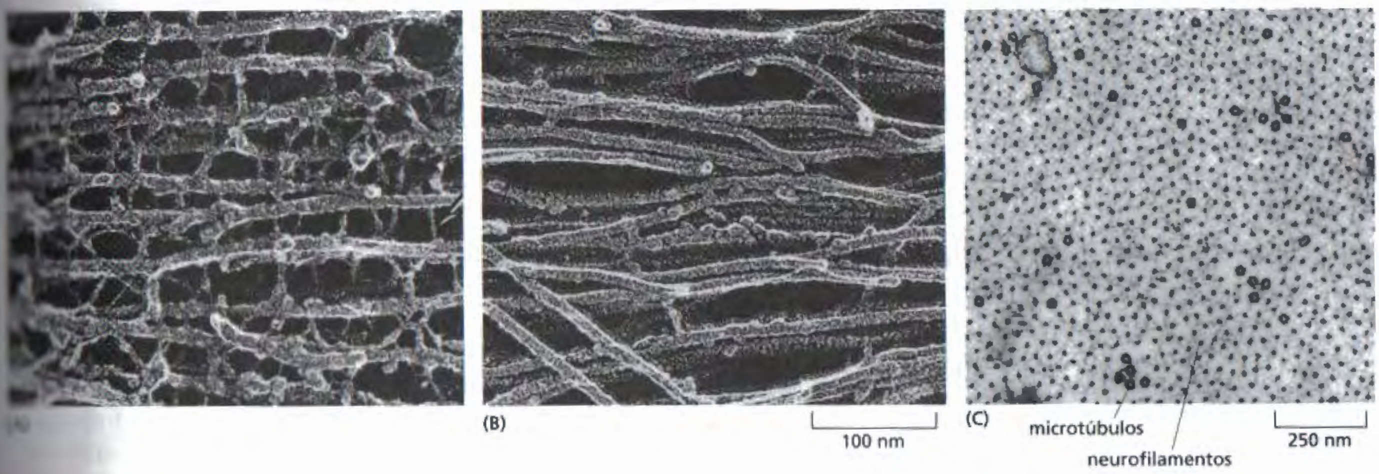


Figura 16–22 Dos tipos de filamentos intermedios en células del sistema nervioso. (A) Imagen de neurofilamentos preparados mediante congelación rápida y sublimación profunda del axón de una célula nerviosa que muestra el extraordinario entrecruzamiento de los haces a través de puentes de proteína –una configuración que probablemente proporciona una gran resistencia a la tensión en este largo apéndice celular. Las uniones cruzadas están formadas por largas extensiones no helicoidales del extremo C-terminal de las proteínas más grandes del neurofilamento (NF-H). (B) Imagen de filamentos gliales en una célula glial obtenida mediante congelación rápida y sublimación profunda, que ilustran que estos filamentos son lisos y tienen menos puentes cruzados. (C) Electromicrografía convencional de un corte de un axón que muestra la distancia de separación regular de los neurofilamentos, mucho más abundantes que los microtúbulos. (A y B, por cortesía de Nobutaka Hirokawa; C, por cortesía de John Hopkins.)

diámetro del axón puede aumentar más de cinco veces. Parece ser que el nivel de expresión del neurofilamento está directamente controlado por el diámetro axonal, que a su vez influencia la velocidad a la que viaja la señal eléctrica a lo largo del axón.

La enfermedad neurodegenerativa llamada esclerosis lateral amiotrófica (ALS: *amyotrophic lateral sclerosis*, o enfermedad de Lou Gehrig) está asociada a una acumulación y a un ensamblaje anormal de neurofilamentos en los somas celulares y axones de las neuronas motoras, que puede interferir en el transporte axonal normal. La degeneración de los axones comporta debilidad muscular y atrofia, que normalmente resulta fatal. La sobreexpresión de las proteínas humanas NF-L o NF-H en un ratón ha comportado la aparición de una enfermedad parecida a la ALS.

Los filamentos de vimentina son el tercer tipo de filamentos intermedios. La desmina, un miembro de esta familia, se expresa en el músculo liso, cardíaco y esquelético. Un ratón sin desmina presenta inicialmente un desarrollo muscular normal, pero en la edad adulta se presentan diversas anormalidades en las células musculares, incluyendo fibras por completo desordenadas.

Diferentes compuestos pueden alterar la polimerización de los filamentos

Dado que la supervivencia de las células eucariotas depende de un equilibrio entre el ensamblaje y el desensamblaje de los altamente conservados filamentos del citoesqueleto formados por actina y tubulina, estos dos tipos de filamentos son con frecuencia diana de toxinas naturales. Estas toxinas son producidas como autodefensa por plantas, hongos o esponjas que no desean ser comidos pero no pueden "alejarse de los depredadores; por lo general alteran las reacciones de polimerización de los filamentos. La toxina se une fuertemente ya sea al propio filamento o a la subunidad libre que forma el polímero, dirigiendo la reacción de ensamblaje en la dirección que favorece la formación de la forma a la cual se une la toxina. Por ejemplo, el compuesto *latrunculina*, extraído de la esponja marítima *Latrunculina magnifica*, se une a los monómeros de actina e impide su ensamblaje en filamentos; en consecuencia, produce una despolimerización neta de los filamentos de actina. Al contrario, la *faloidina*, del hongo *Amanita phalloides* se une y estabiliza los filamentos de actina, produciendo un incremento neto de la polimerización de la actina. Esta seta, de aspecto atractivo aunque no comestible, también expresa otro tipo de toxina mortal, la α-amanitina, un inhibidor de la polimerasa II del RNA. Cualquier cambio en los filamentos de actina es muy tóxico para las células. De forma parecida, la *colchicina*, extraída del azafrán de otoño (o azafrán silvestre), se une y estabiliza a las subunidades de tubulina libres, provocando la despolimerización de los microtúbulos. Al contrario, el *taxol*, extraído de la corteza del tejo, se une y estabiliza a los microtúbulos, e incrementa la polimerización de la tubulina. En la **Tabla 16–2** se recogen estos y otros productos naturales, muy utilizados en biología celular para manipular el citoesqueleto.

Compuestos como estos tienen un rápido y profundo efecto en la organización del citoesqueleto de las células vivas (**Figura 16–23**). Han proporcionado las primeras evidencias de que el citoesqueleto es una estructura dinámica, mantenida por un recambio rápido y

Tabla 16–2 Fármacos que afectan a los filamentos de actina y a los microtúbulos

COMPUESTOS ESPECÍFICOS DE ACTINA	
Faloidina	se une y estabiliza los filamentos
Citocalasina	encasqueta los extremos más de los filamentos
Suinholida	fragmenta filamentos
Latrunculina	se une a las subunidades e impide su polimerización
COMPUESTOS ESPECÍFICOS DE LOS MICROTÚBULOS	
Taxol	se une y estabiliza los microtúbulos
Colchicina, colcemida	se une a las subunidades e impide su polimerización
Vinblastina, vincristina	se une a las subunidades e impide su polimerización
Nocodazol	se une a las subunidades e impide su polimerización

continuo de subunidades entre las formas filamentosas y las formas solubles, y de que este flujo de subunidades es necesario para la función normal del citoesqueleto.

Los compuestos que se mencionan en la Tabla 16–2 se utilizan en biología celular para estudiar la posible participación de la actina y de los microtúbulos en muchos procesos celulares. Algunos de ellos también están siendo utilizados para el tratamiento del cáncer. Tanto los compuestos que despolimerizan los microtúbulos (como la vinblastina), como los que polimerizan los microtúbulos (como el taxol), pueden matar a las células en división puesto que tanto el ensamblaje como el desensamblaje de los microtúbulos son cruciales para el funcionamiento correcto del huso mitótico (tratado más adelante en este capítulo). Estos compuestos son eficientes para matar las células de ciertos tipos de tumores de pacientes humanos, a pesar de producir toxicidad sobre las células normales en división, incluyendo las de la médula ósea roja, el intestino y los folículos pilosos. Concretamente, el taxol ha sido muy utilizado para tratar el cáncer de mama y el cáncer de pulmón y funciona con éxito en el tratamiento de tumores que son resistentes a otros agentes de quimioterapia.

La organización celular de las bacterias y la división celular dependen de homólogos del citoesqueleto eucariota

Mientras que normalmente las células eucariotas son grandes y poseen una morfología compleja, las células de las bacterias por lo general sólo miden unas cuantas micras de lon-

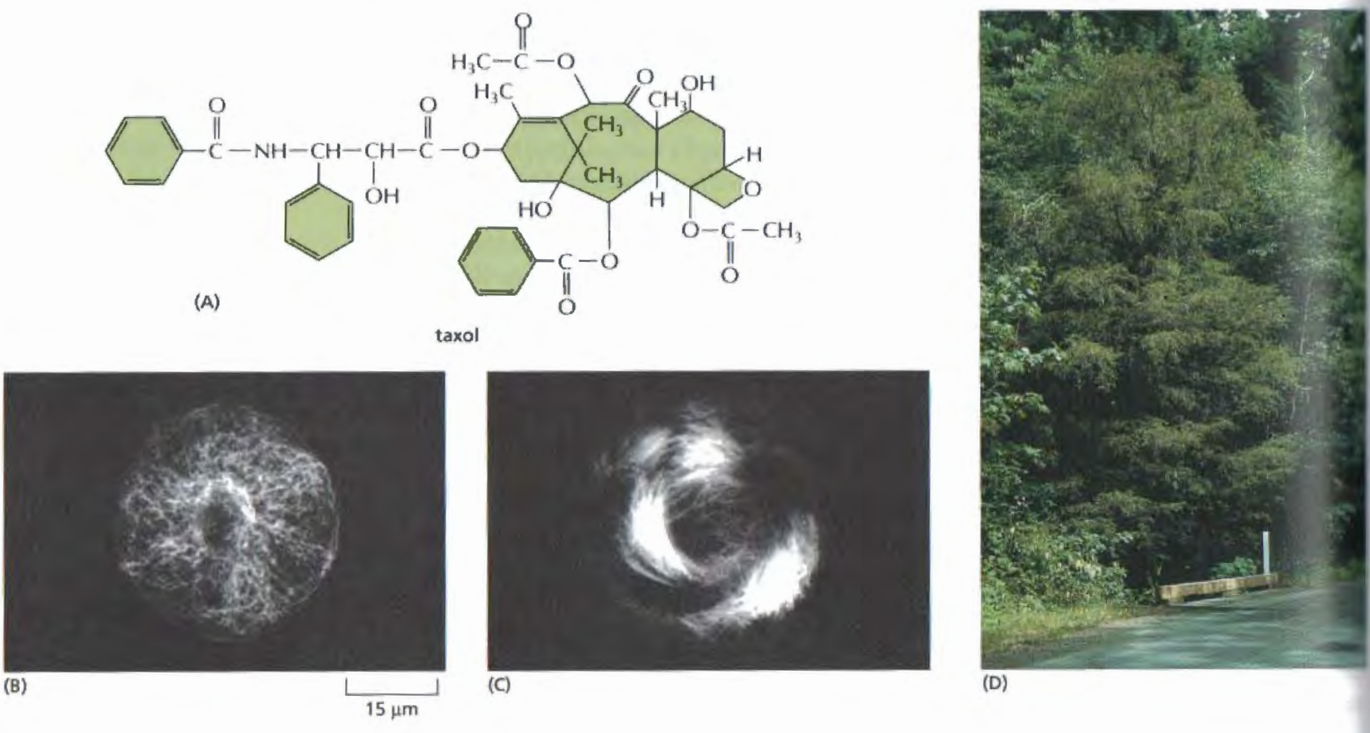


Figura 16–23 Efecto del compuesto taxol sobre la organización de los microtúbulos. (A) Estructura molecular del taxol. De forma reciente, mediante química orgánica se ha podido sintetizar esta compleja molécula, ampliamente utilizada para el tratamiento de diversos cánceres. (B) Micrografía de inmunofluorescencia que muestra la organización de los microtúbulos en una célula epitelial hepática antes de añadir el taxol. (C) Organización de los microtúbulos en el mismo tipo celular después del tratamiento con taxol. Obsérvese el grueso círculo formado por haces de microtúbulos alrededor de la periferia celular. (D) Tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*), la fuente natural del taxol. (B, C de N.A. Gloushankova et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:8597-8601, 1994. Con la autorización de National Academy of Sciences; D, cortesía de A.K. Mitchell 2001. © Her Majesty the Queen in Right of Canada, Canadian Forest Service.)



Figura 16–24 La proteína bacteriana FtsZ, un homólogo de la tubulina en los procariotas. (A) Una banda de proteína FtsZ forma un anillo en una célula bacteriana en división. Este anillo ha sido marcado fusionando la proteína FtsZ con una proteína fluorescente verde (GFP) y se ha observado las células vivas de *E. coli* con un microscopio de fluorescencia. La fotografía *superior* muestra la imagen lateral del anillo como una barra central de la célula en división. En la fotografía *inferior*, la imagen girada, muestra la estructura del anillo. (B) Los anillos y filamentos de FtsZ, formados *in vitro*, observados con el microscopio electrónico. Compárese esta imagen con la de los microtúbulos mostrados a la *derecha* en la Figura 16–16C. (A, de X. Ma., D.W. Ehrhardt y W. Margolin, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 93:12998-13003, 1996. B, de H. A. Erickson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:519-523, 1996. Con la autorización de National Academy of Sciences.)

gitud y adoptan formas sencillas y modestas como esferas o cuerdas. Las bacterias tampoco disponen de la elaborada red de orgánulos rodeados de membrana como el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi. Durante muchos años, los biólogos consideraron que la falta de citoesqueleto bacteriano era una de las razones de estas espectaculares diferencias de la organización celular entre el mundo eucariota y el bacteriano. Esta consideración cambió con el descubrimiento a principios de la década de 1990 de que casi todas las bacterias y la mayoría de las arqueas presentan un homólogo de la tubulina, FtsZ, que puede polimerizar formando filamentos que se ensamblan en forma de anillo (llamado anillo Z) en el lugar donde se forma la pared celular durante la división celular (**Figura 16–24**).

La estructura plegada tridimensional de la proteína FtsZ es muy parecida a la estructura de la tubulina α o de la tubulina β y, al igual que la tubulina, la hidrólisis del GTP se produce durante la polimerización y provoca cambios conformacionales en la estructura del filamento. Aunque el anillo Z se mantiene durante unos cuantos minutos, sus filamentos individuales son altamente dinámicos, con una vida media aproximada de treinta segundos. Mientras la bacteria se divide, el anillo Z disminuye hasta desensamblarse por completo, y se considera que la ruptura del anillo Z puede contribuir a la invaginación de la membrana necesaria para que se produzca la división celular. El anillo Z también es el lugar donde se localizan las enzimas especializadas en la síntesis de la pared celular necesarias para la formación del septo entre las dos células hijas. Las subunidades de FtsZ desensambladas, se reensamblan de nuevo más tarde en los nuevos lugares de formación de la pared celular en las células hijas (**Figura 16–25**).

Más recientemente se ha descubierto que las bacterias también disponen de proteínas homólogas a la actina. Dos de estas, MreB y Mbl se encuentran en las células con forma de espiral o de bastón y las mutaciones que disminuyen su expresión provocan anormalidades en la forma celular y defectos en la segregación de los cromosomas (**Figura 16–26**). Los filamentos MreB y Mbl se ensamblan *in vivo* formando grandes espirales que se extienden a lo largo de la célula y parece que contribuyen a la determinación de la forma de la célula sirviendo de esqueleto para dirigir la síntesis de los peptidoglicanos de la pared celular, de la misma forma que los microtúbulos contribuyen a organizar la síntesis de celulosa en la pa-

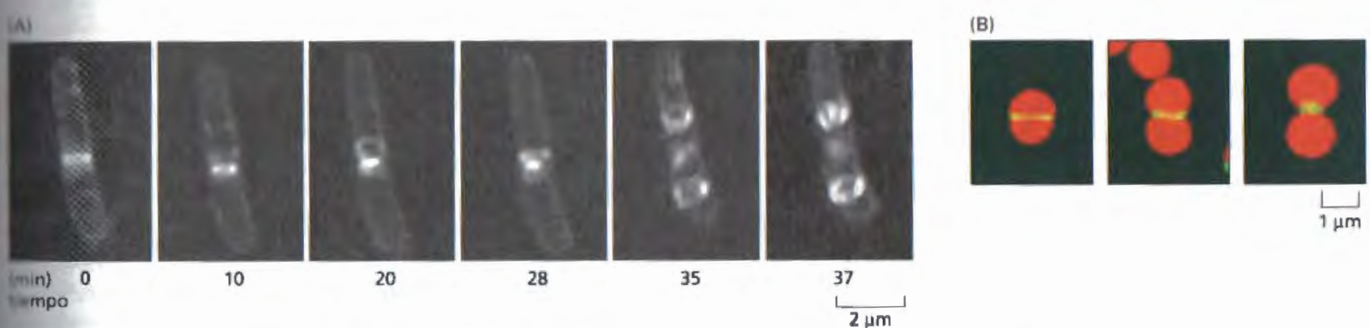


Figura 16–25 Readaptaciones rápidas de FtsZ a través del ciclo celular bacteriano. (A) Al finalizar la segregación de los cromosomas, el anillo formado por FtsZ en el centro de la célula disminuye mientras la célula se divide en dos, igual que el anillo contráctil formado por filamentos de actina y miosina en las células eucariotas. Los filamentos de FtsZ que se han desensamblado cuando las células se separan, se reensamblan de nuevo formando dos nuevos anillos en el centro de las dos células hijas. (B) Los cloroplastos en división (*rojo*) del alga roja también utilizan un anillo proteico formado por FtsZ (*amarillo*) para dividirse. (A, de Q. Sun y W. Margolin, *J. Bacteriol.* 180:2050-2056, 1998. Con la autorización de American Society for Microbiology; B, de S. Miyagishima et al., *Plant Cell* 13:2257-2268, 2001. Con la autorización de American Society of Plant Biologists.)

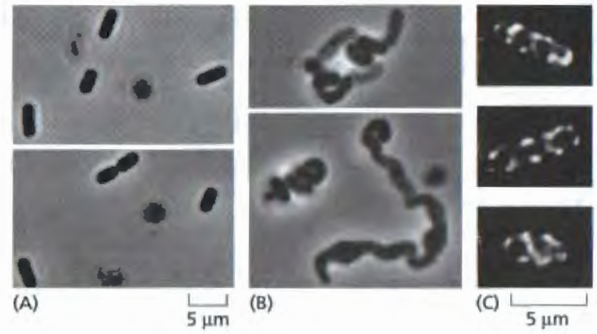


Figura 16-26 **Proteínas homólogas a la actina determinan la forma celular en las bacterias.** (A) La bacteria común del suelo *Bacillus subtilis* normalmente forma células con una forma de bastón regular. (B) Las células de *B. subtilis* que han perdido la proteína homóloga de actina Mbl crecen formando tubos contorneados y finalmente mueren. (C) La proteína Mbl forma largas hélices formadas por muchos filamentos cortos que se distribuyen a lo largo de la célula bacteriana y participan en el direccionamiento de la síntesis de la pared celular. (De L.J. Jones, R. Carbadillo-Lopez y J. Errington, *Cell* 104:913-922, 2001. Con la autorización de Elsevier.)

red celular vegetal de las plantas superiores (véase Figura 19-82). De forma parecida a FtsZ, los filamentos en las espirales de MreB y Mbl son altamente dinámicos, con una vida media de unos pocos minutos; como en el caso de la actina, la hidrólisis del ATP acompaña el proceso de polimerización.

Otros familiares de MreB y Mbl tienen funciones más especializadas. Un homólogo bacteriano de la actina en particular interesante es ParM, codificado en ciertos plásmidos bacterianos que disponen de los genes responsables a la resistencia a los antibióticos y que frecuentemente provocan la expansión de la resistencia a múltiples fármacos en las epidemias. Los plásmidos bacterianos codifican por lo general todos los productos génicos necesarios para su propia segregación como estrategia que asegura una fiel herencia y propagación dentro de sus huéspedes bacterianos. *In vivo*, ParM se ensambla en una estructura de filamentos cuyos extremos se asocian con una copia del plásmido que codifica; el crecimiento del filamento ParM parece empujar al plásmido replicado igual que un huso mitótico funcionando a la inversa (**Figura 16-27**). Aunque ParM es un homólogo estructural de la actina, su comportamiento dinámico es significativamente diferente. Los filamentos de ParM sufren una importante inestabilidad dinámica *in vitro*, mucho más parecida a los microtúbulos que a los filamentos de actina en su manera de crecer y romperse. La estructura semejante a un huso parece que se forma por la estabilización selectiva de filamentos nucleados de forma espontánea que se unen a proteínas especializadas reclutadas en los orígenes de replicación de los plásmidos.

Los diversos homólogos bacterianos de la actina comparten estructuras moleculares similares pero el parecido en la secuencia de sus aminoácidos es muy bajo (~10-15% de residuos idénticos). Se ensamblan en filamentos con distintos patrones de empaquetamiento de las hélices, que a su vez presentan comportamientos dinámicos distintos. En vez de utilizar a la misma actina conservada para distintos propósitos como hacen las células eucariotas, las bacterias han preferido que sus homólogos de actina proliferen y se especialicen en propósitos distintos.

Ahora parece evidente que todas las células usan el principio general de organizar una estructura celular mediante la autoasociación de proteínas unidas a nucleótidos en filamentos helicoidales dinámicos, y que las dos familias más importantes de actina y tubulina son ancestrales, probablemente anteriores a la separación entre los reinos eucariota y bacteriano. Sin em-

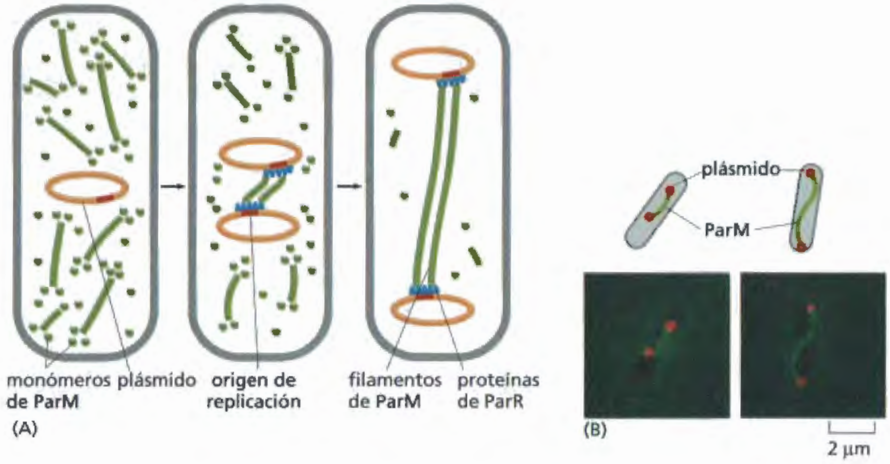


Figura 16-27 **Papel que tiene la proteína homóloga de actina ParM en la segregación de los plásmidos.** (A) Algunos plásmidos bacterianos resistentes a fármacos (*amarillo*) codifican una proteína homóloga a la actina, ParM, que nucleará de forma espontánea formando pequeños y dinámicos filamentos (*verde*) en todo el citoplasma bacteriano. Una segunda proteína codificada por el plásmido (*azul*) se une a secuencias específicas de DNA en el plásmido y también estabiliza los extremos dinámicos de los filamentos de ParM. Cuando el plásmido se ha duplicado y los filamentos de ParM se estabilizan en ambos extremos, estos crecen y empujan a los plásmidos duplicados hacia ambos extremos de la célula. (B) En estas células bacterianas que incorporan un plásmido de resistencia a fármacos, los plásmidos se han marcado en *rojo* y la proteína ParM en *verde*. A la izquierda, un haz corto de ParM conecta a los dos plásmidos hijos rápidamente tras la duplicación. A la derecha, un filamento de ParM totalmente ensamblado ha empujado a los plásmidos duplicados hacia los polos celulares. (A, adaptado de E.C. Garner, C.S. Campbell y R.D. Mullins, *Science* 306:1021-1025, 2004. Con la autorización de AAAS; B, de J. Moller-Jensen et al., *Mol Cell* 12:1477-1487, 2003. Con la autorización de Elsevier.)

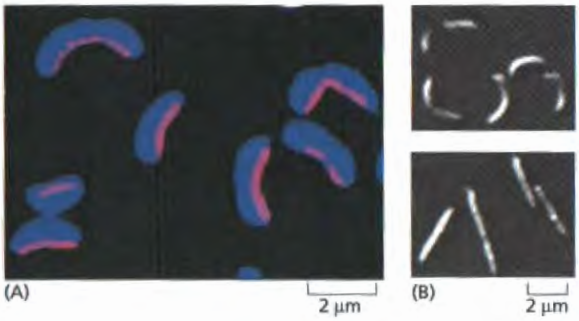


Figura 16–28 *Caulobacter* y crescentina. La bacteria en forma de hoz *Caulobacter crescentus* expresa una proteína con una serie de dominios de sobreenrollamiento similares en tamaño y organización a los dominios de los filamentos intermedios eucariotas. En las células, la proteína crescentina forma una fibra que rodea la cara interna de la curvilínea pared celular bacteriana. Cuando el gen no es correcto, la bacteria es viable pero crece en forma de bastón recto. (De N. Ausmees, J.R. Kuhn y C. Jacobs-Wagner, *Cell* 115:705-713, 2003. Con la autorización de Elsevier.)

Luego, el uso que hacen las bacterias de su citoesqueleto es algo distinto al de sus homólogos eucariotas. Por ejemplo, en las bacterias es la tubulina (FtsZ) la que participa en la *citocinesis* (separando a la célula en división en dos células hijas), mientras que en las células eucariotas es la actina la responsable de este proceso. Al contrario, los microtúbulos eucariotas son los responsables de la segregación de los cromosomas, mientras que las actinas bacterianas (ParM y posiblemente MreB) cooperan en la segregación del DNA replicado en las bacterias.

Al menos una especie de bacterias con una forma poco usual de media luna, *Caulobacter crescentus*, parece esconder una proteína con un parecido estructural significativo con la tercera familia de filamentos del citoesqueleto de las células animales, los filamentos intermedios. Una proteína llamada crescentina forma una estructura filamentosa que parece influir en la forma de la célula; cuando el gen que codifica la crescentina es eliminado, las células de *Caulobacter* crecen como hileras de bastones (**Figura 16–28**).

Puesto que ahora sabemos que las bacterias presentan sofisticados citoesqueletos dinámicos, ¿por qué han mantenido unas formas tan pequeñas y simples? De momento no se han identificado *proteínas motoras* que viajen a lo largo de los filamentos bacterianos; quizás la evolución de las proteínas motoras constituye una etapa crítica para la elaboración morfológica de los eucariotas.

Resumen

El citoplasma de las células eucariotas está organizado espacialmente por una red de filamentos proteicos conocida como citoesqueleto. Esta red contiene tres tipos principales de filamentos: los microtúbulos, los filamentos de actina y los filamentos intermedios. Los tres tipos de filamentos se forman como ensamblajes helicoidales de subunidades que se autoasocian generando combinaciones de contactos proteicos extremo-extremo o laterales. Las diferencias en la estructura de las subunidades y la forma de autoensamblaje proporcionan a los filamentos propiedades mecánicas distintas. Los filamentos intermedios son semejantes a cuerdas y fáciles de formar pero difíciles de romper. Los microtúbulos son tubos rígidos y fuertes. Los filamentos de actina son los más finos de los tres y son difíciles de ensamblar y muy fáciles de romper.

En las células vivas, los tres tipos de filamentos del citoesqueleto sufren una remodelación constante mediante el ensamblaje y desensamblaje de sus subunidades. Los microtúbulos y los filamentos de actina unen y pierden subunidades únicamente en sus extremos, con un extremo (el extremo más) creciendo más rápido que el otro (el extremo menos). La tubulina y la actina (las subunidades de los microtúbulos y de los filamentos de actina, respectivamente) unen e hidrolizan nucleósidos trifosfato (la tubulina une GTP y la actina ATP). La hidrólisis de los nucleótidos les confiere su comportamiento dinámico característico. Los filamentos de actina funcionan sobre todo por recambio rotatorio, ensamblándose por un extremo y desensamblándose por el extremo opuesto. Los microtúbulos de las células funcionan predominantemente mediante inestabilidad dinámica, por la cual un microtúbulo sufre etapas alternantes de crecimiento y de rotura en un mismo extremo.

Mientras que la tubulina y la actina han sido muy conservadas a lo largo de la evolución de la célula eucariota, la familia de filamentos intermedios es muy diversa. Hay una gran variedad de formas específicas de tejido en el citoplasma de las células animales, incluyendo los filamentos de queratina de las células epiteliales, los neurofilamentos de las células nerviosas y los filamentos de desmina de las células musculares. En todas estas células, la función primaria de los filamentos intermedios es proporcionar resistencia mecánica.

Las bacterias también presentan proteínas homólogas a la tubulina, a la actina y a los filamentos intermedios, que forman estructuras filamentosas dinámicas implicadas en la forma de las células y en la división celular.

CÓMO REGULAN LAS CÉLULAS LOS FILAMENTOS DE SU CITOESQUELETO

Los microtúbulos, los filamentos de actina y los filamentos intermedios son más dinámicos dentro de la célula que en el tubo de ensayo. La célula regula la longitud y la estabilidad de sus filamentos, y también su número y su geometría. Los filamentos pueden formar una gran variedad de estructuras de orden superior regulando la unión de los filamentos entre sí o a otros componentes celulares. Algunas propiedades de los filamentos están reguladas por modificaciones covalentes directas de las subunidades del filamento, pero la mayor parte de la regulación la ejercen un gran conjunto de proteínas accesorias que se unen a los filamentos o a las subunidades libres. Algunas de las proteínas accesorias más importantes asociadas con los microtúbulos y los filamentos de actina se muestran en el **Panel 16–3** (pp. 994-995). Esta sección describe cómo las proteínas accesorias modifican la dinámica y la estructura de los filamentos del citoesquelto. Empezamos con una exposición sobre cómo se nuclean los microtúbulos y los filamentos de actina en las células, puesto que este hecho constituye una parte muy importante en la determinación de la organización total del interior celular.

Un complejo proteico que contiene tubulina γ nuclea a los microtúbulos

Mientras que las tubulinas α y β son los bloques de construcción habituales de los microtúbulos, otro tipo de tubulina, llamada *tubulina γ*, tiene una papel mucho más especializado. Esta proteína, presente en mucha menor cantidad que las otras dos, está implicada en la nucleación del crecimiento de los microtúbulos en organismos muy diferentes, desde las levaduras hasta los humanos. Generalmente los microtúbulos se nuclean a partir de una localización intracelular conocida como **centro organizador de microtúbulos** (**MTOC**: ***microtubule-organizing center***). Anticuerpos dirigidos contra la tubulina γ marcan el MTOC en prácticamente todas las especies y tipos celulares examinados hasta el momento.

Los microtúbulos se nuclean por su extremo menos, de forma que su extremo más va creciendo a partir de cada MTOC generando diferentes tipos de disposiciones de microtúbulos. Un **anillo complejo de tubulina γ** (**γ-TuRC**: ***tubulin ring complex***) capaz de nuclear el crecimiento de microtúbulos en un tubo de ensayo se ha aislado tanto a partir de células de insecto como de células de vertebrados. Dos proteínas, también conservadas desde las levaduras hasta la especie humana, se unen directamente a la tubulina γ junto con otras proteínas que ayudan a generar el anillo de moléculas de tubulina γ. Este anillo se puede observar en los extremos menos de los microtúbulos nucleados por γ-TuRC y parece que actúa de base para crear un microtúbulo con 13 protofilamentos (**Figura 16–29**).

En las células animales los microtúbulos se forman a partir del centrosoma

En la mayoría de células animales existe un MTOC bien definido llamado **centrosoma**, localizado cerca del núcleo. Desde este punto focal, los microtúbulos citoplasmáticos emergen en forma de estrella y con una conformación astral. Los microtúbulos son nucleados en el centrosoma a partir de sus extremos menos, de forma que los extremos más apuntan hacia fuera y crecen hacia la periferia celular. Los microtúbulos nucleados en el centrosoma crecen y se

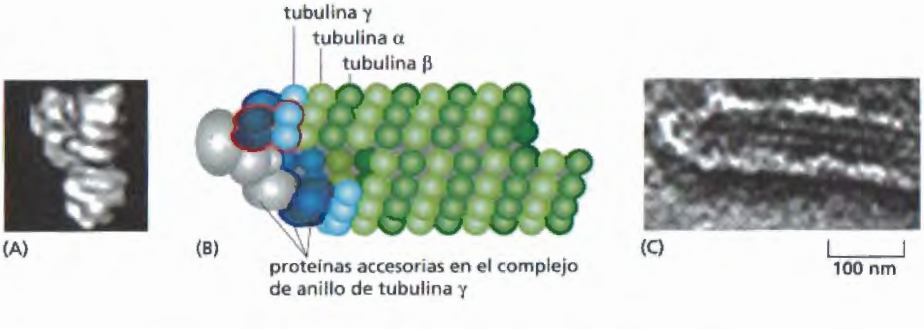


Figura 16–29 Polimerización de tubulina nucleada a partir de complejos en forma de anillo de tubulina γ. (A) Estructura del complejo de anillo de la tubulina γ reconstruida a partir de la media de complejos purificados individuales observados mediante microscopía electrónica. (B) Modelo para la nucleación del crecimiento de un microtúbulo a partir de γ-TuRC. La línea roja indica un par de proteínas unidas a dos moléculas de tubulina γ; este grupo puede ser aislado como un subcomplejo separado del anillo más grande. Obsérvese la discontinuidad longitudinal entre dos protofilamentos. Los microtúbulos generalmente tienen una de estas "costuras" rompiendo el empaquetamiento uniforme de la hélice de los protofilamentos. (C) Electromicrografía de un microtúbulo sencillo nucleado a partir de un complejo de anillo de tubulina γ. (A y C, de M. Moritz et al., *Nat. Cell Biol.* 2:365-370, 2000; Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

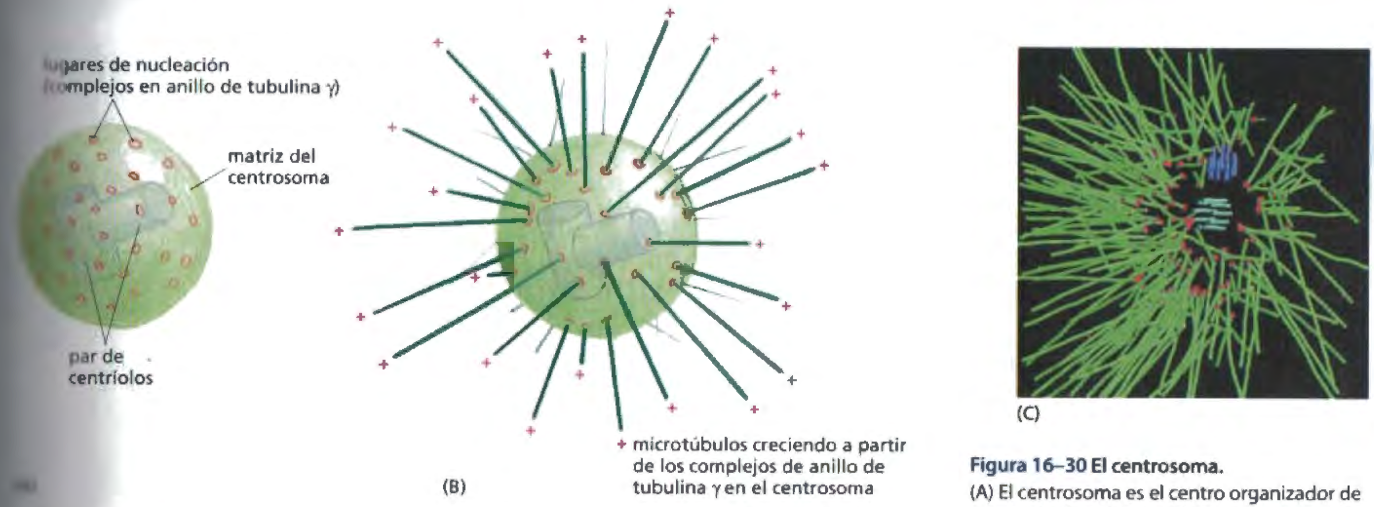


Figura 16–30 El centrosoma. (A) El centrosoma es el centro organizador de microtúbulos (MTOC) más importante de las células animales. Localizado en el citoplasma, en las proximidades del núcleo, está formado por una matriz amorfa de proteínas fibrosas a las que se adhieren los complejos de anillo de tubulina γ que nuclean el crecimiento de los microtúbulos. Esta matriz está organizada por un par de centríolos, como se describe en el texto. (B) Un centrosoma con microtúbulos unidos. El extremo menos de cada uno de los microtúbulos está incrustado en el centrosoma, creciendo a partir de un complejo de anillos de tubulina γ, mientras que el extremo más de cada microtúbulo queda libre en el citoplasma. (C) En una imagen reconstruida del MTOC de una célula de *C. elegans*, se puede observar un grupo denso de microtúbulos saliendo del centrosoma. (C, de E.T. O'Toole et al., *J. Cell Biol.* 163:451-456, 2003. Con la autorización de The Rockefeller University Press.)

crecen continuamente por su inestabilidad dinámica rastreando todo el volumen tridimensional de la célula. Un centrosoma está formado de una *matriz centrosómica* fibrosa que contiene más de 50 copias de γ-TuRC. Muchas de las proteínas que forman esta matriz todavía no han sido identificadas y también se desconoce cómo reclutan y activan el γ-TuRC.

Inmersos en el centrosoma se presentan un par de estructuras cilíndricas algo enigmáticas dispuestas en ángulo recto, en una configuración en forma de L (**Figura 16–30**). Se trata de los **centríolos**, que son como los corpúsculos basales de los cilios y flagelos de las células móviles (se describirá más adelante). Los centríolos organizan la matriz del centrosoma (también llamado material pericentriolar), asegurando su duplicación en cada ciclo celular al duplicarse a sí mismos (**Figura 16–31**). Como se describirá en el Capítulo 17, durante la interfase el centrosoma se duplica y se separa en dos partes iguales, de forma que cada mitad contiene un par de centríolos duplicados. Cuando empieza la mitosis, estos dos centrosomas hijos se desplazan hacia lados opuestos del núcleo y forman los dos polos del huso mitótico (véase Panel 17–1, pp. 1072–1073). Un centríolo está formado por un cilindro corto de microtúbulos modificados y un gran número de proteínas accesorias. No se comprende muy bien la base molecular de esta duplicación.

En hongos y diatomeas, los microtúbulos se nuclean en un MTOC que está inmerso en la envoltura nuclear formando una pequeña placa denominada *corpúsculo polar mitótico*. Parece que las plantas superiores nuclean los microtúbulos en distintos lugares distribuidos alrededor de la envoltura nuclear. Ni los hongos ni las plantas superiores disponen de centríolos. A pesar de estas diferencias, todas estas células tienen tubulina γ, y parece que la utilizan para nuclear a sus microtúbulos.

En las células animales, la configuración astral de los microtúbulos es muy resistente, con extremos más muy dinámicos apuntando hacia la periferia celular y extremos menos muy estables localizados cerca del núcleo. El sistema de microtúbulos radiando a partir del centrosoma actúa como un dispositivo que proporciona supervivencia a las regiones más

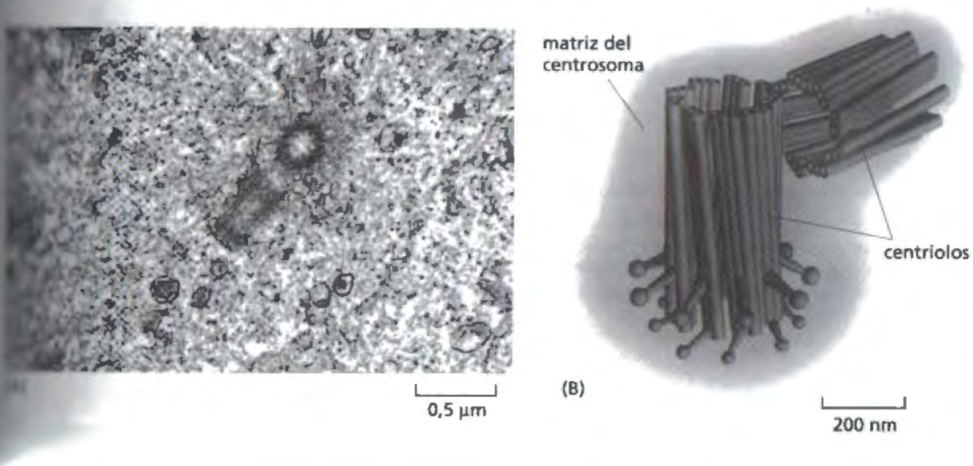
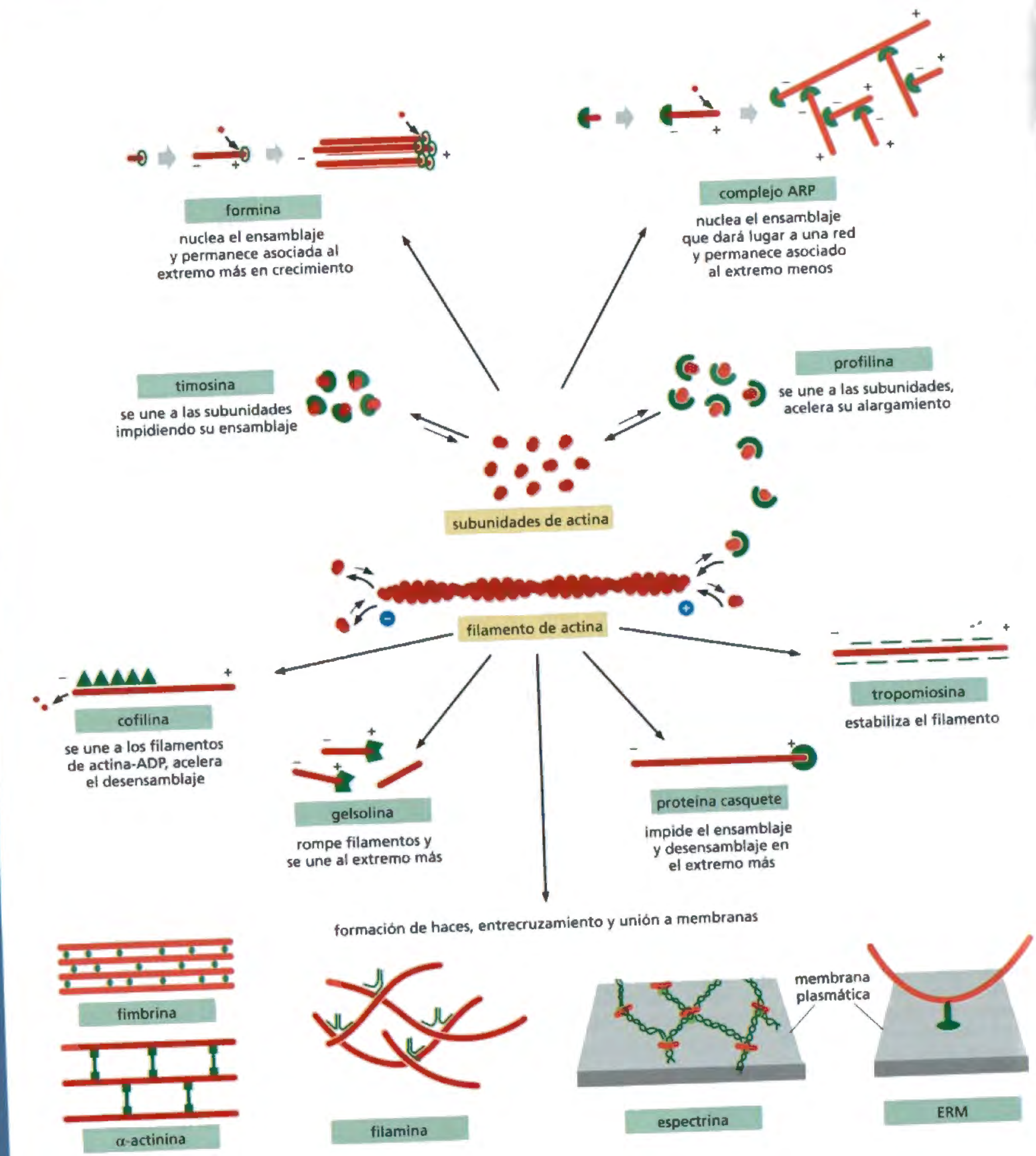


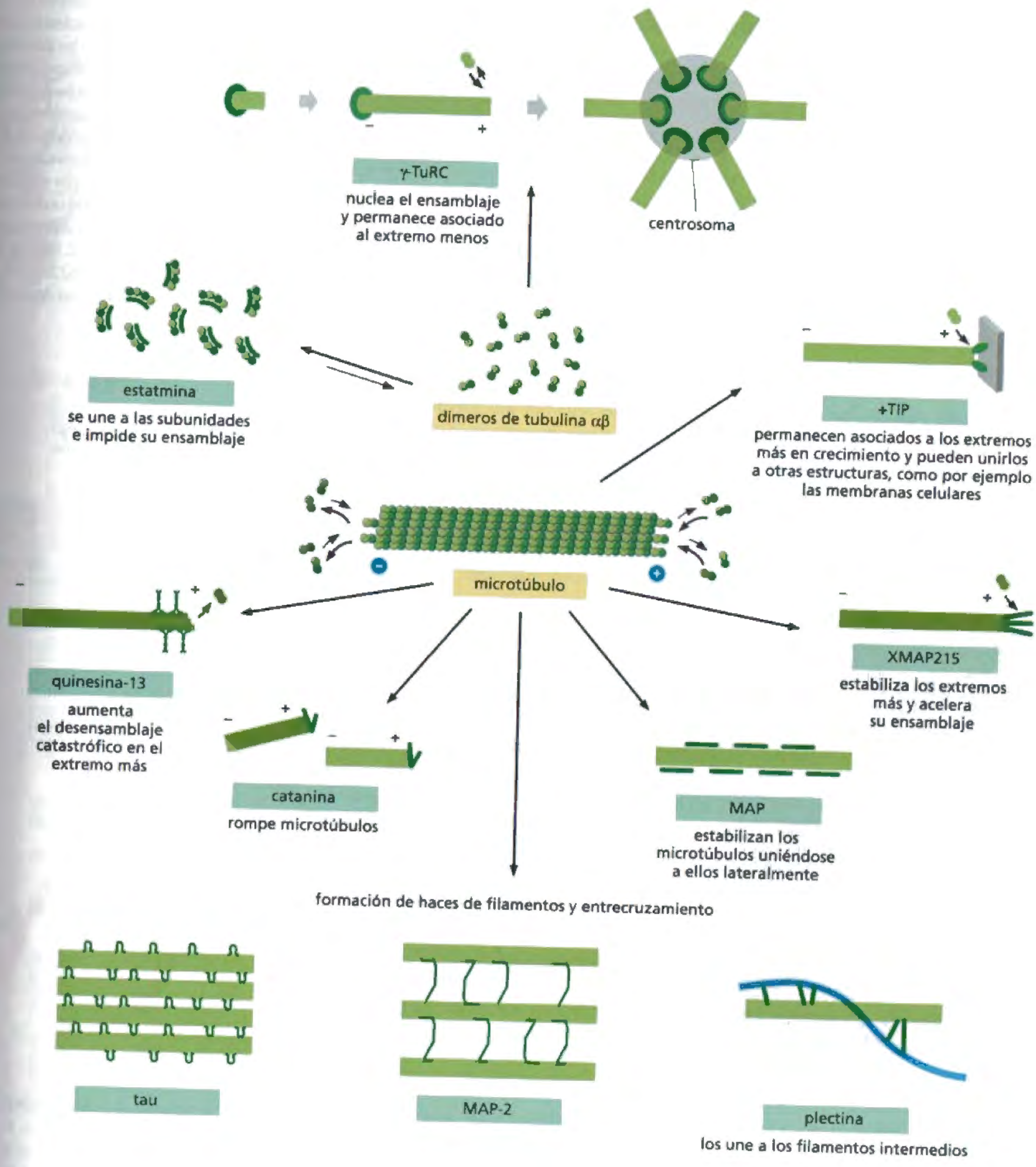
Figura 16–31 Un centríolo en el centrosoma. (A) Electromicrografía de un corte ultrafino de un centrosoma mostrando una visión de un centríolo materno en un corte longitudinal de un centríolo hijo. Se pueden observar numerosos microtúbulos en sus proximidades. (B) Estructura de un par de centríolos. (A, de G.J. Mack, Y. Ou y J.B. Rattner, *Microsc. Res. Tech.* 49:409-419, 2000. Con la autorización de John Wiley & Sons. B, adaptado de D. Chrétien et al., *J. Struct. Biol.* 120:117-133, 1997. Con la autorización de Elsevier.)

FILAMENTOS DE ACTINA



Algunas de las proteínas accesorias más importante del citoesqueleto de actina. Excepto para las proteínas motoras tipo miosina, que será tratado en otra sección más adelante, se muestra un ejemplo de cada uno de los tipos más importantes. Cada uno de ellos se describe en el texto. De todas formas, las células contienen más de cien tipos distintos de proteínas de unión a actina y existen importantes tipos de proteínas asociadas a la actina que todavía no se han identificado.

MICROTÚBULOS



Algunas de las proteínas accesorias más importantes del citoesqueleto de microtúbulos. Se muestra un ejemplo de cada uno de los principales tipos, excepto para las dos clases de proteínas motoras, que serán descritas en otra sección más adelante. Cada uno de ellos se describe en el texto. De todas formas, las células contienen más de cien tipos distintos de proteínas de unión a microtúbulos; como sucede para las proteínas asociadas a actina, existen importantes tipos de proteínas asociadas a los microtúbulos que todavía se desconocen.

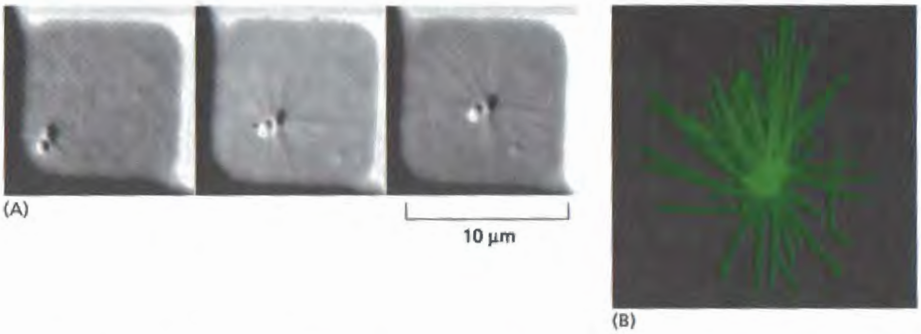


Figura 16-32 **El comportamiento del centro buscador de un centrosoma.** (A) Se micrograbaron pequeño pocillos cuadrados sobre un sustrato de plástico. Se introdujo un centrosoma en uno de estos pocillos, junto con una solución de subunidades de tubulina. Mientras los microtúbulos polimerizan, nucleados por el centrosoma, empujan contra las paredes del pocillo. La necesidad de ser empujados por igual en todas las direcciones para estabilizar la posición, fuerza al centrosoma hacia el centro del pocillo. Las tres imágenes fueron tomadas a intervalos de tres minutos. (B) Un centrosoma centrado por sí mismo, fijado y marcado para mostrar la distribución de los microtúbulos empujando las cuatro paredes del envoltorio. (De T.E. Holy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:6228-6231, 199[7]. Con la autorización de National Academy of Sciences.)

alejadas de las células y que coloca el centrosoma en su centro; este proceso se produce incluso en medios artificiales (**Figura 16–32**). Incluso en un fragmento celular aislado que haya perdido el centrosoma, los microtúbulos dinámicos interactúan con los orgánulos membranosos y las proteínas motoras se organizan adoptando una disposición en forma de estrella con los extremos menos dirigidos hacia el centro, aunque este proceso pueda implicar a más componentes que el simple mecanismo de empuje usado por el centrosoma aislado (**Figura 16–33**). Esta capacidad de los microtúbulos del citoesqueleto para encontrar el centro de la célula establece un sistema general coordinado, que permite posicionar muchos orgánulos dentro de la célula. Células altamente especializadas como las neuronas, las células musculares y las células epiteliales deben usar mecanismos adicionales para establecer sus elaborados y coordinados sistemas internos. Así, por ejemplo, cuando una célula epitelial forma las uniones célula-célula y se polariza, los extremos menos de los microtúbulos se mueven hacia una región cercana a la membrana plasmática apical. Desde esta localización asimétrica, se forma un haz de microtúbulos casi paralelos a lo largo del eje longitudinal de la célula, con los extremos más extendiéndose hasta la superficie basal (véase Figura 16–5).

A menudo los filamentos de actina se nuclean en la membrana plasmática

Al contrario de lo que ocurre con la nucleación de los microtúbulos, que se produce en la parte interna del citoplasma y cerca del núcleo, los filamentos de actina se nuclean frecuentemente en o cerca de la membrana plasmática. Por lo tanto, en la mayoría de células la densidad más alta de filamentos de actina está en la periferia celular. La capa situada bajo la membrana plasmática se llama **córtex celular** y los filamentos de actina de esta capa son los responsables de la forma y el movimiento de la superficie de la célula. Por ejemplo, en función de cómo es su unión entre ellos o su unión con la membrana plasmática, las estructuras de actina pueden formar proyecciones de la superficie de la célula muy variadas. Esto incluye a los haces puntiagudos tales como los *microvilli o filopodios*, velos emergentes y alargados llamados *lamelipodios* que ayudan a las células a desplazarse sobre sustratos sólidos y las evaginaciones fagocíticas de los macrófagos.

Con frecuencia, la nucleación de los filamentos de actina en la membrana plasmática está regulada por señales externas, lo cual permite a las células cambiar rápidamente su

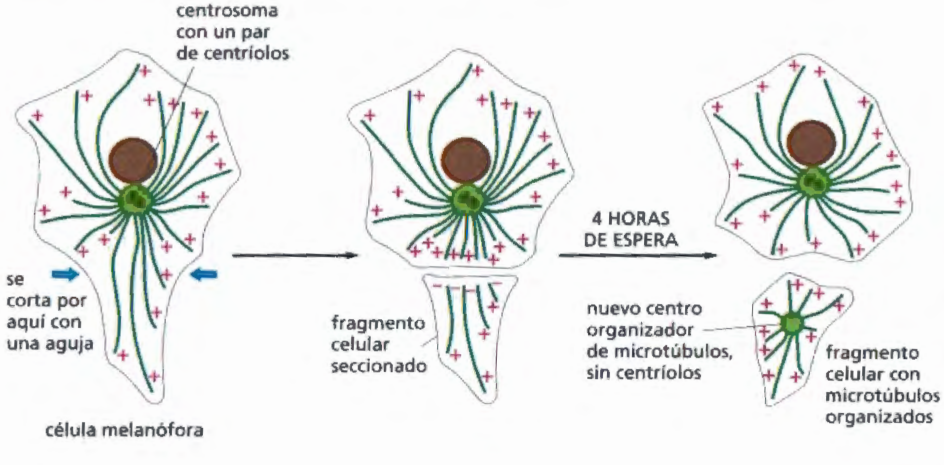


Figura 16–33 **Un haz de microtúbulos puede encontrar el centro de la célula.** Después de cortar con una aguja el brazo de una célula pigmentaria de un pez, los microtúbulos del fragmento cortado se reorganizan de forma que sus extremos menos se colocan cerca del centro del fragmento, orientados hacia un nuevo centro organizador de microtúbulos.

forma y rigidez respondiendo a los cambios de su entorno. Esta nucleación puede estar catalizada por dos tipos distintos de factores reguladores, el complejo ARP y las forminas (se describe más adelante). El primero de ellos es un complejo de proteínas que incluye a dos *proteínas relacionadas con la actina*, o *ARP (actin-related proteins)*, cada una de las cuales presenta una homología del 45% con la actina. De forma análoga a la función del γ-TuRC, el

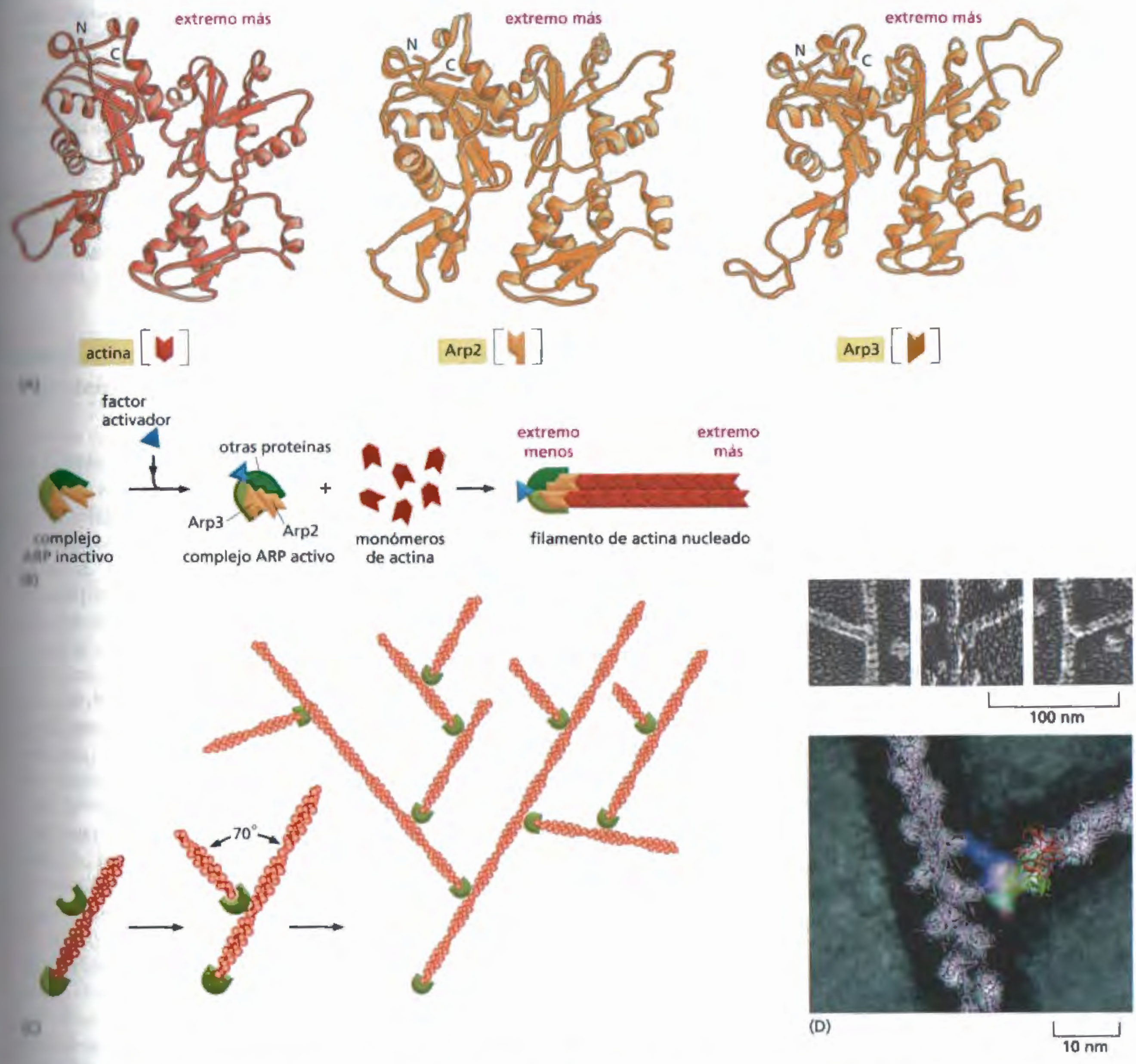


Figura 16–34 Nucleación y formación de la red de actina por el complejo ARP. (A) Estructuras de los complejos Arp2 y Arp3 comparadas con la estructura de la actina. A pesar de que la cara equivalente al extremo más (*superior*) tanto de la molécula de Arp 2 como de la molécula de Arp3 es muy similar al extremo más de la actina, diferencias tanto en la zona lateral como en el extremo menos (*inferior*) impiden que estas proteínas puedan formar filamentos por sí mismas o coensamblarse con los filamentos de actina. (B) Modelo de nucleación de los filamentos de actina por el complejo ARP. En ausencia de un factor activador, Arp2 y Arp3 pueden estar unidas mediante proteínas accesorias manteniendo una orientación que les impide nuclear un filamento nuevo de actina. Cuando un factor activador indicado por el *triángulo azul* se une al complejo, Arp2 y Arp3 se juntan formando una nueva configuración parecida al extremo más del filamento de actina. Entonces, las subunidades de actina pueden ensamblarse en esta estructura y superar la etapa limitante de la nucleación del filamento (véase Figura 16–10). (C) El complejo ARP nuclea filamentos de forma más eficiente cuando está unido lateralmente a un filamento preexistente. El resultado es una rama de filamento que crece en un ángulo de 70° con respecto al filamento original. Rondas repetidas de ramificaciones conducen a la formación de una red de actina en forma de árbol. (D) En la parte superior, electromicrografía de filamentos de actina ramificados formados mezclando subunidades de actina purificadas con complejos ARP purificados. En la parte inferior, imagen reconstruida de una ramificación en la que las estructuras cristalinas de actina y del complejo ARP se han ajustado a la densidad electrónica. El filamento materno se distribuye desde la parte superior a la parte inferior y el filamento hijo se ramifica hacia la derecha en el punto donde el complejo ARP se une a tres subunidades de actina del filamento materno. (A, de R.D. Mullins et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:6181-6186, 1998. Con la autorización de National Academy of Sciences y de N. Volkmann et al., *Science* 293:2456-2459, 2001. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

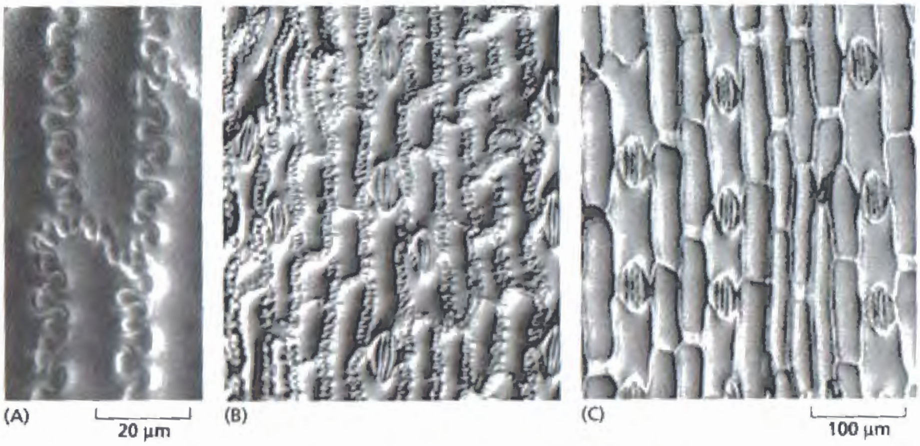


Figura 16–35 Función del complejo ARP en las células vegetales. (A) Células de la epidermis de la hoja del maíz forman pequeños lóbulos ricos en actina que encajan las células vecinas como las piezas de un rompecabezas. (B) El patrón regular de las células encajadas cubriendo la superficie de la hoja. (C) Las células epidérmicas en una planta mutante que carece del complejo ARP no forman los lóbulos interconectados. Las células en forma de ladrillo tienen un tamaño y una distribución normales, pero forman hojas que parecen demasiado brillantes a simple vista. (De M.J. Frank, H.N. Cartwright y L.G. Smith, *Development* 130:753-762, 2003. Con la autorización de Company of Biologists.)

complejo ARP (también conocido como *complejo Arp 2/3*) nuclea el crecimiento de los filamentos de actina a partir del extremo menos y posibilita de este modo un alargamiento rápido de los filamentos por el extremo más (**Figura 16–34**A y B). El complejo también puede unirse lateralmente a otro filamento de actina y permanecer unido al extremo menos del filamento que ha nucleado, de forma que se generan filamentos en forma de árbol (Figura 16–34C y D).

En los animales, el complejo ARP está asociado con estructuras en el extremo en crecimiento de las células migratorias. El complejo también está localizado en regiones de crecimiento rápido de filamentos de actina como los lamelipodios y su actividad nucleadora está regulada por diversas moléculas señalizadoras intracelulares y componentes localizados en la cara citoplasmática de la membrana celular. Este complejo altamente conservado también está implicado en la nucleación de los filamentos de actina cerca de la membrana plasmática en las levaduras, donde es necesario para poder formar la actina cortical (véase Figura 16–6), y en las células vegetales, donde dirige la formación de los haces de actina en la superficie necesarios para el crecimiento de las complejas formas celulares en una gran variedad de tejidos distintos (**Figura 16–35**).

Tanto la tubulina γ como los complejos ARP son antiguos desde el punto de vista evolutivo y se han conservado en una gran variedad de especies eucariotas. Parece que los genes que los codifican surgieron por duplicación del gen de una de las subunidades de los microtúbulos o de los filamentos de actina, respectivamente. A continuación se produjo una divergencia y una especialización de las copias génicas, de forma que ahora codifican proteínas con una función nucleadora especial. Así pues, en los dos sistemas del citoesqueleto se ha producido una estrategia parecida. Este hallazgo indica la gran importancia que tiene una nucleación regulada como principio organizador general de las células.

El mecanismo de la nucleación influye en la organización de los filamentos

Puesto que el complejo ARP nuclea el crecimiento de un filamento nuevo de actina de forma más eficiente cuando está unido lateralmente a un filamento viejo de actina, la activación regulada del complejo ARP en las células animales tiende a conducir hacia el ensamblaje de redes de actina ramificadas con textura de gel. Sin embargo, la mayoría de grandes estructuras de actina encontradas en las células están formadas por haces paralelos de filamentos de actina no ramificados, incluyendo el surco de división encontrado en el ecuador de las células en mitosis (véase Figura 16–2) y los cables de actina que se localizan hacia la gema en crecimiento de las levaduras (véase Figura 16–6). La formación de la mayoría de estos haces de actina se induce mediante un grupo distinto de proteínas nucleadoras, las *forminas*, que son capaces de nuclear el crecimiento de los filamentos rectos y no ramificados que pueden ser entrecruzados por otras proteínas formando los haces paralelos.

Las **forminas** son una gran familia de proteínas diméricas (el genoma del ratón codifica cerca de 15 forminas distintas). Cada subunidad de formina presenta un lugar de unión para un monómero de actina y parece que el dímero de formina nuclea la polimerización del filamento de actina mediante la captación de dos monómeros. Mientras el nuevo filamento crece, el dímero de formina se mantiene asociado con el extremo más en rápido cre-

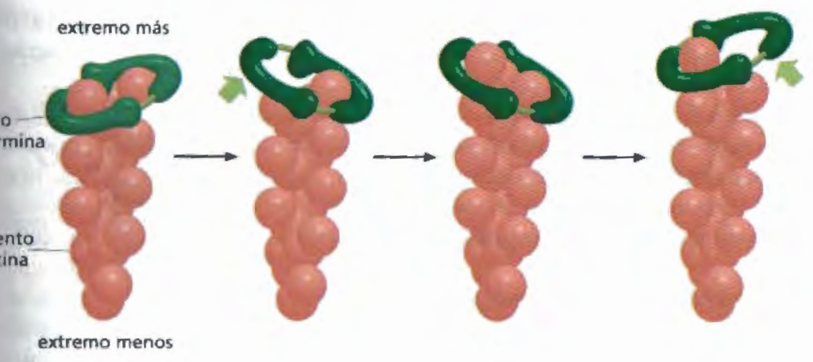


Figura 16–36 Alargamiento de actina mediado por las forminas. Las proteínas llamadas forminas (*verde*) forman complejos diméricos que pueden nuclear la formación de un nuevo filamento de actina (*rojo*) y permanecer asociadas al extremo más de rápido crecimiento mientras éste se alarga. La formina mantiene su unión a una de las dos subunidades de actina expuestas en el extremo más, mientras permite el ensamblaje de las nuevas subunidades. En la ilustración, sólo se muestra una parte de la gran molécula de formina. Otras regiones regulan su actividad y se unen a estructuras concretas de la célula. La mayoría de forminas están conectadas de forma indirecta con la membrana plasmática y colaboran en la polimerización insercional del filamento de actina justo por debajo de la superficie de la membrana.

miento, permitiendo la unión de nuevas subunidades en el extremo en crecimiento del filamento (**Figura 16–36**). Este comportamiento es muy distinto al del complejo ARP o al del γ-TuRC, que se mantiene unido al extremo menos del filamento de actina o al microtúbulo e impide tanto la adición como la pérdida de subunidades en este extremo.

El alargamiento de los filamentos está modificado por proteínas que se unen a las subunidades libres

Cuando los filamentos han sido nucleados, por lo general se alargan por adición de subunidades solubles. En la mayoría de células no musculares de los vertebrados aproximadamente el 50% de la actina está formando filamentos, mientras que el 50% restante se encuentra en forma soluble aunque esta proporción puede cambiar con rapidez en respuesta a señales externas. Es habitual que la concentración de monómero soluble oscile entre 50 y 200 μM (2-8 mg/mL), concentración sorprendentemente elevada dada la baja concentración crítica observada para la actina pura en un tubo de ensayo (inferior a 1 μM). ¿Por qué una parte de la actina permanece soluble y no polimeriza formando filamentos? La razón está en que este conjunto tan abundante de subunidades contiene proteínas especiales que se unen a los monómeros de actina e impiden su polimerización o la hacen menos favorable (el efecto es parecido al del compuesto latrunculina). De entre estas proteínas, la más abundante es una pequeña proteína denominada *timosina*. Los monómeros de actina unidos a la timosina se encuentran en un estado cerrado, en el cual no pueden asociarse ni al extremo más ni al extremo menos de los filamentos de actina y tampoco pueden hidrolizar o cambiar el nucleótido que llevan unido.

¿Cómo consiguen las células recolectar estos monómeros de actina de este conjunto secuestrado y los utilizan para polimerizar? Podría parecer que la timosina estuviera regulada por vías de transducción de señal como las mencionadas en el Capítulo 15, pero no se ha demostrado que este sea el caso. Por el contrario, el reclutamiento depende de otra proteína de unión al monómero, la *profilina*. La profilina se une al monómero de actina en la cara opuesta al lugar de unión al ATP, de forma que bloquea el lugar al que se asociaría el monómero con el extremo menos del filamento, mientras que deja expuesto el lugar del monómero que se une al extremo más (**Figura 16–37**). Sin embargo, el complejo profilina-actina puede unirse fácilmente al extremo más libre. Al producirse esta unión, se induce un cambio conformacional de la actina, la cual disminuye su afinidad por la profilina, por lo que esta se disocia, dejando al filamento con una subunidad más. Puesto que la profilina compite con la timosina por la unión a los monómeros de actina, el resultado neto de una activación local de moléculas de profilina desplaza las subunidades de actina secuestradas por la timosina a los extremos más de los filamentos. El crecimiento de los filamentos de actina depende mucho más de la activación de profilina para aquellos filamentos cuyos extremos más están asociados a ciertas forminas (la familia de proteínas nucleadoras de actina descrita anteriormente); en estos casos, el crecimiento del filamento de actina puede necesitar que la actina monomérica esté unida a la profilina (**Figura 16–38**).

Existen diferentes tipos de mecanismos intracelulares que regulan la actividad de la profilina, incluyendo la fosforilación de la propia profilina o la unión de la profilina a lípidos de tipo inositol fosfato. Estos mecanismos pueden definir los lugares donde actuará la profilina. Por ejemplo, la capacidad de la profilina de movilizar las subunidades de actina secuestradas hacia los extremos de los filamentos en crecimiento es crítica para su ensam-

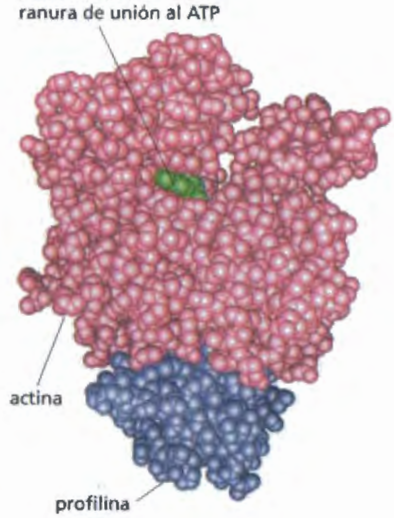


Figura 16–37 La profilina unida a un monómero de actina. La molécula de profilina se muestra en *azul*, la de actina en *rojo* y el ATP en *verde*. La profilina se une a la cara de la actina opuesta a la ranura donde se coloca el ATP. Este heterodímero de profilina-actina puede unirse y alargar el extremo más de un filamento de actina, pero está impedido estéricamente para unirse al extremo menos. (Cortesía de Michael Rozycki y Clarence E. Schutt.)

blaje en la membrana plasmática. La profilina se localiza en la cara citoplasmática de la membrana plasmática puesto que se une a los fosfolípidos ácidos de membrana de esta cara. En esta localización, las señales extracelulares pueden activar la profilina produciendo una polimerización explosiva y local de actina y la aparición de estructuras móviles ricas en actina como los filopodios y los lamelipodios (véase más adelante). Además de unirse a la actina y a los fosfolípidos, la profilina también puede unirse a otras proteínas intracelulares que presentan dominios ricos en prolina; estas proteínas también pueden colaborar en la localización de la profilina en los lugares donde es necesario un rápido ensamblaje de los filamentos de actina.

Como ocurre con los monómeros de actina, la célula secuestra a las subunidades de tubulina no polimerizadas manteniendo el conjunto de subunidades libres en unos niveles sensiblemente más altos que la concentración crítica. Una molécula de la pequeña proteína *estatmina* se une a dos heterodímeros de tubulina e impide su unión a los extremos de los mictrotúbulos. Así pues, la estatmina disminuye la concentración efectiva de las subunidades de tubulina disponibles para la polimerización (efecto análogo al del compuesto colchicina). Además, la estatmina aumenta la probabilidad que un microtúbulo en crecimiento sufra la transición catastrófica hacia el estado de ruptura. La fosforilación de la estatmina inhibe su unión a la tubulina y las señales que inducen esta fosforilación pueden incrementar la velocidad de elongación de los microtúbulos y suprimir la inestabilidad dinámica. A menudo las células cancerosas sobreexpresan estatmina; se cree que el aumento en la tasa de recambio de los microtúbulos inducido contribuye a los cambios característicos de la forma celular asociados con la malignización y la formación de tumores.



Figura 16–38 Profilina y forminas. Algu miembros de la familia de las forminas ti dominios no estructurados o "bigotes" qu poseen diversos sitios de unión para la profilina o para el complejo actina-profili Estos dominios son flexibles y actúan de plataforma para la unión de actina al extr más en crecimiento del filamento de act cuando tiene unida la formina. En determinadas condiciones, esto puede incrementar la velocidad de alargamient filamento de actina, que crece más rápid lo esperado en una reacción de difusión controlada, y a más velocidad en presen de formina y de profilina que en su ausen (véase Figura 3–80C).

Existen proteínas fragmentadoras que regulan la longitud y el comportamiento cinético tanto de los filamentos de actina como de los microtúbulos

En algunas situaciones, una célula puede romper un filamento largo ya existente en muchos filamentos más cortos. Este suceso genera una gran cantidad de extremos nuevos: un filamento largo sólo tiene un extremo más y un extremo menos, pero al romperse en docenas de filamentos cortos, cada uno de ellos presentará su propio extremo menos y su propio extremo más. En ciertas condiciones intracelulares, estos extremos recién formados nuclean la elongación de un filamento; en este caso, la fragmentación acelera el ensamblaje de nuevas estructuras de filamentos. En otras condiciones, la fragmentación induce la despolimerización de los filamentos viejos, aumentando la velocidad de despolimerización del orden de diez veces o más. Además, algunos filamentos cambian las propiedades físicas y mecánicas del citoplasma: cuando los filamentos se fragmentan los haces largos y rígidos y los geles se hacen más fluidos.

Para romper un microtúbulo se deben romper trece enlaces longitudinales, uno por cada protofilamento. La proteína *catanina*, derivada de la palabra japonesa que significa "espada", realiza esta función (**Figura 16–39**). La catanina está formada por dos subunidades, una subunidad pequeña que hidroliza el ATP y que realiza la fragmentación y una subunidad mayor que dirige la catanina hacia el centrosoma. La catanina libera los microtúbulos de su unión al centro organizador de microtúbulos y se cree que desempeña un papel importante en la rápida despolimerización observada en los polos del huso mitótico durante la meiosis y la mitosis. También puede participar en la despolimerización y liberación de los microtúbulos en las células proliferantes en interfase y en células postmitóticas como las neuronas.

A diferencia de la fragmentación de los microtúbulos mediada por catanina que requiere ATP, la fragmentación de los filamentos de actina no necesita energía extra. La mayoría de las proteínas fragmentadoras de actina forman parte de la *superfamilia gelsolina*, cuya actividad fragmentadora se activa por un incremento de los niveles de Ca^{2+} citosólico. La gelsolina presenta subdominios que se unen a dos lugares distintos de la subunidad de actina, uno expuesto en la superficie del filamento y otro que normalmente se encuentra escondido en el enlace longitudinal hacia la próxima subunidad del protofilamento. De acuerdo con un modelo sobre la fragmentación por gelsolina, esta proteína se une de forma lateral a un filamento de actina y espera hasta que se produce una fluctuación térmica que genera un pequeño agujero entre dos subunidades vecinas del protofilamento; entonces, la gelsolina introduce su subdominio en el agujero y rompe el filamento.

Las proteínas que se unen lateralmente a los filamentos pueden estabilizarlos o desestabilizarlos

Una vez se ha formado el filamento mediante nucleación y elongación a partir del conjunto de subunidades solubles, a menudo su estabilidad y propiedades dinámicas se ven modificadas por un conjunto de proteínas que pueden unirse lateralmente al polímero. Diferentes proteínas asociadas a los filamentos utilizan su energía de unión para disminuir o incrementar la energía libre del polímero, de forma que pueden estabilizarlo o desestabilizarlo, respectivamente.

Las proteínas que se unen lateralmente a los microtúbulos reciben el nombre genérico de **proteínas asociadas a los microtúbulos** o **MAP** (*microtubule-associated proteins*). De forma parecida al compuesto taxol, las MAP pueden estabilizar los microtúbulos evitando su desensamblaje. Un conjunto de MAP puede también mediar la interacción de los microtúbulos con otros componentes celulares. Este conjunto de proteínas es muy abundante en las neuronas, en las que los haces de microtúbulos estabilizados forman el núcleo de los axones y dendritas que se extienden desde el cuerpo celular (**Figura 16–40**). Estas MAP tienen como mínimo un dominio mediante el cual se unen a la superficie de los microtúbulos y otro que se proyecta hacia su exterior. La longitud de este dominio de proyección determina la distancia de empaquetamiento entre distintos microtúbulos, como se ha demostrado mediante ingeniería celular al sobreexpresar diferentes MAP. Así, las células que sobreexpresan MAP2, la cual presenta un dominio de proyección muy largo, forman haces de microtúbulos estables muy distantes los unos de los otros, mientras que las células que sobreexpresan *tau*, una MAP con un dominio más corto, forman haces más relacionados de microtúbulos empaquetados (**Figura 16–41**). La proteína tau unida a los filamentos también puede regular el transporte de los orgánulos rodeados de membrana, dirigido por las proteínas motoras, que se describirá más adelante.

Las MAP son dianas de algunas proteínas quinasa y su fosforilación puede tener un papel primario en el control tanto de su actividad como de su localización en el interior de las células. Entre las proteínas quinasa más importantes que pueden regular a las MAP están las que se activan y desactivan mientras la célula avanza a través del ciclo celular (descrito en el Capítulo 17). En particular, la actividad de las MAP regula los cambios en la dinámica de los microtúbulos que se producen cuando la célula los reorganiza formando el buso mitótico preparándose para la segregación de los cromosomas (véase Figura 16–2).

Además de unirse a los laterales de los microtúbulos, las proteínas tau forman sus propios filamentos helicoidales cuando la concentración es bastante alta. El citoplasma de las neuronas en los cerebros de gente afectada de Alzheimer posee grandes agregados de filamentos tau, llamados nudos neurofibrilares. Se desconoce si estos aglomerados de tau son una causa o una consecuencia de la neurodegeneración asociada con esta enfermedad.

De forma parecida, los filamentos de actina también pueden verse afectados por la unión lateral de proteínas accesorias. En la mayoría de células, algunos de los filamentos de actina se estabilizan mediante unión a *tropomiosina*, una proteína alargada que se une simultáneamente a siete subunidades de actina adyacentes en un mismo protofilamento. La unión de tropomiosina a lo largo del filamento de actina puede impedir a este filamento interaccionar con otras proteínas; por esta razón, la regulación de la unión de la tropomiosina es una etapa muy importante en la contracción muscular, como se explicará más adelante (véase Figura 16–78).

Otra importante proteína de unión a la actina, que se encuentra en todas las células eucariotas, es la *cofilina*, que desestabiliza los filamentos de actina. También llamada *factor despolimerizador de actina*, esta proteína presenta la característica poco común de unirse tanto a la actina filamentosa como a las subunidades libres. La cofilina se une a lo largo de todo el filamento haciendo que se enrosque un poco más estrechamente (**Figura 16–42**). Este

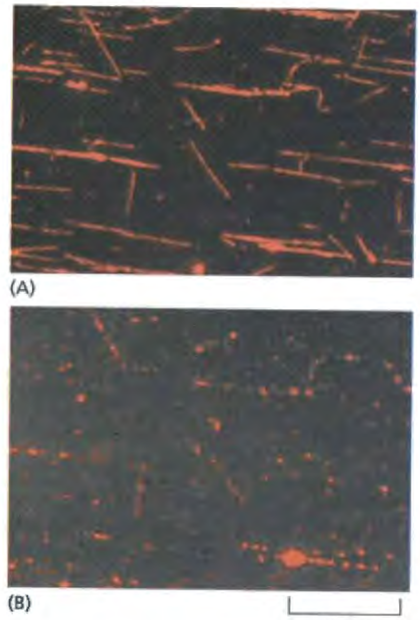


Figura 16–39 Ruptura de microtúbulos mediante catanina. Se adsorbieron microtúbulos marcados con rodamina y estabilizados con taxol sobre una superficie de cristal y se añadió catanina purificada junto con ATP. (A) Treinta segundos después de la adición de la catanina hay pocas roturas en los microtúbulos. (B) El mismo campo tres minutos después de añadir la catanina. Los filamentos han sido cortados por muchos lugares, originando una serie de fragmentos más pequeños a partir de los largos microtúbulos. (De J.J. Hartman et al., *Cell* 93:277-287, 1998. Con la autorización de Elsevier.)



Figura 16–40 Localización de las MAP en el axón y las dendritas de una neurona. Esta micrografía de inmunofluorescencia muestra la distribución del marcaje de tau (*verde*) y de MAP2 (*naranja*) en una neurona del hipocampo en cultivo. Mientras el marcaje de tau está confinado en el axón (largo y ramificado en esta neurona), el marcaje de MAP2 se encuentra restringido en el soma celular y en las dendritas. El anticuerpo utilizado para visualizar tau sólo se une a la forma no fosforilada; la forma fosforilada también se encuentra en las dendritas. (Cortesía de James W. Mandell y Gary A. Banker.)

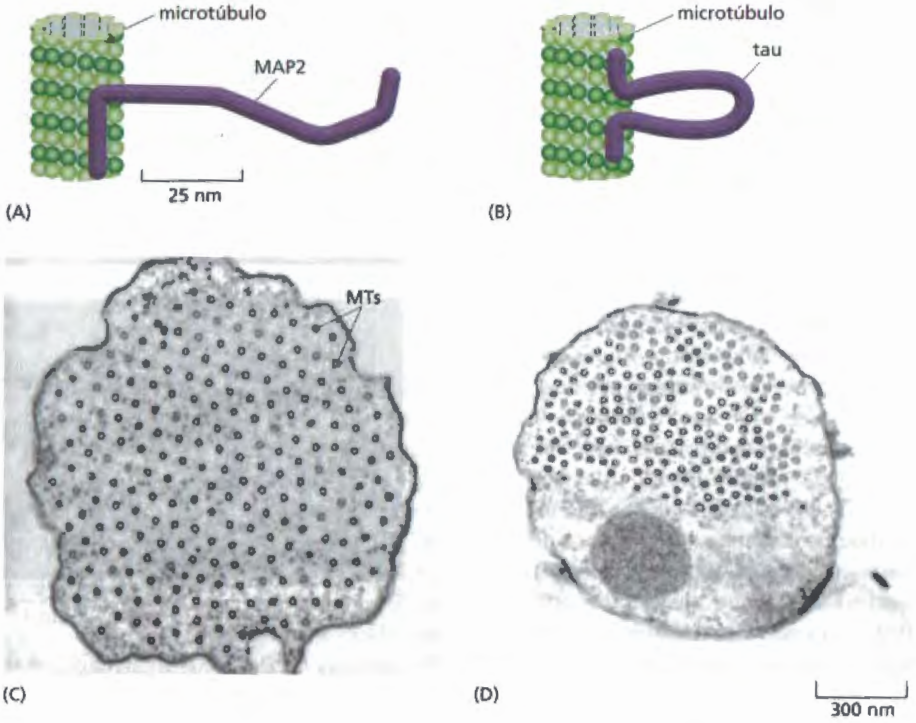


Figura 16–41 Organización de los haces de microtúbulos por las MAP. (A) MAP2 se une al entramado del microtúbulo por uno de sus extremos y extiende un largo brazo con otro dominio de unión en el otro extremo. (B) Tau se une al entramado del microtúbulo por sus dominios N- y C-terminales adoptando una forma de anillo. (C) Electromicrografía mostrando una sección transversal de un microtúbulo en una célula que sobreexpresa MAP2. La distribución regular de los microtúbulos (MT) en este haz es el resultado de la longitud constante de los brazos de MAP2. (D) Corte similar a través de un haz de microtúbulos de una célula que sobreexpresa tau. Los microtúbulos están mucho más juntos que en (C) porque el brazo que proyecta tau es mucho más corto. (C y D cortesía de V. Chen et al., *Nature* 360:647-674, 1992. Con la autorizaciónde Macmillan Publishers Ltd.)

estrés mecánico debilita los contactos entre las subunidades de actina del filamento, debilitándolo y favoreciendo su rotura. Además, también facilita la pérdida de las subunidades con ADP del extremo menos del filamento. Estas actividades aceleran rápidamente el desensamblaje del filamento de actina. Como resultado de ello, en el interior de la célula la mayoría de filamentos de actina tienen una vida media más corta que los filamentos formados *in vitro* a partir de actina pura. Los filamentos de actina pueden protegerse de la cofilina mediante unión a la tropomiosina.

La cofilina se une sobre todo a los filamentos que contienen ADP y menos a los que contienen ATP. Puesto que habitualmente la hidrólisis del ATP es más lenta que el ensamblaje de los filamentos, los filamentos de actina más nuevos de la célula todavía tienen ATP y son resistentes a la despolimerización inducida por la cofilina. Así pues, la cofilina favorece de forma eficiente la despolimerización de los filamentos más antiguos de una célula y asegura un recambio rápido de todos los filamentos de actina. Como analizaremos más adelante, el desensamblaje mediado por cofilina de los filamentos viejos pero no de los nuevos es crítico para el crecimiento dirigido y polarizado de la red de actina responsable del desplazamiento celular.

La dinámica de los filamentos puede verse drásticamente alterada por la unión de proteínas que interaccionan con sus extremos

Las proteínas que se unen a las zonas laterales de los filamentos pueden cambiar su comportamiento dinámico. Sin embargo, para conseguir un efecto máximo, estas proteínas ge-

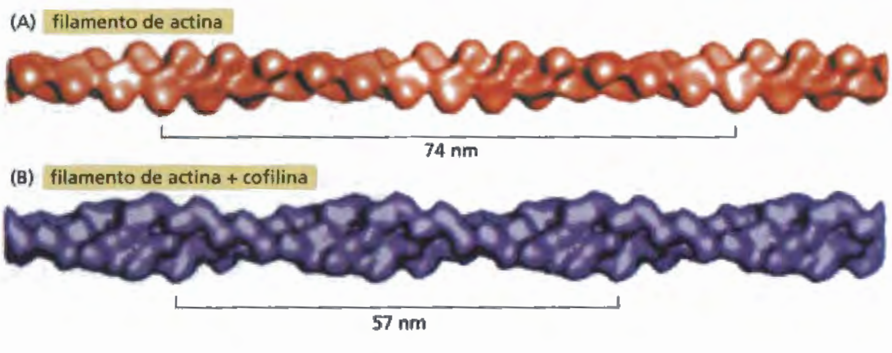


Figura 16–42 Giro de un filamento de actina inducido por cofilina. (A) Reconstrucción tridimensional de una crioelectromicrografía de un filamento fabricado a partir de actina pura. El fragmento muestra el espacio que exsiste entre dos giros de la hélice de actina. (B) Reconstrucción de un filamento de actina recubierto con cofilina, que se une en una proporción de 1:1 a las subunidades de actina a lo largo del filamento. La cofilina es una proteína pequeña (14 kilodaltons) comparada con la actina (43 kilodaltons), por lo que los filamentos parecen sólo ligeramente más gruesos. La energía de la unión de cofilina se utiliza para deformar el filamento de actina, enrollándolo un poco más sobre sí mismo y reduciendo la distancia entre dos giros de la hélice. (De A. McGough et al., *J. Cell Biol.* 138:771-778, 1997. Con la autorización de The Rockefeller University Press.)

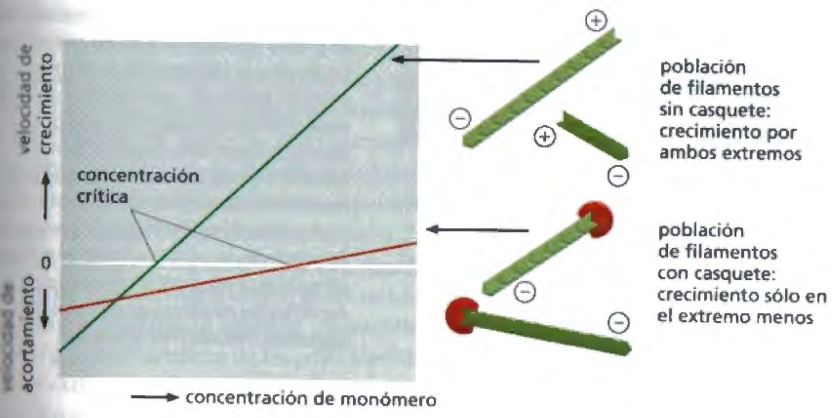


Figura 16–43 Encasquetamiento de los filamentos y sus efectos sobre la dinámica del filamento. Una población de filamentos no encasquetados ganan y pierden varias subunidades en ambos extremos, el menos y el más, de forma que crecen o se acortan rápidamente en función de la concentración disponible de monómeros libres (línea *verde*). En presencia de una proteína que encasqueta el extremo más (línea *roja*), sólo el extremo menos puede unir o perder subunidades, por lo que el filamento crecerá de forma más lenta a cualquier concentración de monómero superior a la concentración crítica y la ruptura será más lenta a cualquier concentración de monómero por debajo de la concentración crítica. Además, la concentración crítica para la población pasa a ser la del extremo menos del filamento.

generalmente tienen que recubrir por completo todo el filamento, lo cual implica que su estequiometría debe ser muy alta (p. ej., se necesita una tropomiosina por cada siete subunidades de actina, una tau por cada cuatro subunidades de tubulina o una cofilina por cada subunidad de actina). Por el contrario, las proteínas que se unen sobre todo a los extremos de los filamentos pueden ejercer efectos drásticos sobre la dinámica del filamento, aunque sólo estén presentes en muy bajos niveles. Puesto que la adición y pérdida de subunidades se produce principalmente en los extremos de los filamentos, una sola molécula de estas proteínas por cada filamento de actina (que contiene más o menos de 200 a 500 monómeros de actina) puede ser suficiente para transformar la arquitectura global de la red de filamentos de actina.

Como se ha descrito, un filamento de actina que pare su crecimiento y no sea estabilizado específicamente por la célula puede despolimerizar con rapidez puede perder subunidades tanto del extremo más como del extremo menos, una vez las moléculas de actina de ese extremo hayan hidrolizado su ATP y lo hayan convertido en la forma D. Sin embargo, la mayoría de los cambios más rápidos se producen en el extremo más. La unión de una *proteína casquete* al extremo más (*capping protein*), estabiliza este extremo del filamento de actina, lo cual enlentece la tasa tanto de crecimiento como de despolimerización al inactivar el extremo más (**Figura 16–43**). De hecho, la mayoría de los filamentos de actina de una célula tienen en su extremo más proteínas tales como *CapZ* (denominada así por su localización en la banda Z del músculo, véase más adelante; también llamada proteína casquete). En el extremo menos, un filamento de actina todavía puede estar recubierto por el complejo ARP que fue responsable de su nucleación, aunque es posible que en la mayoría de células muchos de los filamentos de actina ya no presenten el complejo ARP en su extremo menos y no estén recubiertos.

Se sabe que en las células musculares, en las que la vida de los filamentos de actina es excepcionalmente larga, los filamentos están recubiertos en ambos extremos: por CapZ en el extremo más y por *tropomodulina* en el extremo menos. La tropomodulina sólo se une a los extremos menos de los filamentos de actina que han estado recubiertos por tropomiosina y que, por tanto, presentan una cierta estabilización.

Diferentes tipos de proteínas alteran las propiedades de los extremos de los microtúbulos que crecen rápidamente

El extremo de un microtúbulo, que presenta 13 protofilamentos formando un anillo hueco (véase Figura 16–11), es una estructura mucho más grande y compleja que el extremo de un filamento de actina, de forma que pueden producirse muchas más interacciones de proteínas accesorias. Ya hemos descrito un casquete importante para los microtúbulos: el complejo de tubulina γ en forma de anillo (γ-TuRC), que produce la nucleación del crecimiento de los microtúbulos en el centro organizador y también recubre sus extremos menos. Otra proteína importante que recubre los extremos de los microtúbulos es un complejo proteico especial que se encuentra en los extremos de los microtúbulos de los cilios (se describirá más adelante), donde los microtúbulos son estables y conservan su longitud.

Algunas proteínas que actúan en los extremos de los microtúbulos desempeñan papeles mucho más importantes que los de ser simples proteínas recubridoras de filamentos.

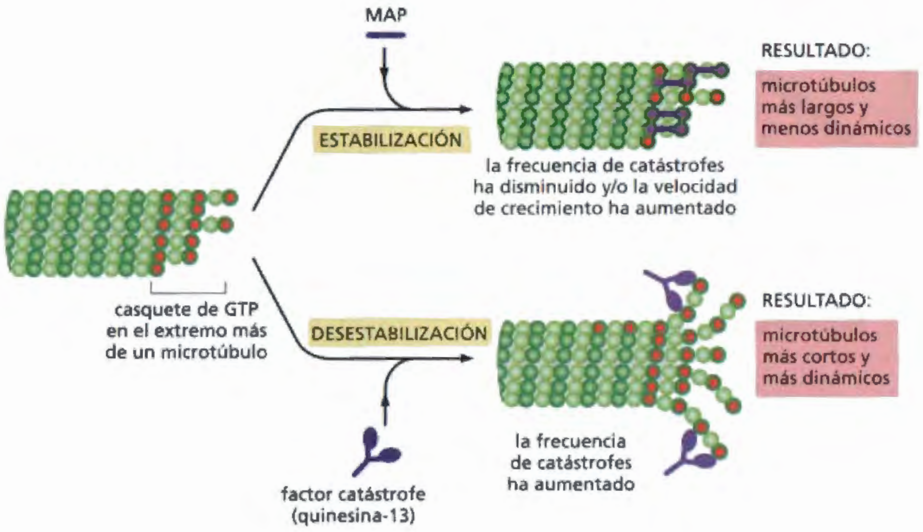
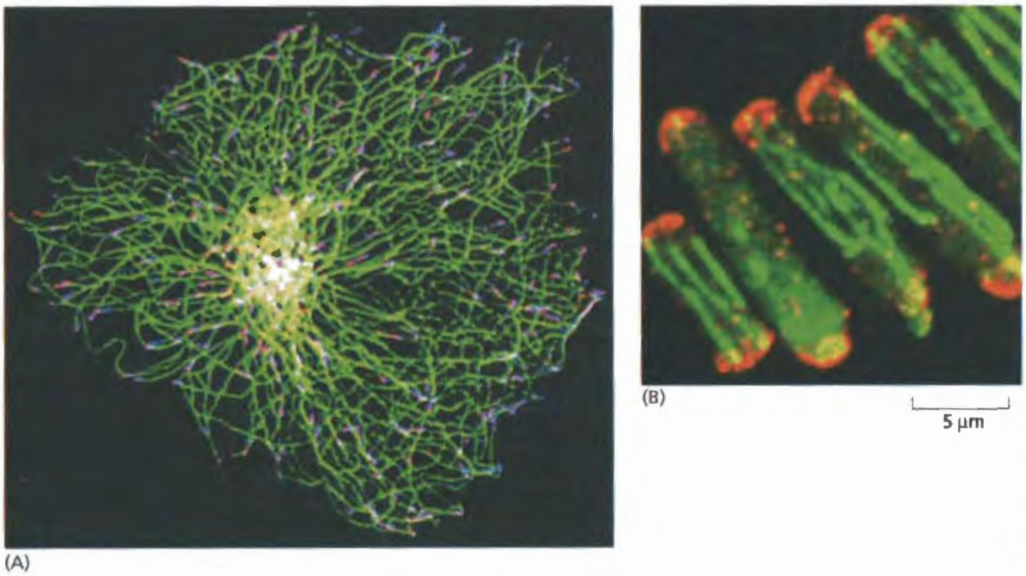


Figura 16–44 Efectos de las proteínas que se unen a los extremos de los microtúbulos. En las células, la transición de un microtúbulo entre un estado de crecimiento y un estado de acortamiento está controlada por proteínas especiales. Una MAP como XMAP215 estabiliza el extremo que está en crecimiento de un microtúbulo al unirse preferentemente a este lugar. Con funciones opuestas destacan los factores de catástrofe como la quinesina-13, un miembro de la superfamilia de proteínas motoras tipo quinesina (tratado más adelante).

Concretamente, pueden afectar de forma dramática la inestabilidad dinámica de los microtúbulos (véase Figura 16–16). Pueden influenciar la velocidad a la cual los microtúbulos cambian de un estado de crecimiento a un estado de despolimerización (la frecuencia de las catástrofes) o de un estado de despolimerización a un estado de crecimiento (la frecuencia de los rescates). Por ejemplo, una familia de proteínas relacionadas con la quinesina y conocidas como *factores de catástrofe*, aumentan significativamente la velocidad de catástrofe (estas proteínas son miembros de la familia de la quinesina-13; véase Figura 16–58). Se unen de forma específica a los extremos de los microtúbulos y parece que separan los protofilamentos entre sí, disminuyendo la barrera de energía normal de activación que impide que un microtúbulo se transforme en un protofilamento curvado, típico del estado de despolimerización (véase Figura 16–16C). Acciones opuestas a ésta pueden ser mediadas por proteínas MAP, como la proteína ubicua denominada *XMAP215* que tiene homólogos muy parecidos en un amplio abanico de organismos, desde las levaduras a la especie humana (XMAP: ***Xenopus* microtubule associated protein**); el número corresponde a su peso molecular. Esta proteína posee una habilidad especial para estabilizar los extremos libres de los microtúbulos e impide el cambio desde un estado en crecimiento a un estado de despolimerización. La fosforilación de XMAP215 durante la mitosis inhibe su actividad y cambia el balance de su competición con los factores de catástrofe (**Figura 16–44**). El cambio incrementa unas diez veces la inestabilidad dinámica de los microtúbulos que se observa durante la mitosis, una transición que representa un valor crítico para la construcción eficiente del huso mitótico (véase Figura 17–33).



(A) (B)

Figura 16–45 Proteínas +TIP localizadas en los extremos más en crecimiento de los microtúbulos. <TAAT> (A) En una célula epitelial en cultivo, cada microtúbulo (*verde*) tiene un extremo más asociado a la proteína +TIP EB1 (*rojo*). (B) En la levadura de escisión en forma de vara *Schizosaccharomyces pombe*, los extremos más de los microtúbulos (*verde*) están asociados con el homólogo de EB1 (*rojo*) en los dos polos de las células en forma de varilla. (A, de A. Akhmanova y C.C. Hoogenraad, *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:47-54, 2005. Con la autorización de Elsevier; B, cortesía de Ken Sawin.)

En muchas células, los extremos menos de los microtúbulos están estabilizados por su asociación con el centrosoma, que a su vez sirve como lugar de despolimerización de microtúbulos. Por el contrario, los extremos más exploran y se extienden a lo largo del espacio celular. Unas proteínas asociadas a los microtúbulos llamadas *proteínas tracking de los extremos más* (*+TIP*, de *tip*, punta) se acumulan en estos extremos activos y viajan alrededor de la célula como pasajeros de los extremos de los microtúbulos de crecimiento rápido, disociándose de los extremos cuando los microtúbulos empiezan a romperse (**Figura 16–45**).

Algunas de las +TIP, como los factores de catástrofe relacionados con quinesina y la XMAP215 mencionados anteriormente, modulan el crecimiento y la fragmentación del extremo de los microtúbulos donde están unidas. Otras controlan el posicionamiento de los microtúbulos ayudando a capturar y a estabilizar el extremo del microtúbulo en crecimiento en los lugares específicos de las proteínas diana en el córtex celular. Por ejemplo, EB1, una proteína +TIP presente tanto en levaduras como en humanos, es esencial para el posicionamiento del huso mitótico de las levaduras, dirigiendo los extremos más en crecimiento de los microtúbulos del huso mitótico hacia una región de amarre en la yema y ayudando a su anclaje en esta zona.

En las células, los filamentos se organizan en estructuras de orden más elevado

Hasta ahora, hemos descrito cómo las proteínas accesorias regulan la localización y el comportamiento dinámico de los filamentos del citoesqueleto. Estas proteínas pueden nuclear el ensamblaje de los filamentos, unirse lateralmente a sus extremos, o unirse a las subunidades libres de los filamentos. Pero para que los filamentos del citoesqueleto formen un esqueleto intracelular útil que proporcione a la célula integridad mecánica y determine su forma, los diferentes filamentos tienen que estar organizados e íntimamente unidos formando estructuras de orden más elevado. El centrosoma es un ejemplo de este tipo de organizadores; además de nuclear el crecimiento de los microtúbulos, los mantiene unidos adoptando una geometría definida, con todos los extremos menos inmersos en el centrosoma y los extremos más apuntando hacia el exterior. De esta forma, el centrosoma genera un conjunto de microtúbulos en estrella, que es capaz de encontrar el centro de cada célula (véase Figura 16–32).

Otro mecanismo utilizado para organizar los filamentos en grandes estructuras es el entrecruzamiento de filamentos. Como se ha señalado anteriormente, algunas MAP pueden enlazar microtúbulos y disponen de dos dominios: uno que se une lateralmente al microtúbulo (y lo estabiliza) y otro que se proyecta hacia el exterior y contacta con otros microtúbulos recubiertos de MAP. En el citoesqueleto de actina, las funciones de estabilización y entrecruzamiento están separadas. La tropomiosina se une lateralmente a los filamentos de actina, pero no dispone de ningún dominio de proyección. El entrecruzamiento viene mediado por un segundo grupo de proteínas de unión a la actina que sólo tienen esta función. Los filamentos intermedios son de nuevo distintos; están organizados por autoasociaciones laterales de los propios filamentos y por la actividad de entrecruzamiento de proteínas accesorias como ahora describiremos.

Los filamentos intermedios están empaquetados y entrecruzados formando hileras compactas

Cada filamento intermedio se forma como un largo paquete de subunidades tetraméricas (véase Figura 16–19). Además, muchos filamentos intermedios se empaquetan entre sí y se autoasocian; por ejemplo, las proteínas NF-M y NF-H de los neurofilamentos (véase la Tabla 16-1, p. 985) presentan un dominio C-terminal que se extiende desde la superficie de un filamento intermedio ensamblado hacia el exterior, uniéndose al filamento vecino. Estos grupos de neurofilamentos forman hileras paralelas muy resistentes que se mantienen unidos por contactos laterales múltiples, proporcionando estabilidad y fuerza a las largas extensiones neuronales (véase Figura 16–22).

Otros tipos de empaquetamiento de los filamentos intermedios se mantienen unidos por proteínas accesorias, como la *filagrina*, que en las células en diferenciación de la epidermis empaqueta a los filamentos de queratina proporcionando a las capas más externas de la piel su aspereza característica. La *plectina* es una proteína de entrecruzamiento muy

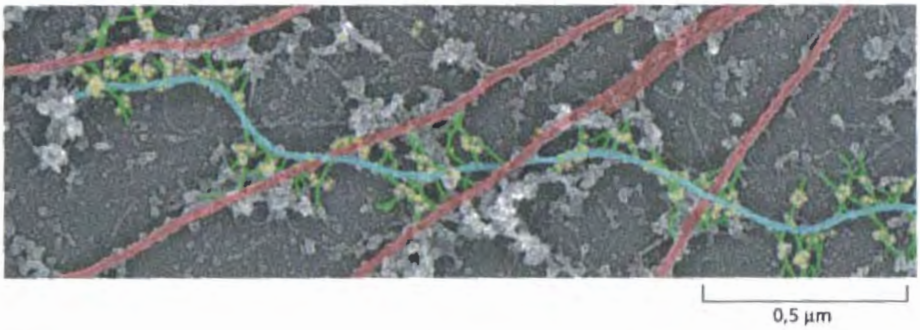


Figura 16–46 La plectina entrecruza diversos elementos del citoesqueleto. La plectina (*verde*) realizando diversos entrecruzamientos entre filamentos intermedios (*azul*) y microtúbulos (*rojos*). En esta electromicrografía, las manchas (*amarillas*) son partículas de oro coloidal unidas a los anticuerpos antiplectina. Para poder observar estas proteínas se ha extraíd toda la red de actina. (De T.M. Svitkina y G.G. Borisy, *J. Cell Biol.*, 135:991-1007, 1996. Con la autorización de The Rockefeller University Press.)

interesante. Además de empaquetar los filamentos intermedios, también los une a los microtúbulos, a los haces de filamentos de actina y a los filamentos de la proteína motora miosina II (descrito más adelante); además permite la unión de los haces de filamentos intermedios a las estructuras adhesivas de la membrana plasmática (**Figura 16–46**).

Mutaciones en el gen de la plectina causan una devastadora enfermedad en la especie humana que combina los efectos de la epidermolisis bullosa (provocada por una alteración de los filamentos de queratina de la piel), con los de la distrofia muscular (a causa de una alteración de los filamentos de desmina) y con una neurodegeneración (provocada por una alteración de los neurofilamentos). El ratón que ha perdido el gen de plectina, muere a los pocos días del nacimiento y presenta ampollas en la piel y unos músculos esquelético y del corazón totalmente anormales. Así pues, aunque la plectina puede no ser imprescindible para la formación inicial y el ensamblaje de los filamentos intermedios, su acción de entrecruzamiento es necesaria para proporcionar a las células la fuerza que necesitan para superar el estrés mecánico inherente a la vida de los vertebrados.

Proteínas de entrecruzamiento de propiedades distintas organizan diferentes ensamblajes de filamentos de actina

En las células animales, los filamentos de actina están organizados en dos tipos de disposiciones: en haces y en redes parecidas a geles (**Figura 16–47**). Como se ha indicado, estas distintas estructuras se forman por la acción de proteínas nucleadoras diferentes: los largos y rectos filamentos producidos por las forminas forman haces y el complejo ARP produce redes (geles). Las proteínas de entrecruzamiento de los filamentos de actina que ayudan a estabilizar y mantener estas estructuras pueden dividirse en dos clases, *proteínas que forman haces* y *proteínas que forman geles*. Las proteínas que forman haces entrecruzan los filamentos de actina en disposiciones paralelas mientras que las que forman geles mantienen unidos los filamentos de actina en intersecciones en diagonal dando lugar a las redes laxas.

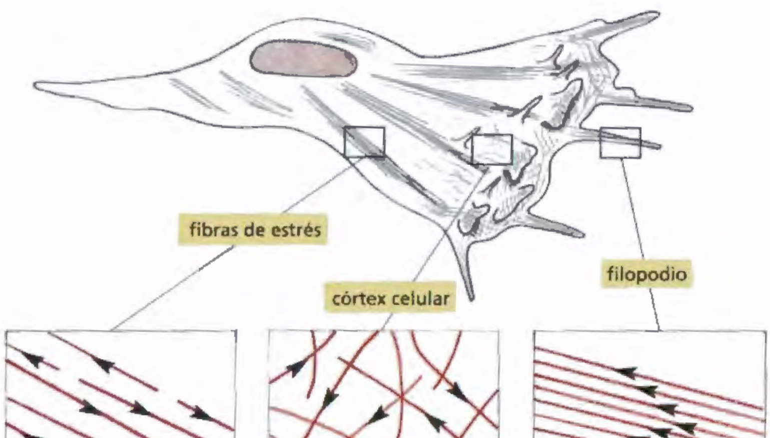


Figura 16–47 Haces de actina en una célul Se muestra un fibroblasto desplazándose en una placa de cultivo, con tres áreas aumentadas para mostrar la organización de los filamentos de actina. Los filamentos d actina pueden verse en *rojo*, con flechas qu apuntan hacia los extremos menos. Las fibr de estrés son contráctiles y ejercen tensión. Los filopodios son proyecciones espinosas de la membrana plasmática que permiten a la célula explorar su entorno. El córtex se sitúa por debajo de la membrana plasmáti

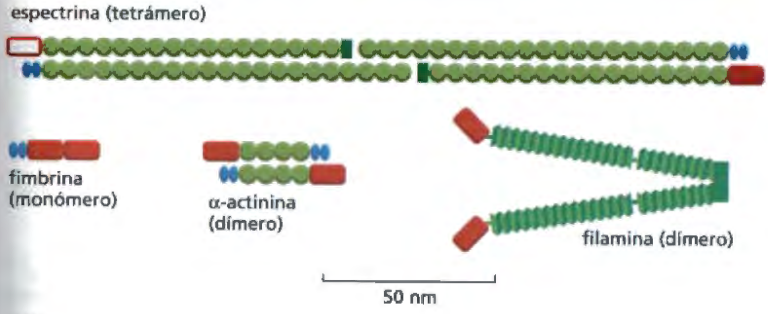


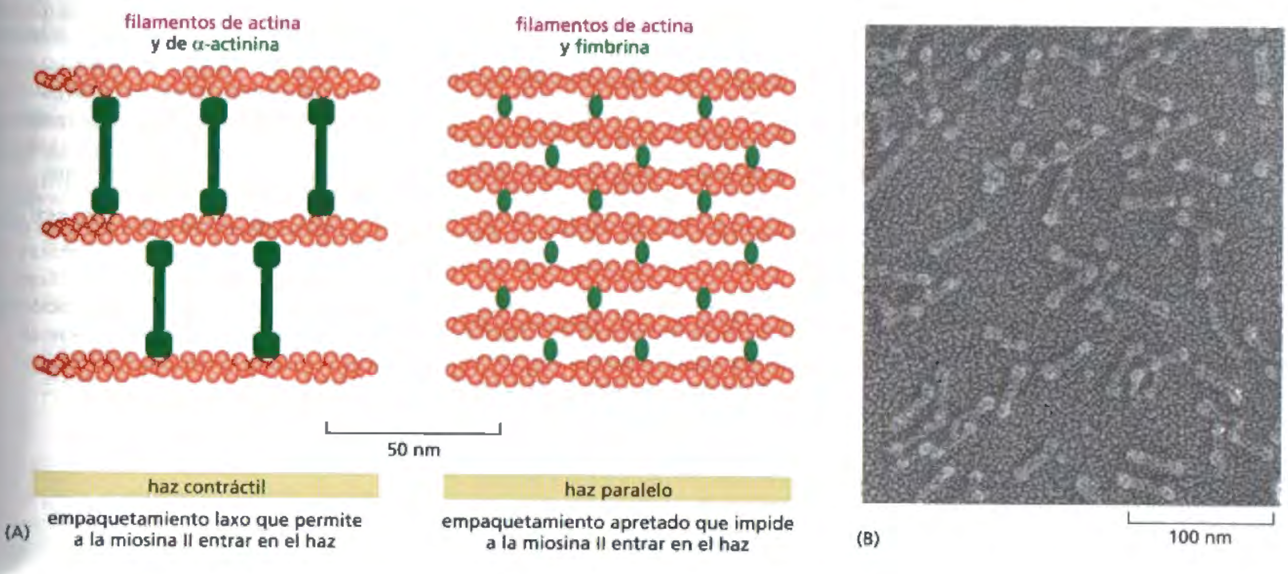
Figura 16–48 Estructuras modulares de cuatro proteínas que entrecruzan los filamentos de actina. Cada una de estas proteínas presenta dos lugares de unión a la actina (en *rojo*) de secuencias relacionadas. La fimbrina tiene dos lugares de unión a la actina directamente adyacentes, de forma que mantiene muy juntos dos filamentos de actina (unos 14 nm), alineados con la misma polaridad (véase Figura 16–49A). En la α-actinina, los dos lugares de unión están separados cerca de 30 nm de forma que los haces de actina que forman están empaquetados de una forma más laxa (véase Figura 16–49A). La filamina tiene dos lugares de unión a actina conectados en forma de V, de manera que entrecruza filamentos de actina formando una red en la que los filamentos forman entre sí ángulos casi rectos (véase Figura 16–51). La espectrina es un tetrámero de dos subunidades α y dos subunidades β; el tetrámero tiene dos lugares de unión de actina espaciados cerca de 200 nm (véase Figura 10–41).

Generalmente, ambos tipos de proteínas entrecruzadoras tienen dos lugares de unión al filamento de actina parecidos entre sí, que pueden formar parte de una cadena polipeptídica sencilla o pueden estar compartidos por dos cadenas polipeptídicas que se mantienen juntas formando un dímero (**Figura 16–48**). El espaciado y la disposición de estos dominios de unión a dos polipéptidos determina el tipo de estructura de actina que forma una determinada proteína entrecruzadora.

Cada tipo de proteína empaquetadora determina qué moléculas pueden interactuar con los filamentos de actina. La miosina II (se trata más adelante) es la proteína motora de las fibras de estrés y de otros conjuntos contráctiles. El empaquetamiento tan elevado provocado por la pequeña proteína empaquetadora monomérica *fimbrina* aparentemente excluye a la miosina, por lo que los filamentos de actina paralelos unidos por fimbrina no son contráctiles; en sentido contrario, la laxitud del empaquetamiento provocado por la proteína empaquetadora dimérica, *α-actinina* permite la entrada de moléculas de miosina, haciendo que las fibras de estrés sean contráctiles (**Figura 16–49**). Como consecuencia de las diferencias de espaciado entre los filamentos de actina, el empaquetamiento por fimbrina automáticamente descarta el empaquetamiento por α-actinina y viceversa, siendo los dos tipos de proteínas mutuamente excluyentes.

La *villina* es otra proteína empaquetadora que, de forma parecida a la fimbrina, presenta dos lugares de unión al filamento de actina muy cercanos en una misma cadena polipeptídica. La villina (junto con la fimbrina) ayudan a entrecruzar de 20 a 30 filamentos de actina empaquetándolos muy estrechamente, como los que encontramos en los microvilli, las extensiones digitiformes presentes en la membrana plasmática de la cara apical de muchas células epiteliales (véase **Figura 16–50**). Por ejemplo, cada célula epitelial de absorción del intestino delgado humano (enterocito) tiene algunos miles de microvilli en su superficie apical. Cada uno de ellos mide cerca de 0,08 μm de diámetro y 1 μm de largo y posibilita que la superficie de absorción celular sea 20 veces mayor de lo que sería si no tuviera microvilli. Cuando se introduce villina en un cultivo de fibroblastos, en células que no presentan esta proteína y sólo tienen unos cuantos microvilli, los microvilli existentes se alargan y se estabilizan a la vez que se induce su aumento de número. El núcleo de los filamentos de actina de los microvilli se adhiere a la membrana plasmática de forma lateral con los brazos de la

Figura 16–49 Formación de dos tipos de haces de filamentos de actina. (A) La α-actinina, que es un homodímero, entrecruza filamentos de actina en haces laxos que permiten a la proteína motora miosina II (no mostrada) participar en el ensamblaje. La fimbrina entrecruza los filamentos en haces muy juntos, que excluyen la miosina. La fimbrina y la α-actinina tienden a excluirse mutuamente debido a las diferencias de espaciado que generan entre los haces de filamentos de actina. (B) Electromicrografía de moléculas de α-actinina purificada. (B, cortesía de John Heuser.)



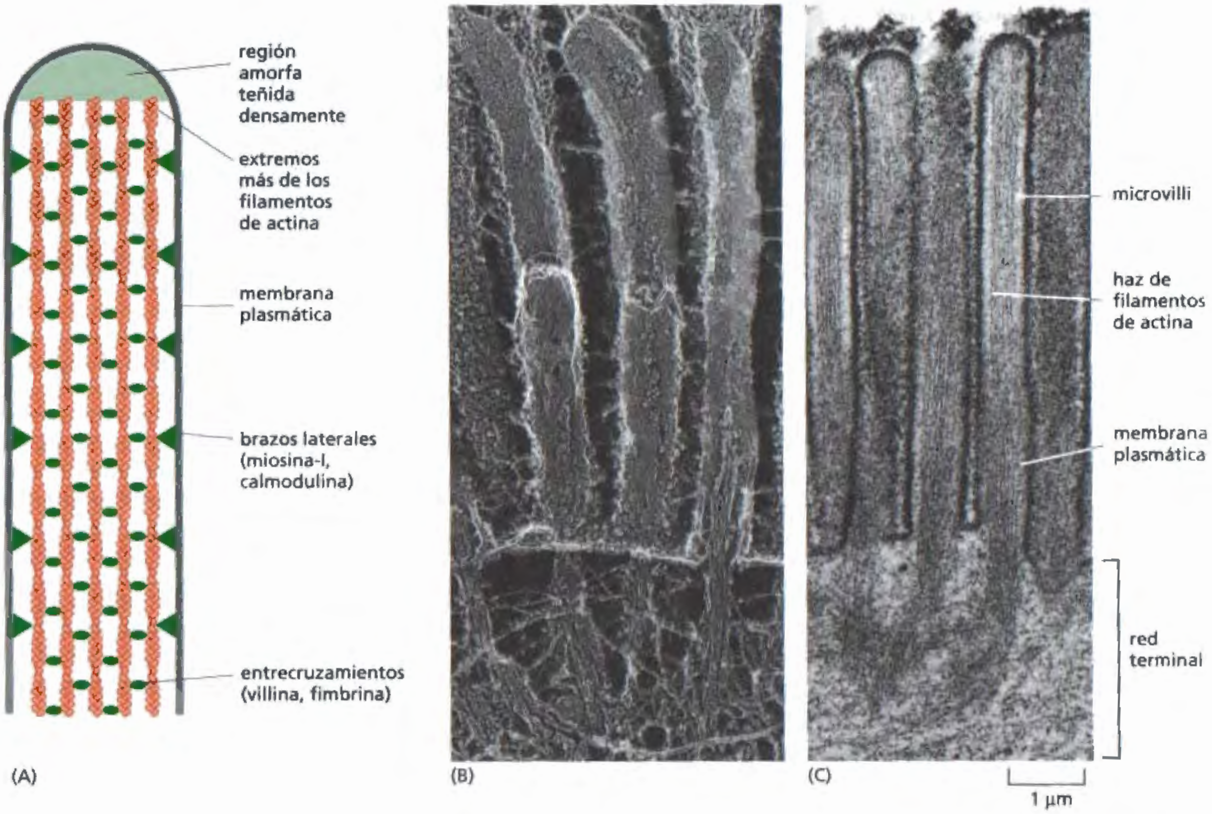


Figura 16–50 Un microvilli. (A) La parte central de un microvilli está formada por haz de filamentos de actina paralelos, qu mantienen mediante proteínas formador de haces de actina-villina y fimbrina. Los brazos laterales (formados de miosina-I y la proteína de unión al Ca^{2+}, calmodulina conectan los lados del haz de filamentos actina a la membrana plasmática contig Los extremos más de los filamentos de a están en el extremo del microvilli, inmer en una sustancia amorfa, muy electrode que tiene una composición desconocid (B) Electromicrografía de una célula epit intestinal tras aplicarle la criofractura, er que se muestra la red terminal situada p debajo de la membrana plasmática apic Los haces de filamentos de actina que f el eje del microvilli se extienden entre l terminal, donde se unen entre sí media un grupo complejo de proteínas del citoesqueleto, que incluyen la espectrir la miosina-II. Por debajo de la red termi encuentra una franja de filamentos intermedios. (C) Micrografía electrónic una fina sección de microvilli. (B, por c de John Heuser; C, de P.T. Matsudaira y Burgess, *Cold Spring Harb. Symp. Quan* 46: 845-854, 1985. Con la autorización Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

miosina I (descrita más adelante), proteína que presenta un lugar de unión al filamento de actina en un extremo y un dominio de unión a lípidos por el otro. Parece que estos dos tipos de entrecruzamientos, uno uniendo los filamentos de actina entre sí y el otro uniéndolos a la membrana plasmática, son suficientes para formar los microvilli celulares. Sorprendentemente los ratones que han perdido el gen de la villina forman microvilli intestinales con una morfología normal, lo cual indica que otras proteínas proporcionan una función redundante suficiente para este propósito. Sin embargo, la remodelación de los microvilli intestinales en respuesta a ciertos tipos de estrés o ayuno está inhibida.

La filamina y la espectrina forman redes de filamentos de actina

Las proteínas empaquetadoras descritas disponen de conexiones rectas y rígidas entre sus dos dominios de unión a los filamentos de actina y tienden a alinear a los filamentos en haces paralelos. Las proteínas entrecruzadoras que disponen de conexiones flexibles entre sus dos dominios de unión no forman haces sino geles laxos de filamentos de actina.

Cualquier proteína entrecruzadora que tenga sus dos dominios de unión a la actina separados entre sí una distancia suficiente puede formar geles de actina tridimensionales. La *filamina* (véase Figura 16–48) facilita la formación de geles altamente viscosos y laxos enlazando dos filamentos de actina en ángulo recto (**Figura 16–51**). Los geles de actina formados por filamina son necesarios para que las células extiendan proyecciones de membrana parecidas a láminas –llamadas *lamelipodios*– que les permiten arrastrarse por superficies sólidas. La filamina ha desaparecido en algunas células cancerosas, especialmente en los melanomas malignos (cánceres de las células pigmentarias). Estas células no pueden arrastrarse de forma apropiada y presentan protuberancias desorganizadas de la membrana (**Figura 16–52**). La pérdida de filamina es mala para la célula de melanoma pero es buena para el paciente; puesto que la célula es incapaz de arrastrarse y migrar, las células sin filamina son menos invasivas que sus semejantes que todavía expresan la proteína, por lo que el cáncer tiene menor tendencia a metastatizar.

Una proteína formadora de geles muy bien estudiada es la *espectrina*, que fue identificada por primera vez en los eritrocitos. La espectrina es una proteína larga y flexible formada por cuatro cadenas polipeptídicas (dos subunidades α y dos subunidades β), dispuestas de forma que los dos lugares de unión al filamento de actina se hallan a 200 nm de distancia

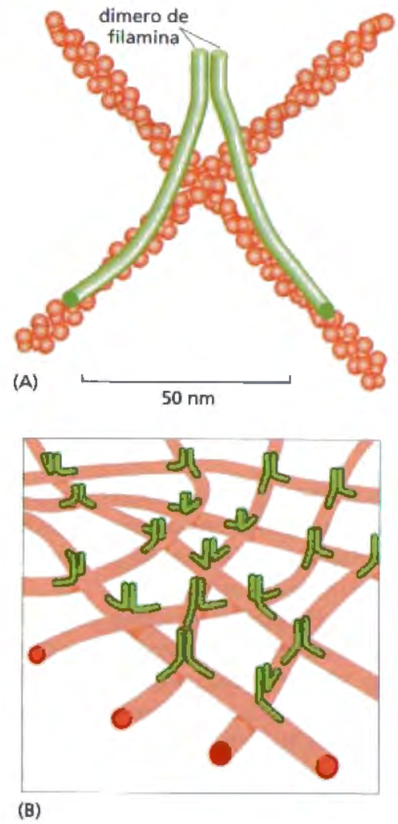


Figura 16–51 La filamina entrecruza filamentos de actina en una red tridimensional que tiene propiedades físicas de gel. (A) Cada homodímero de filamina tiene cerca de 160 nm de longitud cuando está extendida, en su totalidad y forma un ángulo grande y flexible entre dos filamentos de actina adyacentes. (B) Un conjunto de filamentos de actina entrecruzados por filamina forman una red o gel mecánicamente muy fuerte.

compárese con los 14 nm de la fibrina o los 30 nm de la α-actinina, véase Figura 16–48). En los eritrocitos, la espectrina sólo se encuentra debajo de la membrana plasmática, formando un gel bidimensional mantenido por filamentos cortos de actina; la espectrina une este gel a la membrana plasmática puesto que dispone de sitios de unión independientes para proteínas periféricas de membrana, las cuales se encuentran situadas cerca de la bicapa lipídica mediante proteínas integrales de membrana (véase Figura 10–41). La red resultante genera un cortex celular rígido que proporciona un soporte mecánico a la membrana plasmática, que permite a los eritrocitos recuperar su forma habitual después de atravesar los capilares. En el córtex de la mayoría de las células de los vertebrados se han encontrado parientes muy próximos de la espectrina, que también colaboran en el mantenimiento de la forma y la rigidez de la membrana.

Los elementos del citoesqueleto pueden unirse a la membrana plasmática

Las estructuras del citoesqueleto de actina pueden proporcionar rigidez o cambiar la forma de la membrana plasmática. Hemos descrito al menos dos ejemplos: la red de espectrina-actina que yace debajo de la membrana plasmática de los eritrocitos y los haces de villina-actina de los microvilli que incrementan la superficie de absorción en las células epiteliales. La efectividad de estas estructuras depende de la unión específica entre estas estructuras y las proteínas o lípidos de la membrana plasmática.

No se comprenden todavía las conexiones del citoesqueleto cortical de actina con la membrana plasmática. Una amplia familia de proteínas intracelulares íntimamente relacionadas, la familia *ERM* (llamada así por sus tres miembros iniciales, ezrina, radixina y moesina), tienen miembros necesarios para el mantenimiento de la polaridad celular e implicados en la exocitosis y la endocitosis. El dominio C-terminal de las proteínas ERM se une directamente a los lados de los filamentos de actina. El dominio N-terminal se une a la cara citoplasmática de algunas glucoproteínas transmembrana, incluyendo a CD44, el receptor para el ácido hialurónico, un componente de matriz extracelular.

Las uniones entre la actina y la membrana plasmática mediadas por las proteínas ERM están reguladas por señales tanto intracelulares como extracelulares. Las proteínas ERM pueden existir en dos conformaciones, una conformación extendida activa que oligomeriza y se une a la actina y a una proteína transmembrana, y una conformación plegada inactiva, en la cual los extremos N- y C-terminales están empaquetados juntos mediante interacciones intramoleculares. El paso de una conformación a otra se puede producir por fosforilación o por la unión a PIP_2, y cualquiera de los dos se puede producir, por ejemplo, en respuesta a señales extracelulares. Así pues, la fuerza de los contactos mediados por las proteínas ERM entre el citoesqueleto de actina y la matriz extracelular es sensible a una gran variedad de señales recibidas por la célula (**Figura 16–53**).

La pérdida de uno de los miembros de la familia, llamado *merlina*, comporta la aparición de una forma de la enfermedad genética denominada *neurofibromatosis*, en la cual se

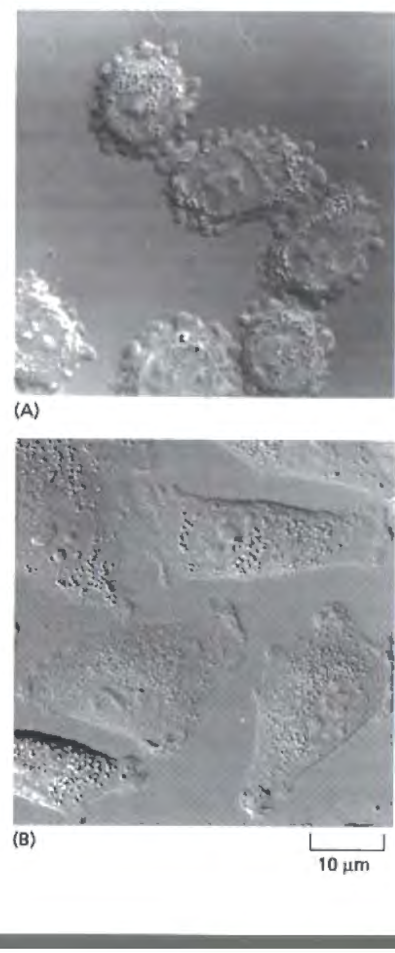


Figura 16–52 La pérdida de filamina provoca anomalías en la motilidad celular. (A) Grupo de células de melanoma que presentan un nivel anormalmente bajo de filamina. Estas células no son capaces de formar lamelipodios normales, sino que están cubiertas con "burbujas" de membrana. Como consecuencia de ello pueden arrastrarse muy poco y no tienden a formar metástasis. (B) Las mismas células de melanoma a las que se les ha restaurado artificialmente la expresión de filamina. Ahora las células forman lamelipodios normales y son muy metastásicas. Este ejemplo pone de manifiesto el profundo efecto que puede tener la presencia o ausencia de una proteína estructural sobre la morfología y la motilidad celulares. (De C. Cunningham et al., *J. Cell Biol.* 136:845-857, 1997. Con la autorización de The Rockefeller University Press.)

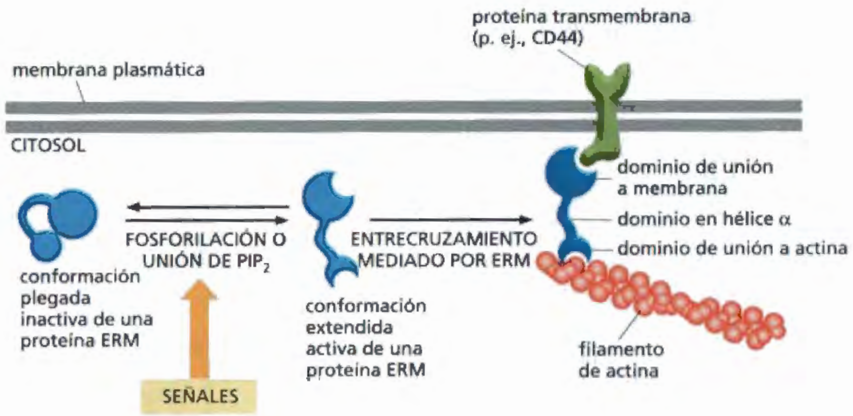


Figura 16-53 Papel de las proteínas de la familia ERM en la adhesión de los filamentos de actina a la membrana plasmática. El desplegamiento regulado de las proteínas de la familia ERM, inducido por fosforilación o unión a PIP_2, deja expuestos dos lugares de unión, uno para un filamento de actina y otro para una proteína transmembrana. Por tanto, la activación de estas proteínas puede originar y estabilizar protuberancias de la superficie de la célula en respuesta a señales extracelulares.

desarrollan múltiples tumores benignos en los nervios auditivos y en otras partes del sistema nervioso. Esta es una de las muchas indicaciones de la existencia de un sistema de retroalimentación que conecta los elementos estructurales celulares con el control del crecimiento celular (véase Capítulo 17).

Las proteínas descritas en este apartado, que controlan el ensamblaje y posicionamiento de los filamentos de actina y de los microtúbulos, se resumen en el Panel 16-3 (pp. 994-995). Algunas de estas proteínas tienen una función adicional de ayuda conectando la estructura interna de la célula con otras células o con la membrana basal extracelular. Tanto los filamentos de actina como los filamentos intermedios son cruciales para este tipo de conexiones, que requieren las uniones célula-célula y célula-matriz que se describirán en el Capítulo 19.

Resumen

Las diversas formas y funciones de las estructuras de los filamentos del citoesqueleto en las células eucariotas dependen de un repertorio muy versátil de proteínas accesorias. Cada uno de los tres tipos de filamentos (microtúbulos, filamentos intermedios y filamentos de actina) dispone de un conjunto importante de tales proteínas accesorias.

Un determinante primario de los lugares donde se forman estructuras del citoesqueleto es la regulación de los procesos que permiten la nucleación de nuevos filamentos. En la mayoría de células animales, los microtúbulos se nuclean en el centrosoma, un complejo de ensamblaje localizado cerca del centro de la célula. Por el contrario, la mayor parte de los filamentos de actina se nuclean cerca de la membrana plasmática.

La cinética de ensamblaje y desensamblaje de un filamento puede verse enlentecida o acelerada por proteínas accesorias que se unen a las subunidades libres o a los filamentos. Algunas de estas proteínas alteran la dinámica de los filamentos uniéndose a sus extremos o fragmentándolos en segmentos más pequeños. Otro grupo de proteínas accesorias ensambla los filamentos en grandes estructuras ordenadas, entrecruzándolos en formas definidas geométricamente, y otra familia de proteínas accesorias determina la forma y las propiedades adhesivas de las células, uniendo los filamentos a la membrana plasmática.

MOTORES MOLECULARES

Entre las proteínas más fascinantes que se asocian con el citoesqueleto están los motores moleculares llamados **proteínas motoras**. Estas proteínas extraordinarias se unen a los filamentos polarizados del citoesqueleto y utilizan la energía derivada de ciclos repetidos de hidrólisis del ATP para desplazarse sobre ellos. En cada célula eucariota pueden coexistir docenas de proteínas motoras diferentes. Se diferencian en el tipo de filamento al que se unen (unas a los de actina y otras a los microtúbulos), en el sentido en el que se desplazan a lo largo del filamento y en la carga que transportan. Muchas proteínas motoras transportan orgánulos rodeados de membrana –tales como mitocondrias, cisternas del Golgi o vesículas secretoras– a sus localizaciones apropiadas de la célula. Otras proteínas motoras inducen a los filamentos del citoesqueleto a ejercer tensión o a deslizarse unos contra otros, generan-

las fuerzas que permiten fenómenos tales como la contracción muscular, el batido de los cilios o la división celular.

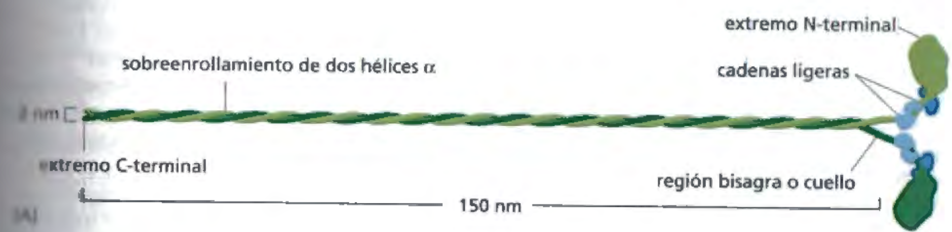
Las proteínas motoras del citoesqueleto, que se desplazan de forma unidireccional orientada a lo largo de un polímero, actúan de forma parecida a otras proteínas o complejos proteicos de las que ya hemos tratado, tales como las polimerasas de DNA y de RNA, las helicasas y los ribosomas. Todas ellas tienen capacidad de utilizar energía libre para propulsarse a lo largo de una vía determinada; la dirección de este deslizamiento es dependiente de la polaridad estructural de la vía. Todas ellas generan desplazamiento acoplando la hidrólisis de nucleótidos trifosfato a cambios conformacionales a gran escala de la proteína, como explicamos en el Capítulo 3 (véase Figura 3–77).

Las proteínas motoras del citoesqueleto se asocian a sus vías de filamentos mediante regiones apicales o "cabeza", también llamadas *dominios motores*, que unen ATP y lo hidrolizan. Dirigidas por ciclos de hidrólisis del nucleótido que produce cambios conformacionales, las proteínas oscilan entre estados en los cuales están fuertemente unidas al filamento y estados en los que no lo están. A través de un ciclo mecánico-químico de unión al filamento, cambio conformacional, liberación del filamento, relajación conformacional y unión de nuevo al filamento, la proteína motora y su carga asociada se desplazan, paso a paso, a lo largo del filamento (de forma característica una distancia de unos cuantos nanómetros). El dominio motor (cabeza) determina la identificación de la vía y la dirección del desplazamiento mientras que las colas de las proteínas motoras determinan el tipo de carga y, por tanto, la función biológica de cada proteína motora.

Esta sección, se inicia con la exposición de los tres grupos de proteínas motoras: miosinas, quinesinas y dineínas. A continuación describiremos de qué manera pueden transportar los orgánulos rodeados de membrana o cambiar la forma de estructuras construidas a partir de filamentos del citoesqueleto. En el último apartado de este capítulo, se examinará cómo la colaboración entre las proteínas motoras y los filamentos dinámicos del citoesqueleto descrito anteriormente inducen comportamientos celulares complejos.

Las proteínas motoras basadas en actina son miembros de la superfamilia de las miosinas

La primera proteína motora identificada fue la **miosina** del músculo esquelético, que genera la fuerza de la contracción muscular. Esta miosina llamada *miosina II* (véase más abajo) es una proteína alargada formada por dos cadenas pesadas y dos copias de dos cadenas ligeras. Cada una de las cadenas pesadas dispone de un dominio apical globular en su extremo N-terminal que contiene la maquinaria generadora de la fuerza, seguida de una secuencia de aminoácidos muy larga que forman un dominio helicoidal que favorece la dimerización de la cadena pesada (**Figura 16–54**). Las dos cadenas ligeras se unen cerca del dominio apical N-terminal, mientras que la cola helicoidal se empaqueta con las colas de otras moléculas de miosina. Estas interacciones cola-cola forman grandes "filamentos gruesos" bipolares for-



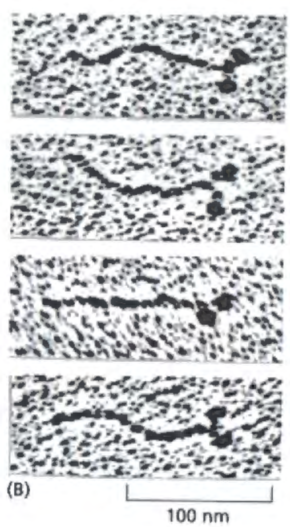


Figura 16–54 La miosina II. (A) Una molécula de miosina II está compuesta por dos cadenas pesadas, cada una de las cuales tiene alrededor de 2000 aminoácidos de longitud (*verde*) y cuatro cadenas ligeras (*azul*). Las cadenas ligeras son de dos tipos; en cada cabeza de miosina hay una molécula de cada tipo. La dimerización se produce cuando las dos hélices α se enroscan una alrededor de la otra formando un sobreenrollamiento mediado por la asociación de aminoácidos hidrofóbicos localizados regularmente (véase Figura 3–9). La disposición en sobreenrollamiento produce una cuerda extendida en solución, por lo que esta parte de la molécula se denomina el dominio de cuerda o cola. (B) Las dos cabezas globulares y la cola pueden observarse claramente en micrografías electrónicas de moléculas de miosina sombreadas con platino. (B, por cortesía de David Shotton.)

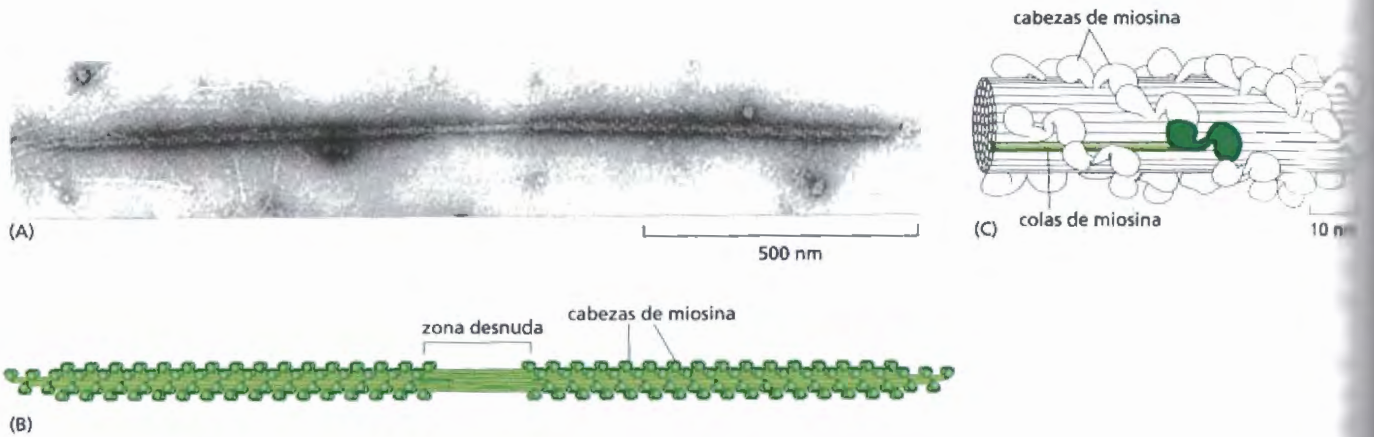


Figura 16–55 El filamento grueso bipolar de la miosina II en el músculo. (A) Electromicrografía de un filamento grueso de miosina II aislad a partir de músculo de rana. Nótese la zona central desnuda, libre de dominios de cabeza. (B) Esquema no dibujado a escala. Las moléculas de miosina II se agregan conjuntamente a través de sus colas, de forma que sus cabezas se proyectan hacia el exterior del filamento. La zona desnuda del centro del filamento está formada por colas de miosina II. (C) Pequeña sección de un filamento de miosina II, reconstruido a partir de electromicrografías. En *verde* se ha representado una molécula de miosina. Los filamentos citoplasmáticos de miosina II en las células no musculares son mucho más pequeños aunque de organización parecida (véase Figura 16–72). (A, por cortesía de Murray Stewart; C, basado en R.A. Crowther, R. Padron y R. Craig, *J. Mol. Biol.* 184:429-439, 1985. Con la autorización de Academic Press.)

mados por cientos de cabezas globulares, que en los extremos del filamento grueso se hallan orientadas en sentidos opuestos (**Figure 16–55**).

Cada cabeza de miosina une e hidroliza ATP, utilizando la energía de la hidrólisis para "caminar" hacia el extremo más del filamento de actina. La orientación opuesta de las cabezas en el filamento grueso hace que el filamento sea eficiente para deslizar pares de filamentos de actina orientados de forma opuesta, acercándolos entre sí. En el músculo esquelético, en el cual los filamentos de actina están organizados cuidadosamente y alineados formando filamentos finos que envuelven a los gruesos filamentos de miosina, el deslizamiento dirigido por el ATP de los filamentos de actina provoca la contracción muscular (descrito más adelante). Los músculos cardíaco y liso tienen moléculas de miosina II dispuestas de forma parecida, aunque están codificadas por genes distintos.

Cuando una miosina muscular es digerida por quimiotripsina y papaína, el dominio apical (o cabeza) se libera como un fragmento intacto (llamado S1). El fragmento S1, por sí solo, puede generar *in vitro* el deslizamiento de los filamentos, lo cual indica que la actividad motora radica por completo en esta cabeza (**Figura 16–56**).

Inicialmente se pensó que la miosina sólo estaba presente en el músculo, pero en la década de 1970 un grupo de investigación descubrió una miosina similar de doble cabeza en

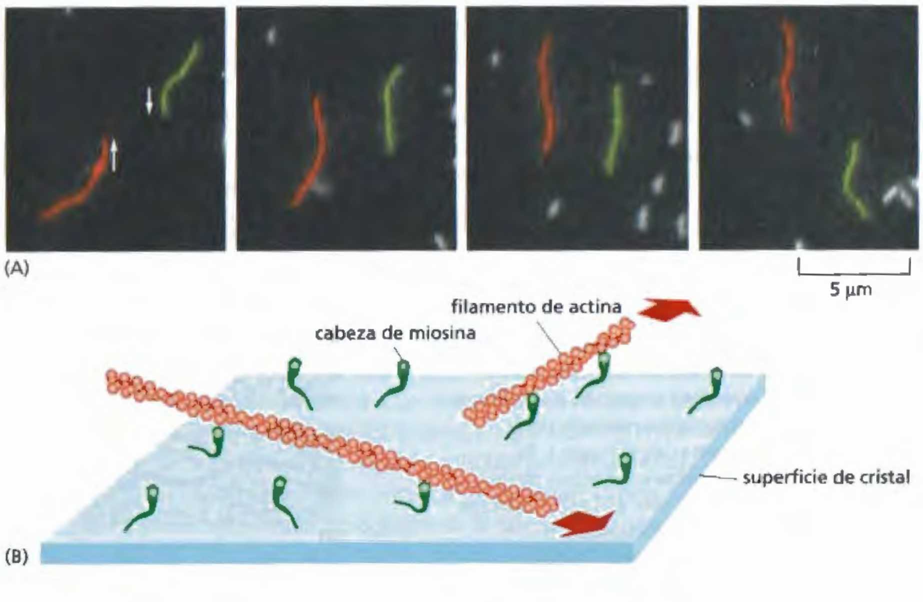


Figura 16–56 Evidencia directa de la actividad motora de la cabeza de miosina. <TTAT> En este experimento, se unieron cabezas de miosina S1 purificadas a una superficie de cristal y se añadieron filamentos de actina marcados con faloidina fluorescente permitiendo que se unieran a las cabezas de miosina. (A) Cuando se añadió ATP, los filamentos de actina empezaron a desplazarse por la superficie, obligados por cada uno de los pasos dados por las docenas de cabezas de miosina unidas al filamento. Las imágenes de vídeo fueron grabadas a intervalos de 0,6 segundos; los dos filamentos de actina mostrados (uno *rojo* y otro *verde*) se desplazan en sentidos opuestos, a una velocidad aproximada de 0,4 μm/segundo. (B) Diagrama del experimento. Las grandes flechas *rojas* indican el sentido del desplazamiento del filamento de actina. (A, por cortesía de James Spudich.)

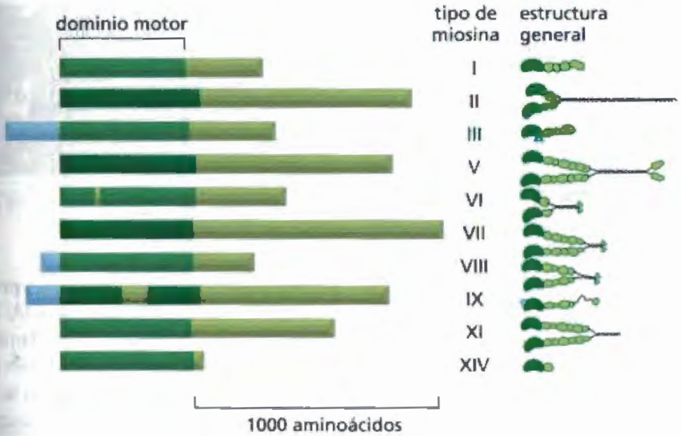


Figura 16–57 Miembros de la superfamilia de las miosinas. Comparación del dominio estructural de las cadenas pesadas de algunos tipos de miosinas. Todas las miosinas comparten dominios motores parecidos (se presenta en *verde oscuro*), pero sus colas C-terminales (*verde claro*) y sus extensiones N-terminales (*azul claro*) son muy diversas. A la derecha se representan las estructuras moleculares de miembros de estas familias. Muchas miosinas forman dímeros, con dos dominios motores por molécula, pero algunas (como la I, la IX y la XIV) parece que actúan como monómeros, con un solo dominio motor. La miosina VI, a pesar de tener una estructura muy parecida al resto de miembros de la familia, es la única que se desplaza hacia el extremo menos (en vez de hacia el extremo más) de los filamentos de actina. Probablemente el responsable de esta variación en el sentido del desplazamiento sea la pequeña inserción dentro del dominio motor de la cabeza, que no se ha encontrado en otras miosinas.

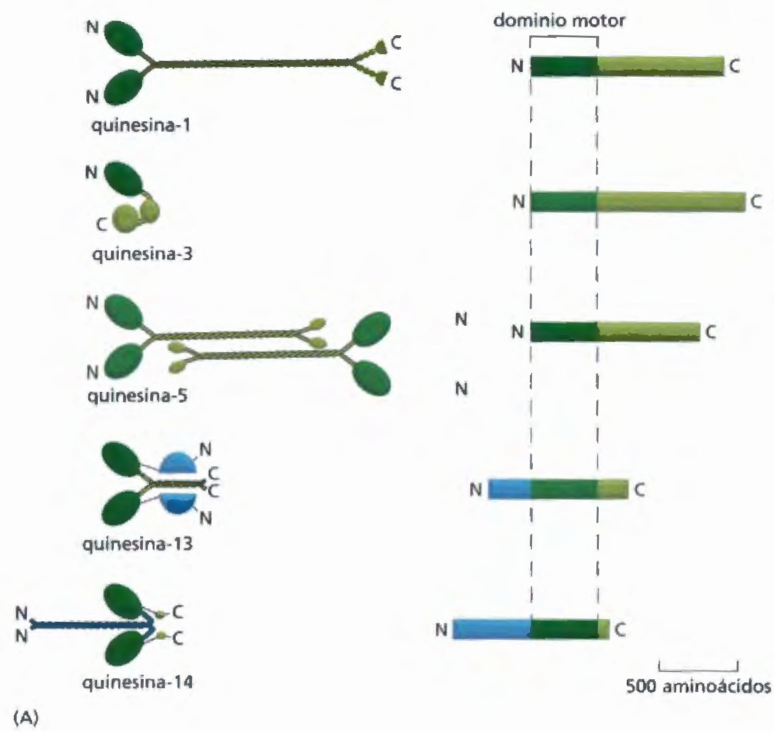
células no musculares, incluyendo a los protozoos. Casi al mismo tiempo otro grupo de investigación encontró una miosina en la ameba de agua dulce *Acanthamoeba castellanii*, que dispone de un dominio motor similar al dominio apical de la miosina muscular pero con una cola completamente distinta. Parece que esta molécula funciona en forma de un monómero por lo que se la llamó *miosina I* (por una cabeza); entonces, la miosina convencional se rebautizó como *miosina II* (por dos cabezas).

A partir de este momento, se descubrieron más miosinas. Tienen cadenas pesadas que generalmente empiezan con un dominio motor de miosina reconocible en el extremo N-terminal mientras que los dominios de cola C-terminales son muy variados (**Figura 16–57**). Los nuevos tipos de miosina identificados incluyen un gran número de variedades de una y dos cabezas, relacionadas de forma casi igual con la miosina I que con la miosina II. La nomenclatura refleja (excepto para I y II) el orden en el cual han sido descubiertas (desde la miosina III hasta la miosina XVIII). Comparaciones de secuencia entre los diversos eucariotas indican que existen al menos 37 familias de miosinas distintas dentro de la superfamilia. Las colas de miosina (y por lo general las colas de las proteínas motoras) se han diversificado a lo largo de la evolución permitiendo que estas proteínas dimericen con otras subunidades e interactúen con cargas distintas.

Algunas miosinas (como p. ej. la VIII y la XI) sólo se han encontrado en plantas, y algunas otras sólo en vertebrados (la IX). Sin embargo, la mayoría de ellas se han encontrado en todos los eucariotas, lo cual sugiere que las miosinas aparecieron pronto en la evolución eucariota. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* contiene cinco miosinas: dos miosinas I, una miosina II y dos miosina V. Puede especularse que estos tres tipos de miosina son los necesarios para que cualquier célula eucariota sobreviva, mientras que el resto de miosinas realizan funciones más especializadas, en particular en los organismos pluricelulares. El nematodo, *C. elegans*, por ejemplo, tiene al menos 15 genes de miosina que representan siete clases estructurales; el genoma humano incluye 40 genes de miosina. Nueve de las miosinas humanas se expresan principalmente o exclusivamente en las células pilosas del oído interno, y se sabe que mutaciones en cinco de ellas provocan sordera hereditaria. Estas miosinas muy especializadas son importantes para la construcción y función de los hermosos y complejos haces de estereocilios ricos en actina que se encuentran en la superficie apical de estas células (véase Figura 9–50), que se inclinan como respuesta al sonido y convierten las ondas sonoras en señales eléctricas (tratado en el Capítulo 23).

Todas estas miosinas excepto una se desplazan hacia los extremos más de los filamentos de actina, aunque lo hacen a velocidades distintas. La excepción es la miosina VI, que se desplaza hacia el extremo menos.

Las funciones exactas de la mayoría de las miosinas todavía no se han determinado. La miosina V interviene en el transporte de orgánulos y vesículas. La miosina II siempre está asociada a la actividad contráctil en células musculares y no musculares. También es necesaria para la citocinesis, para dividir la célula en dos células hijas y para desplazar el soma celular durante la migración. La miosina I contiene a menudo un segundo lugar de unión a actina o un lugar de unión a la membrana en sus regiones de cola y, generalmente, están implicados en la organización intracelular incluyendo la protuberancia de estructuras ricas en actina de la superficie de la célula, como se ha indicado para la construcción de los microvilli (véase Figura 16–50).



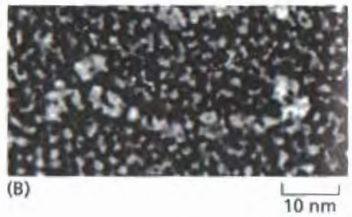


Figura 16-58 La quinesina y las proteínas relacionadas con la quinesina. (A) Estructura de cinco miembros de la superfamilia de las quinesinas. Como sucede también en la superfamilia de la miosinas, sólo se ha conservado el dominio motor. La quinesina-1 tiene el dominio motor en el extremo N-terminal de la cadena pesada. El dominio del centro forma un largo sobreenrollamiento que permite la dimerización. El extremo C-terminal forma una cola que se une a una carga, como por ejemplo a orgánulos rodeados de membrana. La quinesina-3 representa un miembro poco común de la familia que parece actuar como monómero y desplaza a los orgánulos rodeados de membrana a lo largo de los microtúbulos. La quinesina-5 forma tetrámeros en los que los dos dímeros se asocian a través de sus colas. El tetrámero bipolar de quinesina-5 es capaz de deslizar dos microtúbulos, uno respecto al otro, en una actividad análoga a la de los gruesos filamentos bipolares formados por miosina II. La quinesina-13 tiene su dominio motor localizado en el centro de la cadena pesada. Es un miembro de la familia de las quinesinas que ha perdido la actividad motora típica y se une a los extremos de los microtúbulos aumentando su inestabilidad dinámica; se les llama factores de catástrofe (véase p. 1003) La quinesina-14 es un miembro de la familia de las quinesinas de extremo C-terminal que incluye la proteína Ncd de *Drosophila* y la proteína Kar3 de levaduras. Generalmente estas quinesinas viajan en sentido contrario al resto de quinesinas, es decir hacia el extremo menos de los microtúbulos en lugar de hacia los extremos más. (B) Electromicrografía de una molécula de quinesina obtenida por criofijación, con sus dominios de cabeza a la izquierda. (B, cortesía de John Heuser.)

Existen dos tipos de proteínas motoras de microtúbulos: las quinesinas y las dineínas

La **quinesina** es una proteína motora que se desplaza a lo largo de los microtúbulos. Fue identificada en el axón gigante del calamar, donde transporta orgánulos celulares rodeados de membrana desde el soma neuronal hacia el axón terminal, desplazándose hacia los extremos más de los microtúbulos. La quinesina es estructuralmente parecida a la miosina II, ya que cada motor activo tiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras; éstas forman dos cabezas globulares que actúan de dominios motores y una cola helicoidal alargada responsable de la dimerización de la cadena pesada. Como la miosina, la quinesina es miembro de una gran superfamilia de proteínas cuyo único elemento común es el dominio motor (**Figura 16–58**). La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene seis quinesinas diferentes. El nematodo *C. elegans* tiene 16 quinesinas mientras que los humanos tenemos cerca de 45.

En la superfamilia de las quinesinas existen al menos catorce familias distintas. La mayoría de ellas tienen el dominio motor en el extremo N-terminal de la cadena pesada y se dirigen hacia el extremo más de los microtúbulos. Una familia en particular interesante dispone del dominio motor en el extremo C-terminal y se desplaza en la dirección opuesta, hacia los extremos menos de los microtúbulos. Algunas cadenas pesadas de la quinesina han perdido la secuencia helicoidal y actúan como monómeros, de forma análoga a la miosina I. Otras son homodímeros o heterodímeros. Miembros de la familia de la quinesina-5 se autoasocian a través de su dominio de cola y forman un motor bipolar que desliza dos microtúbulos en sentido opuesto uno del otro, acercándolos, igual que los filamentos gruesos de miosina II con filamentos de actina. La mayoría de quinesinas disponen de un lugar de unión en la cola que transporta orgánulos rodeados de membrana u otros microtúbulos. Muchos de los miembros de la superfamilia de las quinesinas tienen papeles específicos en la formación de los husos mitótico y meiótico y en la separación de los cromosomas durante la división celular.

Las **dineínas** son una familia de proteínas motoras que se dirigen hacia los extremos menos de los microtúbulos, pero que no están relacionadas con la superfamilia de las quinesinas. Están formadas por dos o tres cadenas pesadas (que incluyen un dominio motor) y un número grande y variable de cadenas intermedias y cadenas ligeras asociadas. La familia de las dineínas tiene dos ramas principales (**Figura 16–59**). La rama más ancestral contiene las *dineínas citoplasmáticas*, homodímeros de cadenas pesadas con dos dominios motores muy grandes como cabeza. Las dineínas citoplasmáticas se encuentran en casi todas las cé-

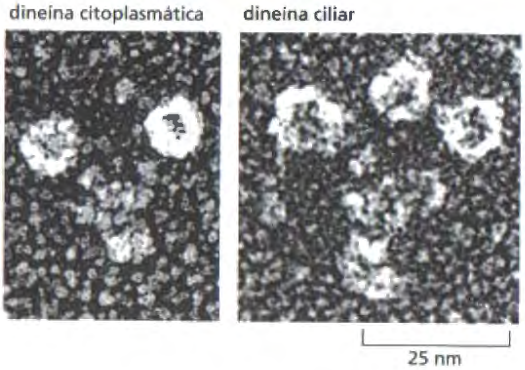


Figura 16–59 Dineínas. Electromicrografía de grabado por congelación de una molécula de dineína citoplasmática y una molécula de dineína ciliar (del axonema). Como en la miosina II y en las quinesinas, las dineínas citoplasmáticas son moléculas con dos cabezas. La dineína ciliar mostrada procede de un protozoo y tiene tres cabezas; la dineína de animales tiene dos cabezas. Obsérvese que la cabeza de dineína es muy grande comparada con la de las miosinas o la de las quinesinas. (Cortesía de John Heuser).

células eucariotas y son importantes para el tráfico de vesículas y también para la localización del complejo de Golgi cerca del centro de la célula. La otra gran rama son las *dineínas axonemales*, heterodímeros o heterotrímeros, con dos o tres dominios motores o cabezas respectivamente. Están altamente especializadas para el desplazamiento deslizante eficiente y rápido de los microtúbulos en los cilios y flagelos (se tratará más adelante). Una tercera rama minoritaria comparte semejanzas de secuencia con las dineínas citoplasmáticas aunque parece que participa en el movimiento de cilios y flagelos.

Las dineínas son los motores moleculares conocidos de mayor tamaño y también son unos de los más rápidos: las dineínas axonemales pueden desplazar los microtúbulos en un tubo de ensayo a la velocidad de 14 μm/segundo. En comparación, las quinesinas más rápidas pueden desplazar los microtúbulos cerca de 2-3 μm por segundo. Más adelante se explicará cómo funcionan.

El parecido estructural entre la miosina y la quinesina refleja un origen evolutivo común

Los dominios motores de las miosinas son más grandes que los de las quinesinas, cerca de 850 aminoácidos respecto a 350. Estos dos tipos de proteínas motoras viajan a lo largo de filamentos distintos, presentan propiedades cinéticas distintas y no tienen semejanzas identificables en sus secuencias de aminoácidos. Sin embargo, el estudio de la estructura tridimensional de los dominios motores de la miosina y de la quinesina ha revelado que estos dos dominios están construidos alrededor de núcleos casi idénticos (**Figura 16–60**). El elemento generador de la fuerza central que tienen en común los dos tipos de proteínas motoras incluye el lugar de unión al ATP y la maquinaria necesaria para transformar la hidrólisis del ATP en un cambio conformacional alostérico. Grandes lazos que se extienden a partir del núcleo central causan las diferencias de tamaño del dominio y son los responsables de la

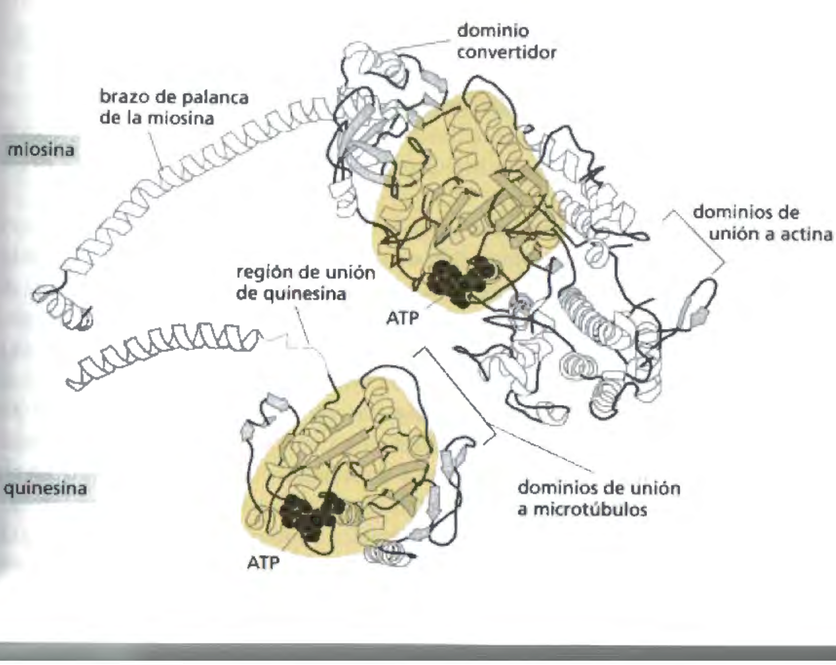


Figura 16–60 Estructuras obtenidas mediante cristalografía de rayos X de cabezas de miosina y de quinesina. Los dominios centrales de unión al nucleótido (sombreado *amarillo*) son estructuralmente muy parecidos. Los distintos tamaños y funciones de los dos motores son debidos a diferencias importantes en los dominios de unión al polímero y las zonas de transducción de fuerza del dominio motor. (Adaptado de L.A. Amos y R.A. Cross, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:239-246, 1997. Con la autorización de Elsevier.)

selección de la vía. Estas regiones incluyen el lugar de unión a actina y de unión a los microtúbulos, en la miosina y en la quinesina respectivamente. Se cree que ambas proteínas descienden de una proteína motora precursora ancestral común y que las diferencias en la especialización de sus funciones se producen a través de duplicaciones génicas y modificaciones de los lazos producidas a lo largo de la evolución y a partir del núcleo central.

Una clave importante sobre el grado de implicación de este núcleo central en la generación de la fuerza procede de los parecidos estructurales entre el lugar de unión de los nucleótidos entre estas proteínas y las pequeñas GTPasas de la superfamilia de Ras. Como hemos indicado en el Capítulo 3 (véase Figura 3–72), estas proteínas presentan conformaciones diferentes en su estado unido a GTP (activo) y en su estado unido a GDP (inactivo): el lazo móvil del lugar de unión al nucleótido está íntimamente en contacto con el γ-fosfato del estado unido a GTP, pero estos lazos cambian de conformación cuando el γ-fosfato hidrolizado se libera. Aunque los detalles del movimiento son distintos para las dos proteínas motoras y en un caso se hidroliza ATP y en el otro GTP, el cambio estructural relativamente pequeño que se produce en el lugar activo –por la ausencia o presencia de un fosfato terminal– se amplifica de forma parecida en ambos casos y produce la rotación de una parte diferente de la proteína.

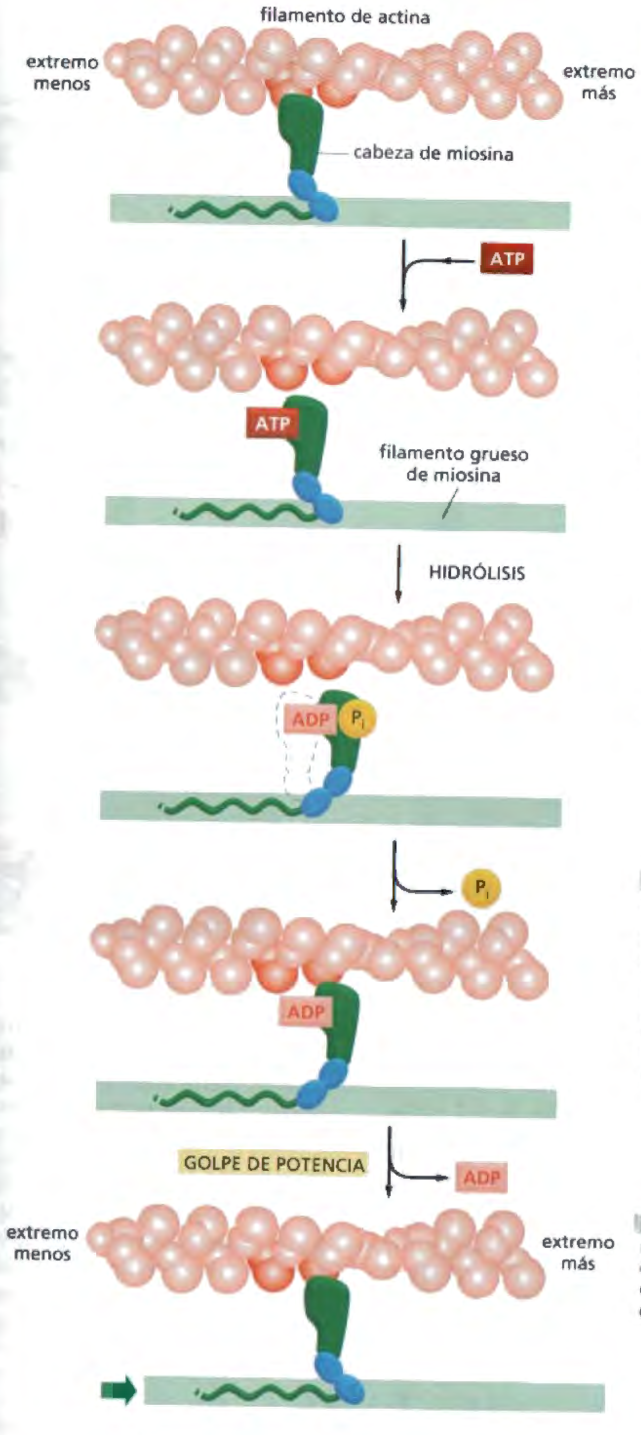
En la quinesina y en la miosina, un lazo de este tipo interacciona con las regiones de la proteína implicadas en la unión a la actina y a los microtúbulos respectivamente, permitiendo que los cambios estructurales causados por el ciclo de hidrólisis del ATP sean transmitidos a la interfase de unión al polímero. Parece que la transmisión de cambios estructurales entre el sitio de unión al polímero y el lugar de hidrólisis del nucleótido actúa en ambos sentidos, ya que la actividad ATPasa de las proteínas motoras está activada con intensidad por la unión a los filamentos que hacen de carriles.

Las proteínas motoras generan fuerza acoplando la hidrólisis del ATP a cambios conformacionales

Las proteínas motoras del citoesqueleto y las proteínas que unen GTP utilizan los cambios estructurales, que se producen en sus lugares de unión a los nucleósidos trifosfato, para producir interacciones cíclicas con la proteína a la que se unen. Sin embargo, las proteínas motoras tienen un requerimiento adicional: cada ciclo de unión y liberación debe empujarlas en un sentido determinado a lo largo del filamento, hacia un nuevo lugar de unión del mismo filamento. Para conseguir este movimiento unidireccional las proteínas motoras utilizan la energía derivada de la unión e hidrólisis del ATP, generando un movimiento amplio en una parte de la molécula proteica. En el caso de la miosina, cada etapa del movimiento a lo largo de la actina viene generada por un balanceo de unos 8,5 nm de largo en la hélice α, o *brazo de palanca*, estabilizado estructuralmente por la unión de las cadenas ligeras. En la base de este brazo de palanca y cerca de la cabeza existe una hélice parecida a un pistón, que conecta los movimientos producidos en la hendidura de unión del ATP de la cabeza, con pequeñas rotaciones en el dominio llamado convertidor (véase Figura 16–60). Un pequeño cambio en este punto provoca un balanceo de la hélice, como si fuera una larga palanca, que hace que el extremo de la hélice se desplace cerca de 5 nm.

Estos cambios conformacionales de la miosina están acoplados con cambios en su afinidad de unión a la actina, permitiendo que la cabeza de miosina se libere del punto de agarre a la actina y busque otro punto de agarre. El ciclo mecanoquímico completo de unión del nucleótido, hidrólisis del nucleótido y liberación del fosfato (que provoca la fuerza impulsora) produce una etapa del movimiento (**Figura 16–61**).

En la quinesina, en vez del golpe del brazo de palanca, los pequeños movimientos del brazo en el lugar de unión del nucleótido regulan la unión y liberación del dominio motor de la cabeza hacia una región larga de unión que conecta esta cabeza motora en un extremo con el dominio de dimerización sobreenrollado situado en el otro extremo (véase Figura 16–61). Cuando el frente (director) de la cabeza de quinesina está unido al microtúbulo antes de que se inicie la fuerza impulsora, su región de unión está desestructurada. Al unirse el ATP, la región de unión se desplaza a lo largo de la cabeza de forma lateral, lo cual empuja a la segunda cabeza hacia una posición en la que podrá unirse de nuevo al protofilamento, 8 nm más cercana al extremo más del microtúbulo que el lugar de unión para la primera cabeza. Los ciclos de hidrólisis del nucleótido en las dos cabezas están coordinados y permiten que las dos cabezas motoras se desplacen mano a mano (o cabeza a cabeza) a modo de escalera (**Figura 16–62**) y avancen cada vez un discreto "escalón" de 8 nm.



UNIÓN Al iniciarse el ciclo que se muestra en la figura, una cabeza de miosina, sin ningún nucleótido unido, se une fuertemente a un filamento de actina en una configuración de *rigor* (así llamada porque es la responsable del *rigor mortis*, la rigidez de la muerte). En un músculo en contracción activa, este estado es de corta duración y finaliza rápidamente mediante la unión de una molécula de ATP.

LIBERACIÓN Una molécula de ATP se une en el surco de la "parte trasera" de la cabeza (es decir, en la parte más alejada del filamento de actina) e inmediatamente provoca un ligero cambio en la conformación de los dominios que libera el lugar de unión a la actina. Esto reduce la afinidad de la cabeza por la actina y le permite desplazarse a lo largo del filamento. (El espacio dibujado entre la cabeza y la actina destaca este cambio, aunque en realidad probablemente se mantiene muy cerca de la actina.)

MOVIMIENTO El surco se cierra como la concha de una almeja alrededor de la molécula de ATP, induciendo un gran cambio morfológico que provoca el desplazamiento de la cabeza a lo largo del filamento, a una distancia de unos 5 nm. Se produce la hidrólisis del ATP, pero el ADP y el fosfato inorgánico (P_i) producidos se mantienen íntimamente unidos a la proteína.

GENERACIÓN DE LA FUERZA La débil unión de la cabeza de la miosina a un nuevo lugar en el filamento de actina provoca la liberación del fosfato inorgánico producido por la hidrólisis del ATP, con lo cual se refuerza la unión de la cabeza con la actina. Esta liberación proporciona el gran golpe de potencia: el cambio de forma que genera la fuerza, mediante el cual la cabeza recupera su conformación original. Durante este golpe de potencia, la cabeza pierde el ADP que tenía unido y se inicia un nuevo ciclo.

UNIÓN Al final del ciclo, la cabeza de la miosina se encuentra de nuevo íntimamente unida al filamento de actina en la configuración de rigor. Nótese que la cabeza se ha desplazado hacia una nueva posición en el filamento de actina.

Figura 16–61 Ciclo de cambios mediante los cuales una molécula de miosina II se desplaza a lo largo de un filamento de actina. <ATAT> En el ciclo de la miosina II, la cabeza permanece unida al filamento de actina sólo un 5% del ciclo, permitiendo que muchas miosinas trabajen a la vez desplazando un mismo filamento de actina. (Basado en I. Rayment et al., *Science* 261:50-58, 1993. Con la autorización de AAAS.)

Parece que el dominio de sobreenrollamiento coordina los ciclos mecánico-químicos de ambas cabezas (dominios motores) del dímero de quinesina y determina la direccionalidad de su desplazamiento. Hay que recordar que la mayoría de los miembros de la superfamilia de las quinesinas, con sus dominios motores en el extremo N-terminal, se desplazan hacia los extremos más de los microtúbulos, pero que unos cuantos miembros de la superfamilia tienen los dominios motores en el extremo C-terminal y se desplazan hacia los extremos menos. Sin embargo, los dominios motores de ambos tipos de proteína son idénticos. ¿Cómo pueden desplazarse en sentidos opuestos? La respuesta parece encontrarse en la forma en la que están conectadas sus cabezas. En imágenes de alta resolución de las cabezas de ambos tipos, unidas a los microtúbulos, las cabezas que están unidas al microtúbulo prácticamente no se pueden distinguir, pero las segundas cabezas, no unidas, están orientadas de forma distinta. Esta diferencia de inclinación parece que influye en cuál será el

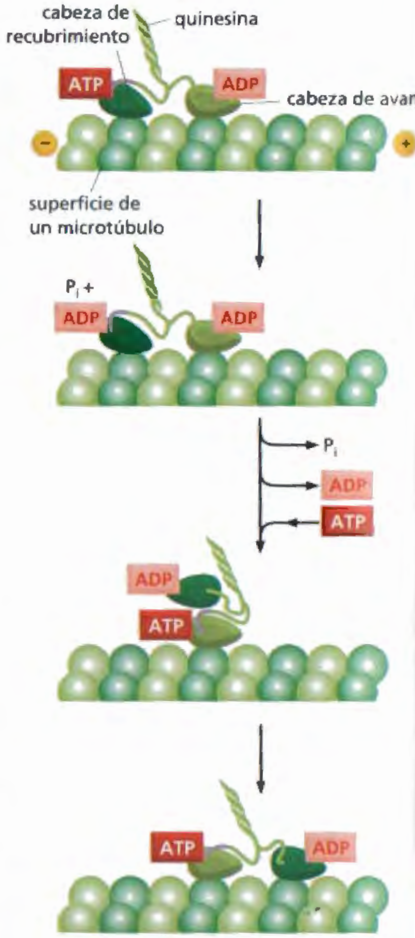


Figura 16–62 El ciclo mecánico-químico de la quinesina. <GAAT> La quinesina-1 es un dímero de dos dominios motores de unión a nucleótidos (cabezas) que están conectados a través de una larga cola con sobreenrollamiento (véase Figura 16–58). Los dos dominios motores de quinesina actúan de forma coordinada; durante un "paso" de quinesina, la cabeza posterior se libera de su lugar de unión a la tubulina, atraviesa el dominio motor de su pareja y entonces se une de nuevo al lugar de unión de la siguiente tubulina disponible. Usando este movimiento de "mano a mano", el dímero de quinesina puede desplazarse largas distancias por los microtúbulos sin apartarse demasiado de su vía.

Al principio de cada paso, una de las dos cabezas de quinesina, la posterior o de retención (*verde oscuro*), está unida con fuerza al microtúbulo y al ATP, mientras que la cabeza frontal o de avance está débilmente unida al microtúbulo y al ADP en el dominio motor frontal (entre los pasos 2 y 3 de este esquema). La unión del ATP a este dominio motor provoca que un pequeño péptido llamado "conector del cuello" cambie de una conformación hacia atrás a una conformación hacia adelante (el conector de cuello aparece como una línea conectora entre el dominio motor y la zona de superenrollamiento entrelazada). Este cambio impulsa al dominio motor posterior hacia delante, después de liberarse del microtúbulo con el ADP unido; la liberación requiere de la hidrólisis de ATP y la liberación de un fosfato (P_i). La molécula de quinesina está ahora colocada para su próximo paso, que se producirá como una repetición exacta del proceso mostrado.

próximo lugar de unión de la segunda cabeza y, probablemente, determina el sentido del desplazamiento motor (**Figura 16–63**).

El motor de dineína no está relacionado estructuralmente con las miosinas y con las quinesinas pero mantiene la norma general de acoplar la hidrólisis de un nucleótido a la unión y desunión de un microtúbulo y también la generación de fuerza a través de los cambios conformacionales. Una cadena pesada gigante de 500.000 daltons forma la estructura básica generadora del movimiento. Su parte N-terminal forma una cola que se une a un conjunto de cadenas ligeras y conecta con otras cadenas pesadas dentro de la molécula de dineína, mientras que la mayor parte de la cadena pesada se utiliza para formar una cabeza muy elaborada en forma de anillo. Esta cabeza consiste en un anillo plano formado por siete dominios: seis dominios AAA más el dominio C-terminal de la cadena pesada; por consiguiente, es un pariente complejo de la ATPasa hexamérica descrita en el Capítulo 6 (véase Figura 6–91). Una región de unión en forma de gancho une la cola de la cadena pesada al dominio AAA que es más activo que una ATPasa. Entre el cuarto y el quinto dominio AAA hay

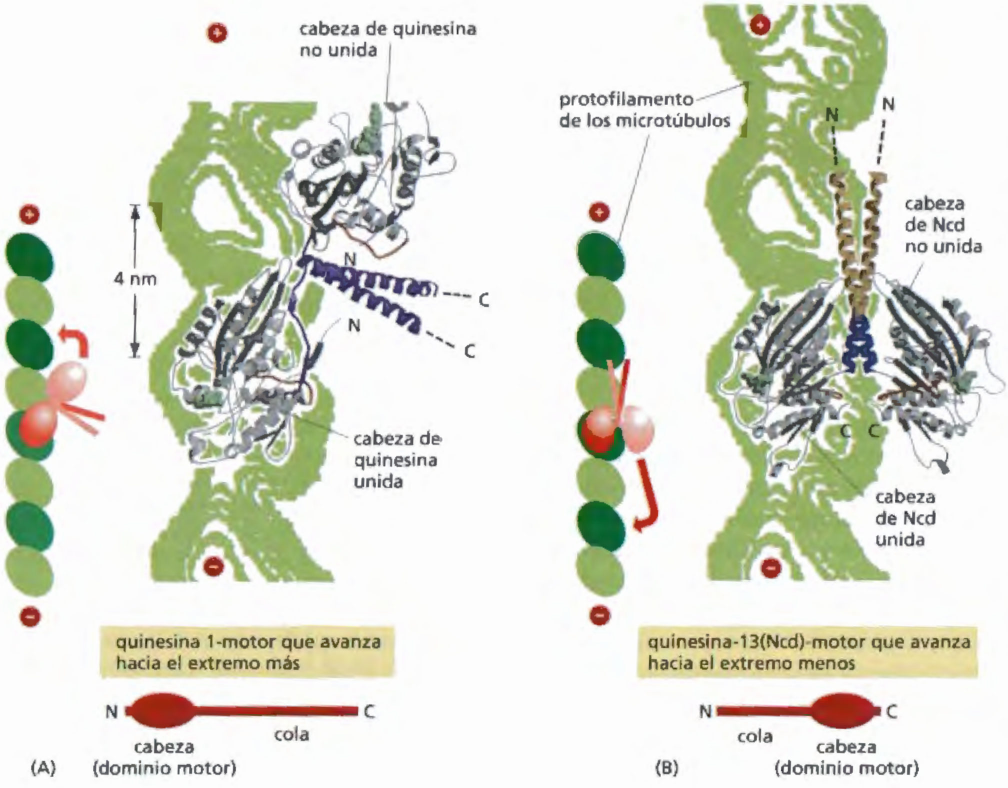


Figura 16–63 Orientación del "paso adelante" y del "paso hacia atrás" de las proteínas de la superfamilia d las quinesinas unidas a microtúbulo Estas imágenes fueron generadas superponiendo las estructuras de los dímeros libres de las proteínas motor (determinadas por cristalografía de rayos X) sobre una imagen, a menor resolución, de los dímeros unidos a los microtúbulos (determinada por crioelectromicroscopía). (A) La quinesina-1 (quinesina convencional) tiene su dominio motor en el extremo N-terminal de la proteína y se desplaza hacia el extremo más del microtúbulo. Cuan un extremo del dímero está unido a microtúbulo en un estado posterior del golpe de potencia (con el ATP e sitio de unión), la segunda cabeza n unida apunta hacia el extremo más los microtúbulos, preparada para d el siguiente paso. (B) La quinesina-1 (llamada Ncd en la *Drosophila*), un motor que avanza hacia el extremo menos, con el dominio motor en el extremo C-terminal, forma dímero en orientación opuesta. (De E. Sabl et al., *Nature* 395:813-816, 1998. Con la autorización de Macmillan Magazines Ltd.)

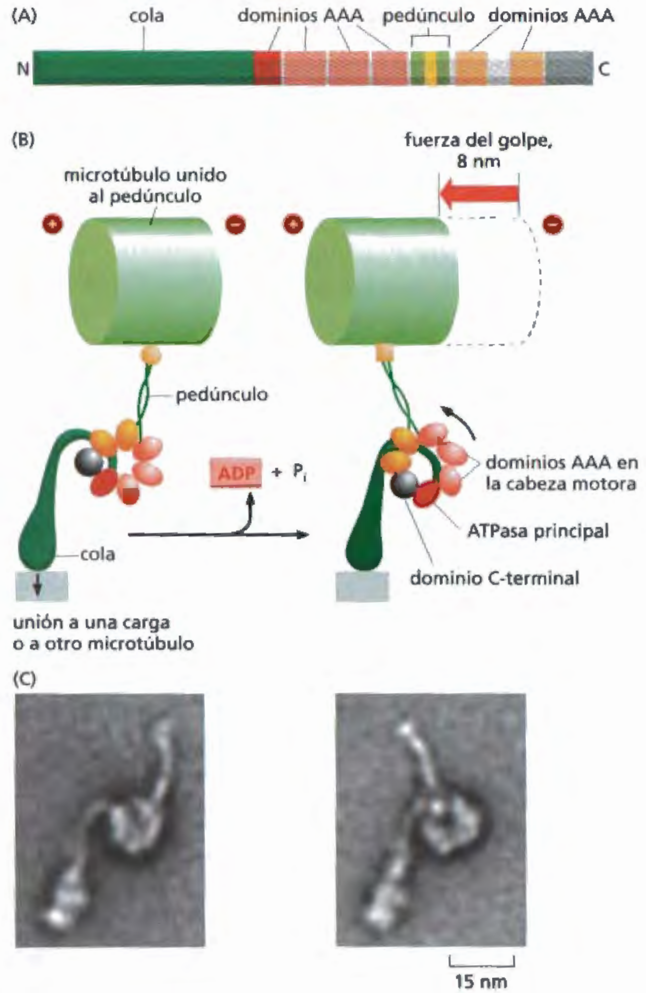


Figura 16–64 El golpe de potencia de la dineína. (A) La organización de los dominios en cada una de las cadenas pesadas de dineína. Se trata de una molécula muy grande, que tiene alrededor de 5000 aminoácidos. El número de cadenas pesadas en una dineína es igual al número de sus cabezas motoras. (B) La dineína c es una dineína monomérica de los flagelos, que se ha encontrado en el alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*. El gran dominio motor de cabeza es un anillo plano que contiene el dominio C-terminal (*gris*) y seis dominios AAA, cuatro de los cuales mantienen secuencias de unión a ATP aunque sólo una de ellas (*rojo oscuro*) tiene la principal actividad ATPasa. Extendiéndose a partir de la cabeza encontramos un largo pedúnculo en superenrollamiento con el lugar de unión a los microtúbulos en un extremo y una cola con unión para una carga. En el estado de unión al ATP, el pedúnculo no está unido al microtúbulo, pero la hidrólisis del ATP lo une a él. La liberación del ADP y del P_i comporta un "golpe de potencia" que implica la rotación de la cabeza y del pedúnculo en relación a la cola. Cada ciclo genera un paso de cerca de 8 nm de avance a lo largo del microtúbulo y hacia el extremo menos. (C) Electromicrografía de dineínas purificadas en dos conformaciones distintas representando dos etapas distintas de su ciclo mecánico-químico. (B, de S.A. Burgess et al., *Nature* 421:715-718, 2003. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

un dominio de cadena pesada que forma un pedúnculo largo y enrollado de forma antiparalela. Este pedúnculo se extiende desde el extremo superior del anillo, con un lugar de hidrólisis de ATP regulado por unión a un microtúbulo en su extremo. La "potencia de empuje" de las dineínas está dirigida por la liberación del ADP y del fosfato inorgánico, y provoca la rotación del anillo en relación a la cola (**Figura 16–64**).

Aunque tanto la miosina, como la quinesina y la dineína sufren ciclos mecánico-químicos parecidos, la naturaleza exacta del acoplamiento entre los ciclos mecánicos y químicos es diferente en los tres casos. Por ejemplo, cuando la miosina no se halla unida a ningún nucleótido, está fuertemente unida a su filamento de actina, el llamado estado "rigor", y se libera de su anclaje cuando une ATP. Por el contrario, la quinesina forma una asociación de tipo "rigor" con el microtúbulo cuando tiene el ATP unido y es la hidrólisis de este ATP la que la libera de su punto de unión. El ciclo mecánico-químico de la dineína es más parecido al de la miosina que al de la quinesina, en el cual, la dineína libre de nucleótido está unida con fuerza al microtúbulo y se libera cuando se une al ATP. Sin embargo, para la dineína, parece que el ADP y el fosfato inorgánico se liberan al mismo tiempo provocando el cambio conformacional que dirige el empuje impulsor, mientras que para la miosina el fosfato se libera en primer lugar y el empuje impulsor no se produce hasta que el ADP se disocia de la cabeza motora.

Así pues, las proteínas motoras del citoesqueleto trabajan de forma muy análoga a las proteínas que unen GTP, con la excepción de que en las proteínas motoras los pequeños cambios conformacionales (unas cuantas decenas de nanómetros) asociados a la hidrólisis de un nucleótido están amplificados por dominios proteicos especiales –el brazo de palanca en el caso de la miosina, el segmento de unión en el caso de la quinesina y el anillo y el pedúnculo en el caso de la dineína– generando grandes cambios conformacionales (de algunos nanómetros) que desplazan las proteínas motoras a lo largo de las vías de filamentos. Recientemente la analogía entre las GTPasas y las proteínas motoras del citoesqueleto se ha ampliado, al observarse que una de las proteínas de unión a GTP –el factor de elongación

bacteriano G– transforma la energía química de la hidrólisis del GTP en movimiento que desplaza la molécula de mRNA por el ribosoma.

La cinética de las proteínas motoras está adaptada a las funciones celulares

Las proteínas motoras de las superfamilias de miosinas y de quinesinas presentan, además de su capacidad de desplazarse a lo largo de polímeros diferentes, una gran diversidad de propiedades móviles. Es muy interesante el becho de que un simple dímero de quinesina-1 se desplace elegantemente y viaje durante cientos de ciclos de ATPasa a lo largo de un microtúbulo sin disociarse. Por el contrario, la miosina II del músculo esquelético no puede desplazarse de esta forma, sino que sólo avanza unos cuantos pasos a lo largo del filamento de actina y luego se libera de él. Estas diferencias son muy importantes para las diversas funciones biológicas que ejercen estas proteínas. Un pequeño número de moléculas de quinesina-1 deben ser capaces de transportar un orgánulo a lo largo de un axón de una célula nerviosa, por lo que requieren que el proceso se pueda repetir durante mucho tiempo. Por el contrario, la miosina del músculo esquelético nunca actúa como una sola molécula sino como una parte de un gran conjunto de moléculas de miosina II en un filamento grueso. En este caso una elevada capacidad de repetición del proceso podría inhibir la función biológica, puesto que una contracción muscular eficiente requiere que cada cabeza de miosina realice su fuerza impulsora y rápidamente dejar el camino libre para no interferir en las acciones de las otras cabezas de miosina adheridas al mismo filamento de actina.

Este elevado grado de repetición del proceso de los desplazamientos de la quinesina-1 se debe a dos razones. La primera es que los ciclos mecánico-químicos de las dos cabezas motoras de un dímero de quinesina-1 están coordinados, de forma que una cabeza no avanza hasta que la otra esté situada en el lugar adecuado para unirse. Esta coordinación le permite a la proteína motora actuar de forma "mano a mano", impidiendo que la carga, por ejemplo un orgánulo, difunda alejándose de la pista del microtúbulo. Por el contrario, no existe coordinación aparente entre las cabezas de miosina de un dímero de miosina II. La segunda razón es que la quinesina-1 se mantiene durante una gran parte de su ciclo de ATPasa unida al microtúbulo. En ambos casos, el de la quinesina-1 y el de la miosina II, el cambio conformacional que produce el movimiento generador de potencia debe ocurrir mientras la proteína motora esté unida al polímero; mientras que la fuerza de recuperación, que es la preparación para la próxima etapa, tienen que producirse mientras la proteína motora esté separada del polímero. Sin embargo, la miosina II sólo está unida durante un 5% del tiempo que dura el ciclo ATPasa y se mantiene separada del filamento el resto del tiempo.

Lo que la miosina pierde en capacidad de repetición del proceso continuado lo gana en velocidad; en una hilera en que la mayoría de las cabezas motoras están interactuando con un mismo filamento de actina, un grupo de miosinas unidas puede desplazar su filamento una distancia total equivalente a 20 pasos durante un ciclo simple, mientras que las quinesinas sólo se desplazarán 2. Así pues, la miosina II puede deslizarse por un filamento mucho más rápidamente que la quinesina-1, a pesar de que ambas hidrolicen ATP a la misma velocidad y tengan longitudes de avance comparables. Esta propiedad es en particular importante en la rápida contracción del músculo esquelético que se describirá más adelante.

Dentro de cada clase de proteínas motoras, la velocidad de desplazamiento varía ampliamente, desde los 0,2 hasta los 60 μm por segundo en las miosinas, y desde los 0,02 hasta los 2 μm por segundo en las quinesinas. Estas diferencias se deben a una regulación muy fina del ciclo mecánico-químico. El número de pasos que puede dar una molécula motora durante un tiempo determinado y, por tanto, su velocidad, pueden disminuir al reducir la velocidad intrínseca de la ATPasa o al aumentar la proporción del tiempo del ciclo durante el que la proteína se encuentra unida al filamento. Por ejemplo, la miosina V (que actúa como un motor vesicular con capacidad elevada de repetición del proceso) pasa el 90% de su ciclo de nucleótido unida fuertemente al filamento de actina, en contraste con la miosina II que sólo pasa el 5%. Además, una proteína motora puede cambiar la duración de cada paso, ya sea cambiando la longitud del brazo de palanca (p. ej., el de la miosina V es tres veces más largo que el de la miosina II) o el ángulo de balanceo de la hélice (**Figura 16–65**). Cada uno de estos parámetros varía un poco entre los distintos miembros de las familias de miosinas y de quinesinas, y se corresponde con ligeras diferencias en sus secuencias y estructuras.

Se asume que la evolución ha perfeccionado el comportamiento de cada proteína motora, cuya función viene determinada por el tipo de carga que transporta en su dominio de

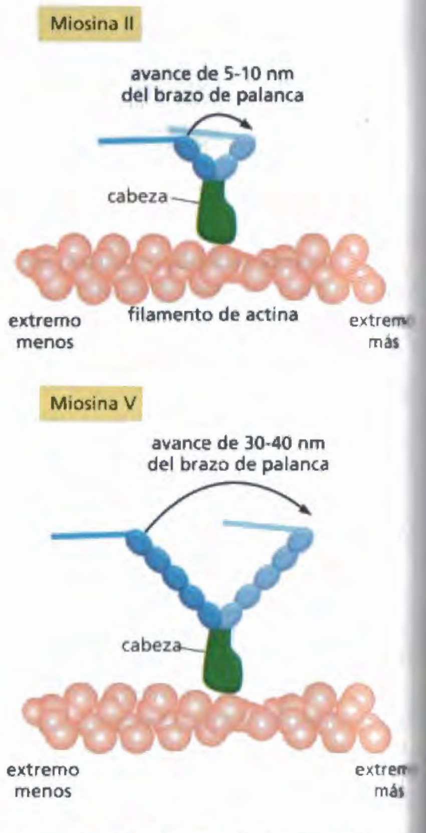


Figura 16–65 El efecto de la longitud del brazo de palanca sobre el avance de una proteína motora. El brazo de palanca de la miosina II es mucho más corto que el de la miosina V. El golpe de potencia de la cabeza gira estos brazos el mismo ángulo en ambos casos, de forma que la miosina V es capaz de realizar un paso (avance) más grande que la miosina II.

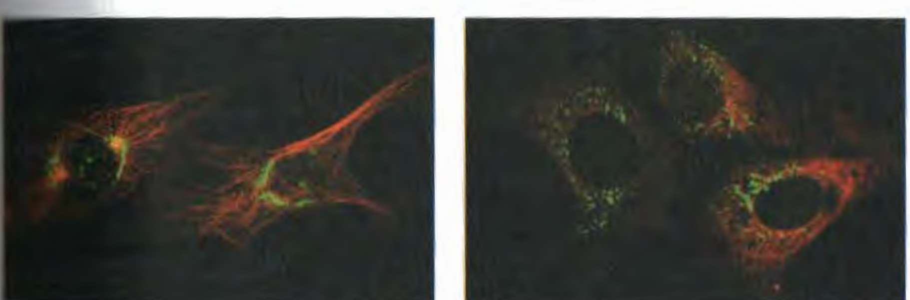
cola, por su velocidad y su mantenimiento de avance, de acuerdo con las necesidades específicas de la célula. En las células eucariotas típicas existen distintos miembros de las familias de la miosina y de la quinesina, pero sólo existe una forma de dineína citoplasmática. Todavía no se sabe si las propiedades mecánicas de la dineína citoplasmática pueden modificarse respondiendo a necesidades distintas de la célula ni cómo ocurre.

Las proteínas motoras median el transporte intracelular de los orgánulos rodeados de membrana <CAAT> <AAAT>

En las células en interfase, una función importante de los motores del citoesqueleto es el transporte y posicionamiento de los orgánulos rodeados de membrana. Inicialmente se identificó la quinesina como la proteína responsable del transporte rápido a lo largo de los axones, del desplazamiento rápido de las mitocondrias, de las vesículas secretoras precursoras y de varios componentes de las sinapsis a lo largo de las autopistas microtubulares de los axones hacia los distantes terminales nerviosos. Aunque en la mayoría de las células los orgánulos no tienen que recorrer distancias tan grandes, sigue siendo necesario su transporte polarizado. Un conjunto típico de microtúbulos de una célula en interfase está orientado con sus extremos menos cerca del centro de la célula, en el centrómero, y los extremos más extendidos hacia la periferia celular. Así pues, los desplazamientos centrípetos de los orgánulos o vesículas hacia el centro celular requieren de la acción de las proteínas motoras que se dirigen hacia los extremos menos como por ejemplo la dineína citoplasmática, mientras que los movimientos centrífugos, hacia la periferia celular, requieren motores dirigidos hacia los extremos más, como las quinesinas.

El ejemplo más claro del efecto de los microtúbulos y de las proteínas motoras de los microtúbulos, sobre el comportamiento de los sistemas membranosos intracelulares, lo constituye su papel organizador del retículo endoplasmático (ER) y del complejo de Golgi. La red de túbulos membranosos del ER se alinea con los microtúbulos y se extiende casi hasta los extremos celulares. El complejo de Golgi, por el contrario, está localizado cerca del centrosoma. Cuando se tratan las células con un compuesto que despolimeriza los microtúbulos, como por ejemplo la colchicina o el nodocodazol, el ER se colapsa en el centro de la célula, mientras que el complejo de Golgi se fragmenta y queda disperso por el citoplasma (**Figura 16–66**). *In vitro*, las quinesinas pueden unir las membranas derivadas del ER a pistas de microtúbulos preformadas y hacerlas avanzar hacia sus extremos más, formando protuberancias tubulares y espacios membranosos muy parecidos a los del ER de las células. De manera parecida, el desplazamiento de los túbulos del ER hacia la periferia celular está asociado con el crecimiento de los microtúbulos en las células vivas. Por el contrario, las dineínas son necesarias para el posicionamiento del complejo de Golgi en el centro de la célula, desplazando las vesículas del Golgi a lo largo de los microtúbulos hacia los extremos menos en el centrosoma.

Los distintos tipos de colas y sus cadenas ligeras asociadas de las diferentes proteínas motoras específicas les permiten unirse de forma específica a los orgánulos que transportarán. Receptores motores asociados a membrana, que son dirigidos de forma específica hacia compartimientos rodeados de membrana, interactúan directa o indirectamente con las colas de determinados miembros de la familia de las quinesinas. Uno de estos receptores parece ser el precursor de la proteína amiloide (APP: ***amyloid precursor protein***), que se une directamente a la cadena ligera de la cola de la quinesina-1 y se propone que sea una molécula proteica receptora motora transmembrana en los axones de las células nerviosas. El pro-



(A) (B) 10 μm

Figura 16–66 Efecto de la despolimerización de microtúbulos sobre el complejo de Golgi. (A) En esta célula endotelial, los microtúbulos están marcados en *rojo* y el complejo de Golgi en *verde* (usando un anticuerpo contra una proteína del Golgi). Mientras el sistema de microtúbulos permanece intacto, el Golgi se encuentra cerca del centrosoma, próximo al núcleo en el centro de la célula. La célula de la *derecha* está en interfase, con un solo centrosoma. La célula de la *izquierda* está en profase; los centrosomas duplicados se han desplazado hacia lados opuestos del núcleo. (B) Después de un tratamiento con nocodazol, que provoca la despolimerización de los microtúbulos (véase Tabla 16–2), el complejo de Golgi se fragmenta y se dispersa por todo el citoplasma celular. (Cortesía de David Shima.)

cesamiento anormal de esta proteína conduce a la enfermedad de Alzheimer, generándose grandes cantidades de agregados estables de proteína en las células nerviosas del cerebro (véase Figura 6–95). En el retículo endoplasmático se han identificado otros receptores para quinesinas específicas y también en otros orgánulos rodeados de membrana que dependen del transporte mediado por microtúbulos para su localización. Las JIP (proteínas que interactúan con JNK; *JNK-interacting proteins*) son proteínas estructurales asociadas con la señalización celular. Estos receptores de quinesina proporcionan un punto de unión entre el transporte y la señalización celular.

En el caso de la dineína se conoce que su unión a las membranas está mediada por un gran ensamblaje macromolecular. La dineína citoplasmática ya es, por sí misma, un gran complejo proteico y para transportar orgánulos de forma eficiente tiene que asociarse a otro gran complejo, llamado *dinactina*. Este complejo incluye un corto filamento parecido a la actina formado por una proteína relacionada con la actina, la proteína Arp1 (distinta de Arp2 y Arp3, los componentes del complejo ARP implicado en la nucleación de los filamentos de actina convencionales). Las membranas del complejo de Golgi están recubiertas con las proteínas anquirina y espectrina. Se propone que estas proteínas se asocian con el filamento de Arp1 en el complejo dinactina y forman un citoesqueleto plano parecido al citoesqueleto de la membrana de los eritrocitos (véase Figura 10–41). Probablemente la red de espectrina en conjunto proporciona estabilidad estructural a la membrana del complejo de Golgi y, a través del filamento Arp1, hace de mediador en la unión regulable de la dineína al orgánulo (**Figura 16–67**). En otros casos, los motores de dineína citoplasmáticos interactúan de forma directa con su carga. La cola citoplasmática de la rodopsina, la proteína detectora de luz en los conos de la retina del ojo, se une directamente a una de las cadenas ligeras de dineína; esta interacción es indispensable para el desplazamiento normal de la rodopsina a lo largo de los conos.

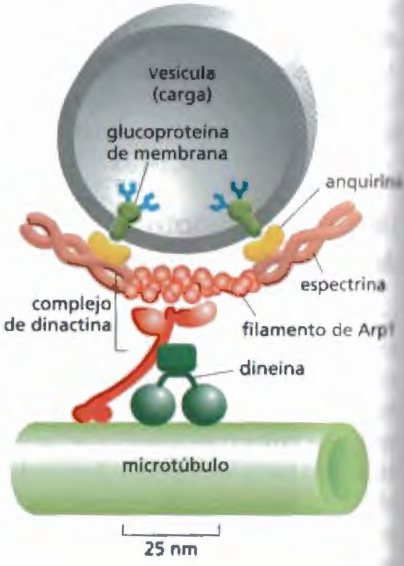


Figura 16–67 Un modelo para la unión de la dineína a un orgánulo rodeado de membrana. La dineína necesita la presencia de muchas proteínas accesorias para asociarse con los orgánulos rodeados de membrana. La dinactina es un complejo grande (*rojo*) que incluye componentes que se unen débilmente a los microtúbulos, componentes que se unen a la propia dineína y componentes que forman pequeños filamentos de actina con la proteína Arp1. Se cree que el filamento Arp1 puede mediar la unión de este gran complejo a los orgánulos, a través de una red de espectrina y anquirina parecida a la del citoesqueleto asociado a la membrana de los eritrocitos (véase Figura 10–41).

Las proteínas motoras tienen también un papel significativo en el transporte de orgánulos a lo largo de los filamentos de actina. La miosina V fue la primera miosina encontrada como mediador del desplazamiento de los orgánulos, una miosina de doble cabeza que genera un gran desplazamiento en cada etapa (véase Figura 16–65). En los ratones y en los humanos, los gránulos de pigmento rodeados de membrana, llamados *melanosomas*, se sintetizan debajo de la piel, en unas células denominadas *melanocitos*. Estos melanosomas se desplazan hacia los extremos de las proyecciones dendríticas de los melanocitos, donde son liberados hacia los queratinocitos que forman la piel (y el pelaje en el ratón). La miosina V está asociada con la superficie de los melanosomas y puede intervenir en el desplazamiento basado en actina que se puede observar en un tubo de ensayo (**Figura 16–68**). En el ratón, mutaciones en el gen de la miosina V provocan un fenotipo diluido, con un pelaje descolorido puesto que los melanosomas no son liberados a los queratinocitos de forma eficiente, por lo que la pigmentación es defectuosa. Otras miosinas, incluyendo la miosina I, están asociadas a endosomas y a una gran variedad de otros orgánulos.

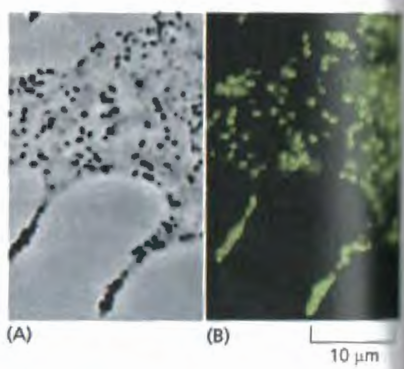


Figura 16–68 La miosina V de los melanosomas. (A) Imagen obtenida por contraste de fases de una parte de un melanocito aislado de un ratón. Las manchas negras son melanosomas, con orgánulos rodeados de membrana llenos del pigmento de la piel, la melanina. (B) La misma célula marcada con un anticuerpo fluorescente contra la miosina V. Cada melanosoma está asociado con un gran número de copias de esta proteína motora. (De X. Wu et al., *J. Cell Sci.* 110:847-859, 1997. Con la autorización de The Company of Biologists.)

El citoesqueleto posiciona moléculas específicas de RNA

Con el objetivo de concentrar las proteínas en el lugar donde ejercen su función, las células restringen a menudo su síntesis en los lugares donde se localizan sus moléculas de mRNA, proceso que establece las asimetrías celulares. Este hecho es en particular importante cuando una célula se divide generando dos células hijas con características distintas. Otro ejemplo sería el de los mRNA que codifican proteínas implicadas en la función sináptica y que se localizan cerca de las sinapsis en la mayoría de neuronas; existen evidencias de que la localización de los mRNA y la regulación de la traducción en los lugares sinápticos desempeñan un papel importante en la regulación de la memoria a largo plazo y de la plasticidad sináptica. No es sorprendente que sea el citoesqueleto y las proteínas motoras del citoesqueleto las que posicionen las moléculas de mRNA en este tipo de situaciones.

El oocito gigante de *Drosophila* posiciona una gran cantidad de mRNA codificados maternalmente en lugares específicos dentro de la célula, como paso previo a los rápidos acontecimientos de especificación que se producen en las fases tempranas de la embriogénesis (descrito en el Capítulo 22). Un grupo de mRNA que codifican proteínas necesarias para el correcto desarrollo de la región posterior del embrión, incluyendo el desarrollo de las células germinales, se localizan en la parte posterior del oocito; un grupo distinto de mRNA que codifican proteínas necesarias para la especificación de las estructuras anteriores del embrión se localizan en la parte anterior del oocito.

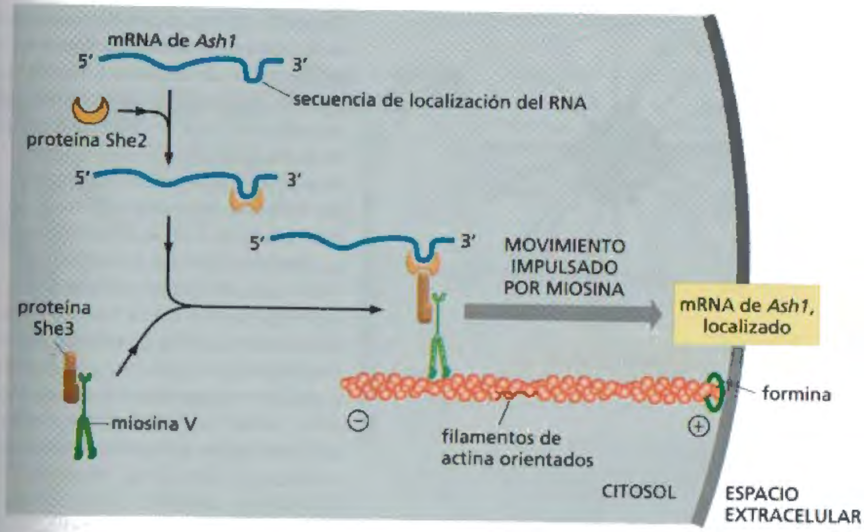




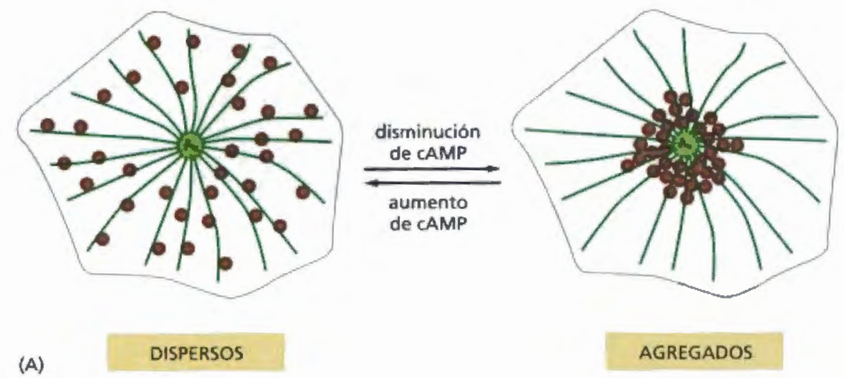
Figura 16–69 Localización polarizada de mRNA en el extremo de la yema de la levadura. (A) Mecanismo molecular de localización del mRNA de *Ash1*, que se determinó genética y bioquímicamente. (B) La localización del mRNA de *Ash1* (*rojo*) en esta célula de levadura en división se realizó mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH). El mRNA está confinado en el extremo más alejado de la célula hija (todavía una yema grande). La proteína Ash1, transcrita por este mRNA localizado, sólo se encuentra en la célula hija. (B, por cortesía de Peter Takizawa y Ron Vale.)

El oocito se aprovecha de su citoesqueleto polarizado de microtúbulos, donde la mayoría de los extremos menos están agrupados en la parte anterior de la célula y los extremos más se sitúan cerca de la posterior, para establecer estas distribuciones especializadas de mRNA. Así por ejemplo, el mRNA que codifica Bicoid, un factor de transcripción crítico para el desarrollo de la parte anterior, posee una estructura dentro del 3´UTR que se une a una proteína llamada Swallow, que a su vez se une a la cadena ligera de la dineína citoplasmática, presumiblemente permitiendo su transporte hacia los extremos menos de los microtúbulos en la parte anterior de la célula. Por el contrario, el transporte del mRNA que codifica Oskar, una proteína necesaria para el desarrollo de la célula germinal en la parte posterior del embrión, necesita de quinesina-1 para ser transportado hacia los extremos más de los microtúbulos. El anclaje de los mRNA en sus posiciones adecuadas después de ser transportados a través de los microtúbulos parece que depende del citoesqueleto cortical de actina. El mRNA de Oskar, por ejemplo, se une de forma directa a una proteína de unión a la actina llamada moesina, un miembro de la familia de ERM.

En algunas células, el transporte de los mRNA y su anclaje es dependiente de actina. La levadura madre y la levadura hija retienen identidades diferentes, como lo indican las grandes diferencias que presentan posteriormente en cuanto a su capacidad de sufrir cambios en el tipo de apareamiento (descrito en el Capítulo 7) y en la selección de su próximo lugar de gemación. Muchas de estas diferencias están provocadas por una proteína reguladora de genes llamada *Ash1*. Tanto la proteína como el mRNA para *Ash1* sólo se localizan en la yema en crecimiento y aparecen en exclusiva en la célula hija. Uno de los dos tipos de miosina V encontrado en las levaduras, Myo4p, es necesario para la distribución asimétrica del mRNA de *Ash1*. Un análisis genético de mutaciones que impiden las diferencias materno-filiales ha permitido observar que al menos existen otros seis productos génicos asociados con el citoesqueleto que son necesarios para la polaridad normal; incluyen una de las forminas, la tropomiosina, la profilina, la propia actina y también un complejo de dos proteínas que forman una unión directa entre secuencias específicas del mRNA de *Ash 1* y la proteína miosina V (**Figura 16–69**).

Las células regulan la función de las proteínas motoras

La célula puede regular la función de las proteínas motoras, lo que permite cambiar la localización de los orgánulos rodeados de membrana y todos los movimientos celulares. Uno de los ejemplos más interesantes es el que proporcionan los melanocitos de los peces. Estas células gigantes, responsables de los cambios rápidos de coloración de la piel en algunas especies de peces, contienen grandes gránulos de pigmento que pueden variar su localización como respuesta a estímulos neuronales u hormonales (**Figura 16–70**). Estos gránulos de pigmento se agregan o se dispersan, desplazándose a lo largo de una extensa red de microtúbulos. Los extremos menos de estos microtúbulos se nuclean en el centrosoma y están localizados en el centro de la célula, mientras que los extremos más se distribuyen alrededor de la periferia celular.



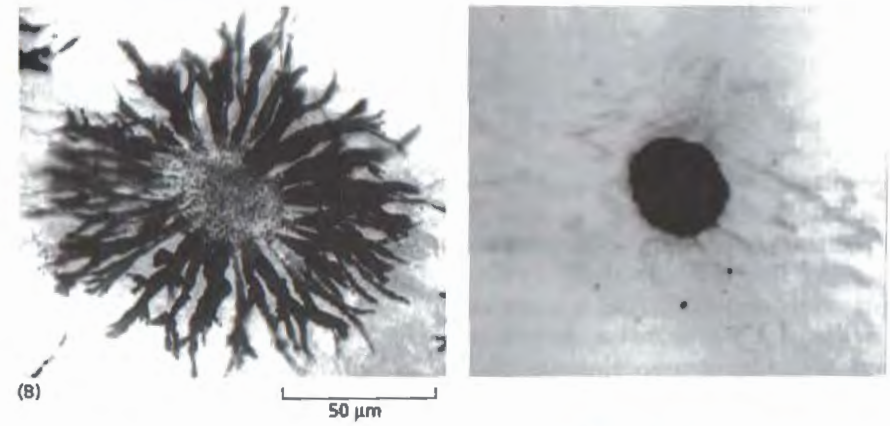
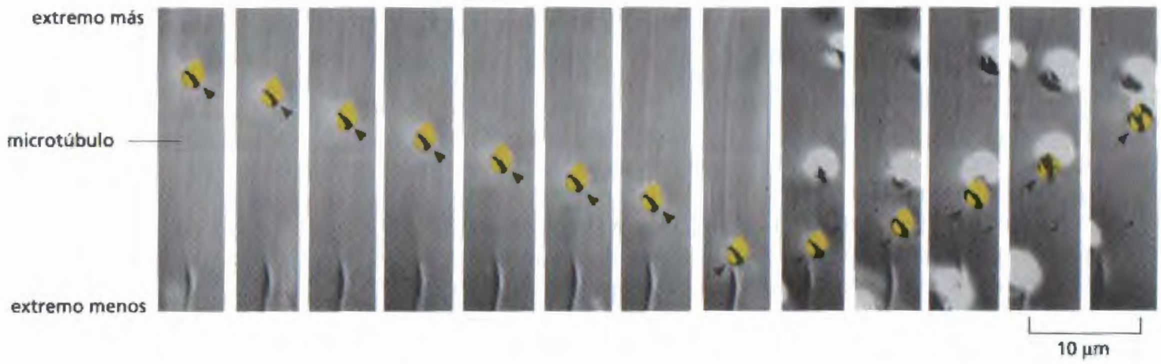


Figura 16–70 Regulación del movimiento de los melanosomas en las células pigmentarias de los peces. Estas células gigantes, responsables de los cambios de coloración de la piel en algunas especies de peces, presentan grandes gránulos de pigmento o melanosomas (*marrón*). Los melanosomas pueden cambiar su localización en la célula como respuesta a cambios hormonales o a estímulos neuronales. (A) Esquema de una célula pigmentaria, en el que se muestra tanto la dispersión como la agregación de los melanosomas en respuesta a un incremento o una disminución de los niveles de AMP cíclico (cAMP), respectivamente. Ambas redistribuciones de los melanosomas se producen a lo largo de los microtúbulos. (B) Imágenes obtenidas con campo claro de una sola célula de un pez cíclido africano, en las que se muestra sus melanosomas dispersos por el citoplasma (*izquierda*) o agregados en el centro de la célula (*derecha*). (B, cortesía de Leah Haimo.)

El tráfico de los gránulos individuales de pigmento (**Figura 16–71**) revela que el desplazamiento hacia el interior es rápido y sin interrupciones, pero que el desplazamiento hacia el exterior presenta interrupciones con algunas etapas de retroceso. Tanto la dineína como la quinesina están asociadas a los gránulos de pigmento y también la miosina V. Parece que este desplazamiento interrumpido es el resultado de una guerra de tirones entre las dos proteínas motoras con una corpulenta quinesina, la cual resulta finalmente ganadora. Cuando la cadena ligera de la quinesina se fosforila por una estimulación hormonal, que induce un cambio de color de la piel, la quinesina se inactiva y deja que la dineína transporte con rapidez los gránulos de pigmento hacia el interior de la célula; el resultado es que el color del pez cambia. De forma parecida, el desplazamiento de otros orgánulos de membrana recubiertos de proteínas motoras particulares está controlado por un balance complejo de señales competidoras que regulan tanto la actividad como la unión de las proteínas motoras.

La célula también puede utilizar la fosforilación para regular la actividad de la miosina. En las células no musculares, la miosina II puede fosforilarse en varios lugares tanto de la cadena pesada como de las cadenas ligeras, lo cual puede afectar tanto a la actividad motora como al ensamblaje de los filamentos. En estas células, la miosina II puede encontrarse en dos estados conformacionales distintos, un estado extendido capaz de formar filamentos bipolares y un estado plegado en el cual, aparentemente, el dominio de la cola interactúa con la cabeza motora. La fosforilación de la cadena ligera reguladora por la *quinasa depen-*

Figura 16–71 Desplazamiento bidireccional de un melanosoma en un microtúbulo. Un melanosoma aislado (*amarillo*) se desplaza a lo largo de un microtúbulo, desde el extremo más hacia el extremo menos, en un cubreobjetos. A medio camino en la secuencia de vídeo, cambia inesperadamente de sentido y pasa a desplazarse desde el extremo menos hacia el extremo más. (De S.L. Rogers et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:3720-3725, 1997. Con la autorización de The National Academy of Sciences.)





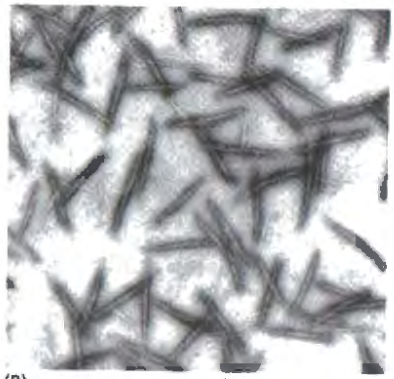


Figura 16–72 Fosforilación de la cadena ligera y regulación del ensamblaje de la miosina II en los filamentos gruesos. (A) La fosforilación controlada, producida por la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), de una de las dos cadenas ligeras (llamada cadena ligera reguladora; se muestra en *azul claro*) de la miosina II no muscular en un tubo de ensayo, tiene al menos dos efectos: provoca un cambio en la conformación de la cabeza de la miosina, dejando expuesto el lugar de unión a actina, y libera la cola de la miosina de su lugar de unión en la cabeza, permitiendo que las moléculas de miosina se ensamblen en filamentos cortos, gruesos y bipolares. (B) Electromicrografía de filamentos cortos de miosina II, contrastados negativamente, cuyo ensamblaje se ha inducido en un tubo de ensayo por fosforilación de sus cadenas ligeras. Estos filamentos de miosina II son mucho más pequeños que los encontrados en las fibras del músculo esquelético (véase Figura 16–55). (B, cortesía de John Kendrick-Jones.)

...diente de calcio de la cadena ligera de la miosina* (*MLCK: **myosin light chain kinase***) induce a la miosina II a adoptar la forma extendida, que facilita el ensamblaje de los filamentos bipolares y conduce a la contracción celular (**Figura 16–72**). La MLCK también se activa durante la mitosis, induciendo a la miosina II a ensamblarse formando el anillo contráctil responsable de dividir la célula mitótica en dos. Como se describirá más adelante, la fosforilación de la miosina también es un componente importante de control en la contracción en las células musculares lisas. La regulación de otros miembros de la superfamilia de las miosinas no se comprende todavía correctamente pero se considera que en el control de estas miosinas están implicados lugares específicos de fosforilación.

Resumen

Las proteínas motoras utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para deslizarse a lo largo de los microtúbulos y de los filamentos de actina. Facilitan el deslizamiento de los filamentos con otros filamentos y el transporte de cargas a lo largo de los mismos. Todas las proteínas motoras conocidas que se desplazan a lo largo de los filamentos de actina son miembros de la superfamilia de las miosinas. Las proteínas motoras que se desplazan a lo largo de los microtúbulos son miembros de la superfamilia de las quinesinas o de la familia de las dineínas. Las superfamilias de la miosina y de la quinesina son diversas, con cerca de 40 genes codificando cada tipo de proteína en humanos. El único elemento estructural común entre todos los miembros de cada superfamilia es el dominio motor de "cabeza". Estas cabezas se fusionan con una gran variedad de "colas" distintas, que se unen a distintos tipos de cargas y permiten a los diversos miembros de la familia realizar funciones diferentes en la célula. Estas funciones incluyen el transporte y la localización de proteínas específicas, orgánulos rodeados de membrana y mRNA.

Aunque la miosina y la quinesina viajan a lo largo de vías distintas y utilizan mecanismos diferentes para producir la fuerza y el movimiento mediante la hidrólisis del ATP, comparten un núcleo estructural común, lo cual sugiere que derivan de la misma proteína ancestral. La proteína motora dineína ha evolucionado de forma independiente, y posee una estructura y un mecanismo de acción distintos.

EL CITOESQUELETO Y EL COMPORTAMIENTO CELULAR

Un desafío importante en todas las áreas de la biología celular es comprender cómo se combinan las funciones de muchos componentes individuales dando lugar a comportamientos celulares complejos. Todos los comportamientos celulares que describimos en este apartado final se basan en una organización coordinada de los componentes y de los procesos que hemos explorado en los tres primeros apartados del capítulo: el ensamblaje y desensamblaje dinámico de los polímeros del citoesqueleto, la regulación y modificación de sus estructuras por las proteínas asociadas a los polímeros y las acciones de las proteínas motoras desplazándose a lo largo de los filamentos. ¿Cómo coordina la célula todas estas actividades para definir su forma, desplazarse o dividirse en dos durante la mitosis? Estos problemas acerca de la coordinación del citoesqueleto han desafiado a los científicos durante muchos años.

Para dar sentido a nuestro conocimiento actual, primero se analizarán ejemplos en los que células especializadas construyen disposiciones estables de filamentos y utilizan haces altamente organizados de proteínas motoras deslizándose unas sobre otras generando los movimientos de los músculos, los cilios y los flagelos eucariotas. Después se considerarán dos ejemplos importantes en los que la dinámica de los filamentos se aprovecha de la actividad de las proteínas motoras para generar estructuras dinámicas complejas que se autoorganizan: el huso mitótico formado por microtúbulos y los haces de actina implicados en el deslizamiento celular. Por último, se tratará la extraordinaria organización y comportamiento del citoesqueleto de las neuronas.

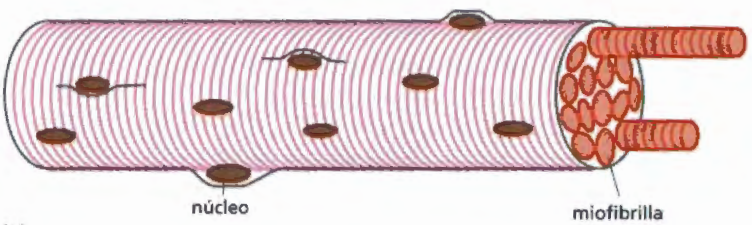
La contracción muscular depende del deslizamiento de la miosina II sobre los filamentos de actina

La contracción muscular constituye la forma de movimiento de los animales mejor comprendido y más familiar. En los vertebrados, correr, caminar, nadar y volar dependen de la contracción rápida del músculo esquelético sujeto al hueso, mientras que movimientos involuntarios como el latido del corazón o los movimientos peristálticos del intestino dependen de la contracción del músculo cardíaco y del músculo liso, respectivamente. Todas estas formas de contracción muscular dependen del deslizamiento de grupos de filamentos de actina organizados contra grupos de filamentos de miosina II, dirigido por el ATP.

El músculo esquelético tuvo un desarrollo evolutivo relativamente tardío y las células musculares están muy especializadas para una contracción rápida y eficiente. Las largas y delgadas fibras musculares del músculo esquelético son grandes células formadas durante el desarrollo por la fusión de células individuales, como se describe en el Capítulo 22. En esta gran célula muscular se conservan la mayoría de los núcleos de las células iniciales. Estos núcleos permanecen debajo de la membrana plasmática (**Figura 16–73**). El citoplasma interno está formado por miofibrillas, nombre otorgado a los elementos básicos contráctiles de la fibra muscular. Una **miofibrilla** es una estructura cilíndrica de 1-2 μm de diámetro, a menudo de la misma longitud que la propia célula muscular. Consiste en largas cadenas repetidas de diminutas unidades contráctiles denominadas *sarcómeros*, de unas 2,2 μm de longitud, que da a las miofibrillas de los vertebrados su aspecto estriado (**Figura 16–74**).

Cada sarcómero está formado de un conjunto ordenado y parcialmente superpuesto de filamentos delgados y gruesos. Los *filamentos delgados* están formados por actina y por proteínas asociadas, y sus extremos más están unidos al *disco Z* en el extremo de cada sarcómero. Los extremos menos encasquetados de los filamentos de actina se extienden hacia el centro del sarcómero, donde se superponen a los *filamentos gruesos*, ensamblajes bipolares formados de isoformas específicas musculares de la miosina II (Figura 16–55). Cuando esta región de superposición se examina con el microscopio electrónico, los filamentos de miosina se observan como láminas hexagonales regulares, con los filamentos de actina espaciados en su interior (**Figura 16–75**). La musculatura lisa y la cardíaca también presenta sarcómeros, aunque su organización no es tan regular como en el músculo esquelético.

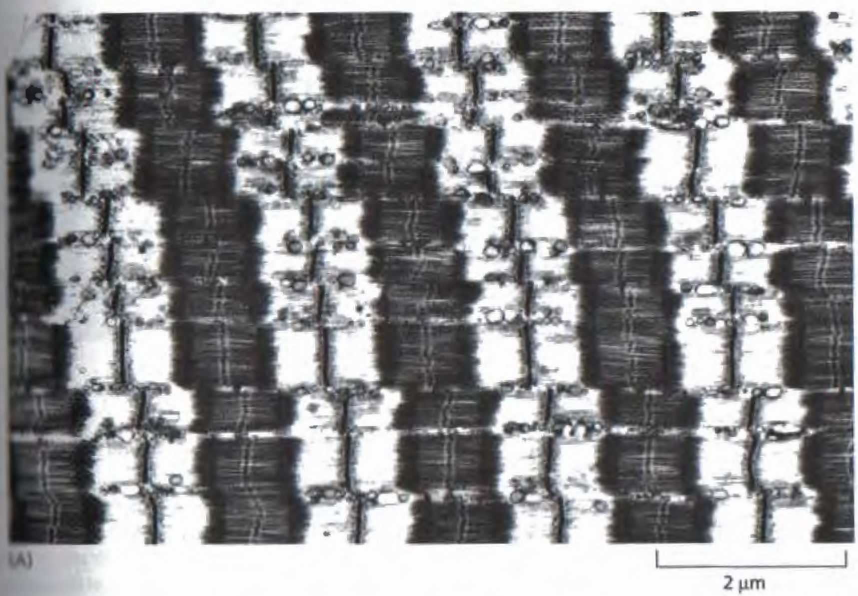
El acortamiento de los sarcómeros se produce al deslizarse los filamentos de miosina sobre los filamentos delgados de actina, sin que se produzca ningún cambio en la longitud total de cada uno de los filamentos (Figura 16–74 C y D). Los filamentos gruesos bipolares se desplazan hacia los extremos más de dos grupos de filamentos delgados orientados en direcciones opuestas, y dirigidos por docenas de cabezas independientes de miosina situadas de forma que interactúan con cada uno de los filamentos delgados. No existe ningún tipo de coordinación entre los movimientos de las distintas cabezas de miosina, de forma que es



(A)


(B)

Figura 16–73 Células del músculo esquelético (también denominadas fibras **musculares).** (A) Estas enormes células multinucleadas se forman por fusión de muchas células musculares precursoras llamadas mioblastos. En un individuo humano adulto, estas células normalmente tienen 50 μm de diámetro y pueden llegar a tener algunos centímetros de longitud. (B) Micrografía obtenida por fluorescencia de un músculo de rata que muestra la localización periférica de los núcleos (*azul*) en estas células gigantes. Las miofibrillas se han marcado en *rojo*; véase también Figura 23–46B. (B, por cortesía de Nancy L. Kedersha.)



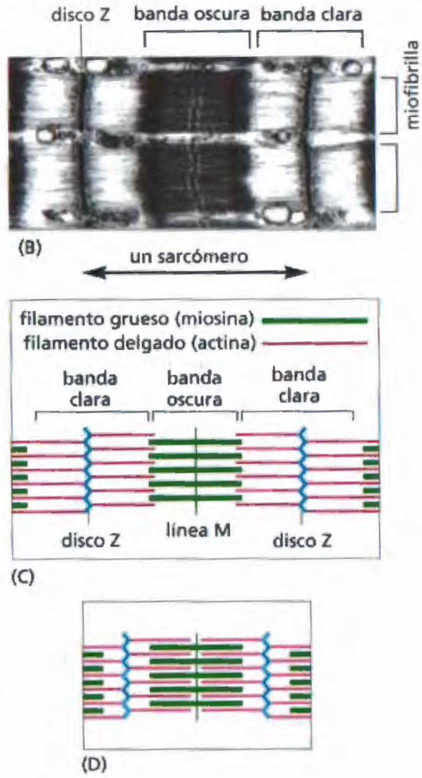


Figura 16-74 Miofibrillas del músculo esquelético. (A) Electromicrografía a pequeño aumento de una sección longitudinal de una fibra muscular esquelética de conejo, que muestra el patrón regular de las bandas transversales. La fibra contiene numerosas miofibrillas alineadas en paralelo (véase Figura 16-73). (B) Detalle de la fibra muscular esquelética de (A), en el que se muestra parte de dos miofibrillas adyacentes y la definición de un sarcómero (flecha *negra*). (C) Esquema de un sarcómero, mostrando el origen de las bandas oscuras y de las bandas claras observadas en las electromicrografías. Los discos Z, en cada extremo del sarcómero, son los lugares de unión de los filamentos de actina (filamentos delgados); la línea M, o línea media, es el lugar donde se localizan las proteínas específicas que unen filamentos de miosina II (filamentos gruesos) entre sí. Las bandas oscuras, que marcan la localización de los filamentos gruesos, a veces se denominan bandas A porque aparecen como anisótropas a la luz polarizada (es decir, su índice de refracción varía con el plano de polarización). Las bandas claras, formadas únicamente por filamentos delgados y con una densidad de proteínas menor, son relativamente isótropas a la luz polarizada y, a veces, se denominan bandas I. (D) Cuando el sarcómero se contrae, los filamentos de actina y miosina se deslizan unos sobre los otros acortándose. (A y B, por cortesía de Roger Craig.)

muy importante que funcionen con una baja capacidad de reproducción del proceso, permaneciendo íntimamente unidas a los filamentos de actina sólo una fracción muy pequeña de tiempo en cada ciclo ATPasa para no interferir con la cabeza siguiente. Cada filamento grueso de miosina tiene cerca de 300 cabezas (294 el músculo de la rana); cada cabeza realiza alrededor de cinco ciclos por segundo durante una contracción rápida –los filamentos de miosina y de actina se deslizan unos con respecto a otros a 15 µm por segundo permitiendo que el sarcómero reduzca su longitud en un 10% en menos de 1/50 de segundo. Este acortamiento rápido y sincronizado de miles de sarcómeros alineados extremo con extremo en ca-

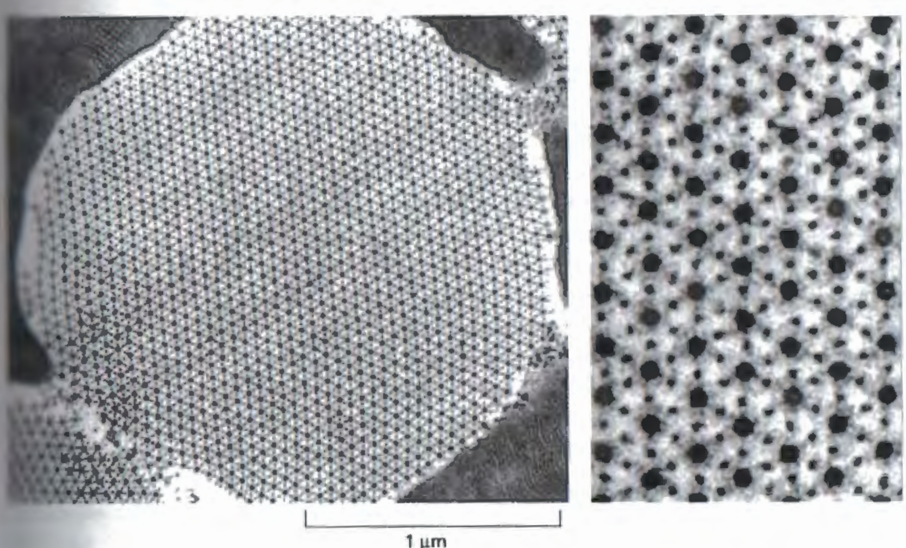


Figura 16-75 Electromicrografía de una sección transversal del músculo de vuelo de un insecto. Los filamentos de actina y de miosina están dispuestos siguiendo una regularidad casi cristalina. A diferencia de lo que ocurre en los vertebrados, los filamentos gruesos son huecos, tal como se observa en la ampliación de la derecha. En el músculo de los vertebrados, la geometría de la trama hexagonal es ligeramente diferente. (De J. Auber, *J. de Microsc.* 8:197-232, 1969. Con la autorización de la Societé française de microscopie électronique.)

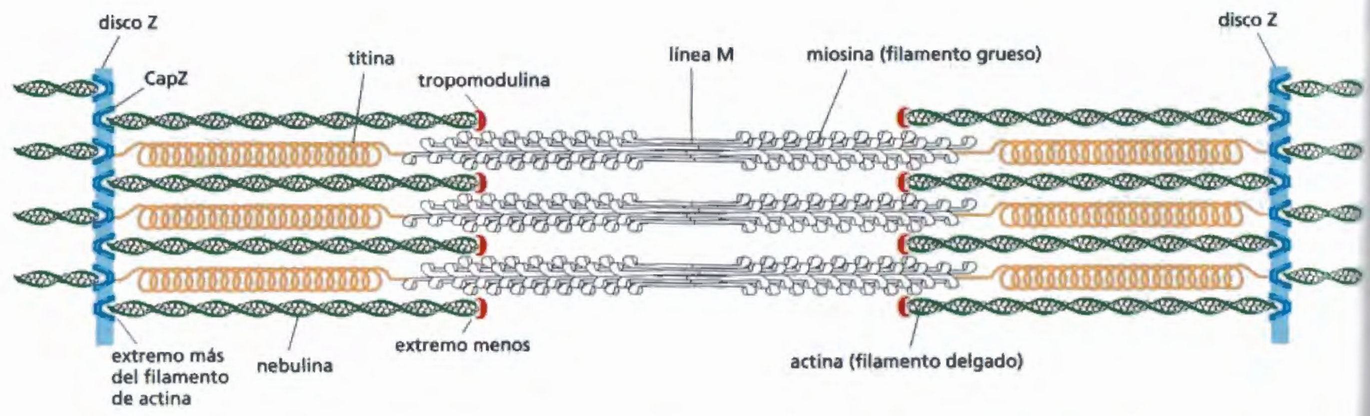


Figura 16–76 Organización de las proteínas accesorias en un sarcómero. <CTGC> Cada molécula gigante de titina se extiende desde el disco Z hasta la línea M –una distancia mayor de 1 μm. Parte de la molécula de titina está íntimamente asociada con el filamento grueso de miosina (que cambia de polaridad en la línea M); el resto de la molécula de titina es elástico y cambia de longitud al contraerse y relajarse el sarcómero. Cada molécula de nebulina tiene la misma longitud que un filamento delgado. Los filamentos de actina también están recubiertos de tropomiosina y troponina (no se muestra; para más detalles véase Figura 16–78) y tienen un casquete en cada uno de los extremos. La tropomodulina encasqueta el extremo menos de los filamentos de actina y la CapZ ancla el extremo más en el disco Z, que también tiene α-actinina.

da miofibrilla proporciona al músculo esquelético su capacidad de contracción rápida suficiente para correr y volar, o para tocar el piano.

Proteínas accesorias producen la uniformidad de la organización del filamento, la longitud y el espaciado de los sarcómeros (**Figura 16–76**). Los extremos más de los filamentos de actina están unidos al disco Z, formado por CapZ y α-actinina; el disco Z forma un casquete en los filamentos (impidiendo su despolimerización) y los mantiene unidos formando un haz espaciado de forma regular. La longitud precisa de cada filamento viene determinada por una proteína muy grande llamada *nebulina*, formada casi exclusivamente por secuencias repetidas de unión a actina de 35 aminoácidos. La nebulina se extiende desde el disco Z hasta los extremos menos de cada uno de los filamentos delgados y actúa como un "gobernante molecular" que dictamina la longitud del filamento. Los extremos menos de los filamentos delgados están encasquetados y estabilizados por otra proteína, la tropomodulina. Aunque existe un recambio lento de subunidades de actina en ambos extremos del filamento delgado muscular y los componentes del filamento delgado se recambian con una vida media de algunos días, los filamentos de actina en los sarcómeros son muy estables, a diferencia de lo dinámicos que son los filamentos de actina en el resto de tipos celulares cuya vida media es de pocos minutos o menos.

Los filamentos gruesos están localizados a medio camino entre los discos Z por pares opuestos de otra proteína patrón incluso más larga, denominada *titina*. La titina actúa como un resorte molecular con series muy largas de dominios parecidos a inmunoglobulinas que pueden desplegarse uno a uno cuando se aplica una fuerza a la proteína. Este desplegamiento y replegamiento mantiene a los filamentos gruesos situados en el centro del sarcómero y permite a la fibra muscular recuperarse después de la contracción. En *C. elegans*, cuyos sarcómeros son más largos que los de los vertebrados, la titina también es más larga, lo cual sugiere que la proteína también actúa como gobernante molecular, determinando en este caso la longitud total de cada sarcómero (véase Figura 3–33).

Un incremento repentino de la concentración citosólica de Ca^{2+} inicia la contracción muscular <CTGC>

Las interacciones moleculares generadoras de fuerza entre los filamentos gruesos de miosina y los delgados de actina sólo se producen cuando una señal se transmite desde el nervio motor al músculo esquelético. Justo después de la llegada de la señal, la fibra muscular tiene que ser capaz de contraerse con rapidez, con todos los sarcómeros acortándose de forma simultánea. Para que se produzca esta contracción extremadamente rápida son necesarias dos características importantes de la célula muscular. En primer lugar, y como hemos indicado, las cabezas motoras individuales de miosina en cada filamento grueso permanecen sólo una fracción muy pequeña del ciclo de ATP unidas al filamento generando fuerza de forma activa, así pues la mayoría de cabezas de miosina actúan de forma sucesiva en el mismo filamento delgado sin interferir unas con otras. En segundo lugar, un sistema especializado de membranas transmite la señal rápidamente a través de toda la célula. La señal procedente del nervio induce un potencial de acción en la membrana plasmática de la célula muscular (descrito en el Capítulo 11); esta excitación eléctrica se extiende con rapidez a través de una serie de sáculos membranosos, los túbulos transversos o *túbulos T*, que se extienden desde la parte interna de la membrana plasmática alrededor de cada miofibrilla. La señal se desplaza a través de un pequeño orificio del *retículo sarcoplasmático*, una red adya-

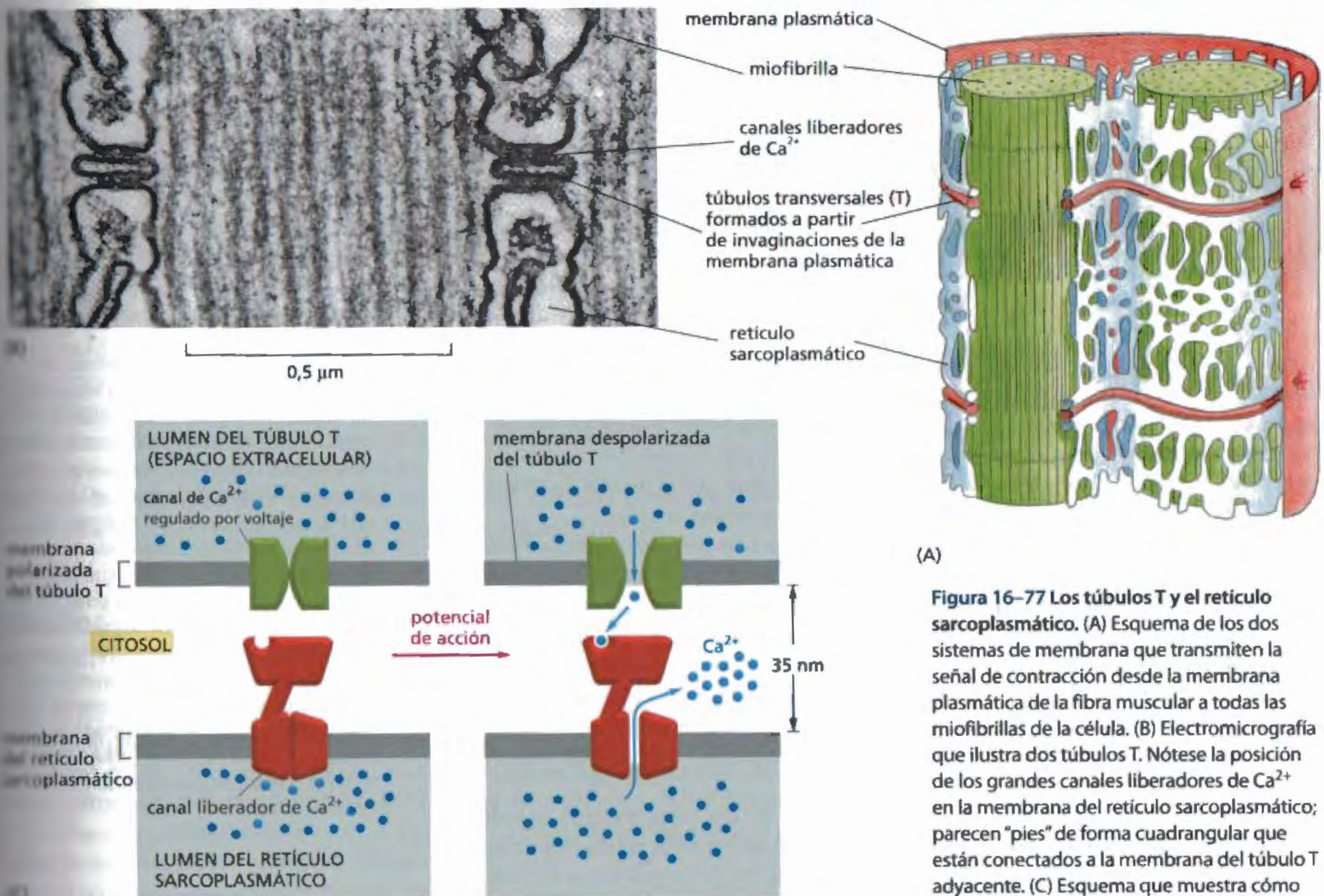


Figura 16–77 Los túbulos T y el retículo sarcoplasmático. (A) Esquema de los dos sistemas de membrana que transmiten la señal de contracción desde la membrana plasmática de la fibra muscular a todas las miofibrillas de la célula. (B) Electromicrografía que ilustra dos túbulos T. Nótese la posición de los grandes canales liberadores de Ca^{2+} en la membrana del retículo sarcoplasmático; parecen "pies" de forma cuadrangular que están conectados a la membrana del túbulo T adyacente. (C) Esquema que muestra cómo puede abrirse un canal liberador de Ca^{2+} de la membrana del retículo sarcoplasmático mediante activación de un canal de Ca^{2+} sensible al voltaje. (B, por cortesía de Clara Franzini-Armstrong.)

...nte de retículo endoplasmático modificado que envuelve cada miofibrilla como si fuera un calcetín (**Figura 16–77**A y B).

Cuando el potencial de acción entrante activa un canal de Ca^{2+} en la membrana del túbulo T, una entrada de Ca^{2+} provoca la apertura de los canales liberadores de Ca^{2+} en el retículo sarcoplasmático (Figura 16–77C). El Ca^{2+} fluye hacia el citosol y se inicia la contracción de cada miofibrilla. La señal procedente de la membrana plasmática de la fibra muscular se transmite en cuestión de milisegundos (a través de los túbulos T y del retículo sarcoplasmático) a cada sarcómero de la célula, por lo que todas las miofibrillas se contraen al mismo tiempo. El incremento de la concentración de Ca^{2+} es transitorio, ya que el Ca^{2+} es rápidamente bombeado de nuevo hacia el retículo sarcoplasmático por una bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP muy abundante (también llamada Ca^{2+}-ATPasa) situada en su membrana (véase Figura 11–13). Por lo general, la concentración de Ca^{2+} se restablece a los 30 milisegundos, permitiendo que las miofibrillas se relajen. Así pues, la contracción muscular depende de dos procesos que consumen grandes cantidades de ATP: el deslizamiento de los filamentos, dirigido por la ATPasa del dominio motor de la miosina, y el bombeo de Ca^{2+} dirigido por la bomba de Ca^{2+}.

La dependencia de Ca^{2+} de la contracción del músculo esquelético en los vertebrados, y su dependencia de las órdenes motoras enviadas por los nervios, se debe en su totalidad a un conjunto de proteínas accesorias especializadas que están íntimamente relacionadas con los filamentos delgados de actina. Una de estas proteínas accesorias es una forma muscular de la *tropomiosina*, una molécula alargada que se une a lo largo de la ranura de la hélice de actina. Otra proteína es la *troponina*, un complejo de tres polipéptidos, las troponinas T, I y C (denominadas así por sus dominios de unión a tropomiosina, a inhibidores y actividades de unión a Ca^{2+}, respectivamente). La troponina I se une a la actina y a la troponina T. En una fibra muscular relajada, el complejo troponina I-T empuja a las tropomiosinas fuera de su lugar normal de unión, a una posición a lo largo del filamento de actina que interfiere con el lugar al cual se unen las cabezas de miosina, impidiendo, por tanto, la interacción generadora de la fuerza. Cuando los niveles de Ca^{2+} citosólico se incrementan, la troponina C –que puede unir cuatro moléculas de Ca^{2+}– induce la liberación de la troponina I de la actina. Esto permite a las molé-

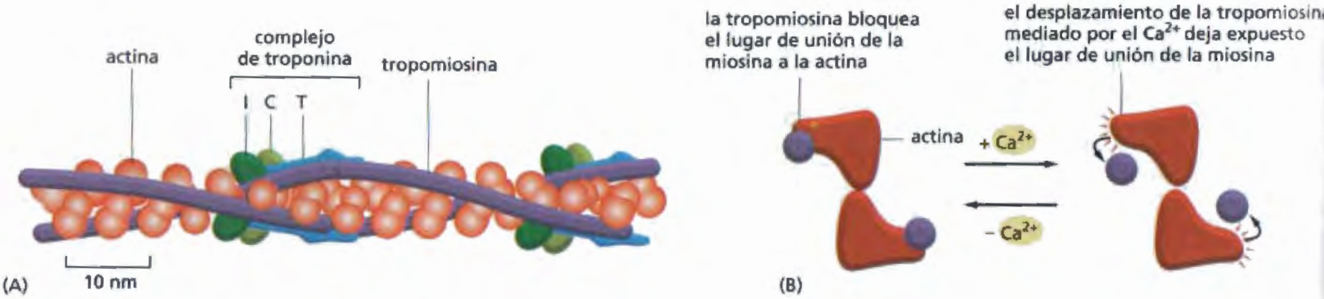


Figura 16–78 Control de la contracción del músculo esquelético por la troponina. (A) Filamento delgado de una célula del músculo esquelético que muestra la posici de la tropomiosina y de la troponina a lo largo del filamento de actina. Cada molécu de tropomiosina tiene siete regiones de secuencias homólogas, espaciadas regularmente, cada una de las cuales se une a una subunidad de actina en el filamento. (B) Un filamento delgado ilustra cómo parece que la unión del Ca^{2+} (unido a la troponina) libera el bloqueo que ejerce la tropomiosina en la interacción entre la acti y la cabeza de miosina (A, adaptada de G.N Phillips, J.P. Fillers y C. Cohen, *J. Mol. Biol.* 19 111-131, 1986. Con la autorización de Academic Press.)

culas de tropomiosina regresar a su posición habitual de forma que las cabezas de miosina pueden deslizarse a lo largo de los filamentos de actina (**Figura 16–78**). La troponina C está muy relacionada con la proteína de unión a Ca^{2+}, calmodulina (véase Figura 15–44); se puede considerar como una forma especializada de calmodulina que ha adquirido lugares de unión para la troponina I y la troponina T, de forma que se asegura que la miofibrilla responda de forma extremadamente rápida a un incremento en la concentración de Ca^{2+}.

En las células musculares lisas, llamados así porque han perdido las estriaciones regulares del músculo esquelético, la contracción se produce también por una entrada de iones de calcio, pero el mecanismo que lo regula es distinto. El músculo liso forma las partes contráctiles del estómago, intestino y útero, la pared de las arterias y muchas otras estructuras que necesitan de contracciones mantenidas pero lentas. El músculo liso está formado por láminas de células en forma de huso muy alargadas, cada una de las cuales tiene un solo núcleo. Las células musculares lisas no expresan troponinas. La entrada de Ca^{2+} en la célula regula la contracción mediante dos mecanismos que dependen de la calmodulina, la proteína ubicua de unión a calcio.

En primer lugar, la calmodulina con el Ca^{2+} unido se une a una proteína de unión a la actina llamada caldesmon, que bloquea los lugares de unión de la actina donde normalmente se unirían las cabezas motoras de la miosina. Este hecho provoca que caldesmon se separe de los filamentos de actina preparándolos para la contracción. En segundo lugar, la miosina muscular lisa se fosforila en uno de sus dos cadenas ligeras por la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), como se ha descrito previamente para la regulación de la miosina II no muscular (véase Figura 16–72). Cuando la cadena ligera está fosforilada, la cabeza de miosina puede interactuar con los filamentos de actina y provocar la contracción; cuando está desfosforilada, la cabeza de miosina tiende a disociarse de la actina y se inactiva (al contrario que la miosina II no muscular, la desfosforilación de la cadena ligera no induce el desensamblaje de los filamentos gruesos en las células musculares lisas). La MLCK necesita de la unión de Ca^{2+}/calmodulina para ser completamente activa.

Otras moléculas señalizadoras externas tales como la adrenalina (epinefrina) también pueden regular la actividad contráctil del músculo liso. La adrenalina se une a su receptor en la superficie celular acoplado a proteína G provocando un aumento de los niveles intracelulares de AMP cíclico, que a la vez activan la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) (véase Figura 15–35). La PKA fosforila e inactiva a MLCK y provoca, en consecuencia, la relajación de la célula muscular lisa.

Las fosforilaciones que regulan la contracción de las células musculares lisas se producen lentamente y la contracción máxima a menudo necesita un segundo para llevarse a cabo (comparada con los pocos milisegundos necesarios para la contracción de la célula muscular esquelética). Pero para el músculo liso no es importante que la activación de la contracción sea rápida: su miosina II hidroliza ATP diez veces más lentamente que la miosina del músculo esquelético, produciendo un ciclo lento de cambios conformacionales de miosina que dan lugar una contracción lenta.

El músculo cardíaco es una máquina de ingeniería muy precisa <AGGT>

El corazón es el músculo del organismo que desarrolla un trabajo más pesado: se contrae cerca de tres mil millones (3×10^9) de veces a lo largo de una vida humana normal. Este número es casi idéntico al promedio de revoluciones durante la vida normal de un motor de un automóvil. En las células del corazón se expresan algunas isoformas específicas de la miosi-

la miosina muscular cardíaca y de la actina muscular cardíaca. Cambios incluso sutiles en las proteínas contráctiles que se expresan en el corazón –cambios que no producirían ninguna consecuencia detectable en otros tejidos– pueden provocar una enfermedad cardíaca grave (Figura 16–79).

Parece que el aparato contráctil cardíaco normal es una máquina regulada de una forma tan fina, que cualquier pequeña anormalidad en su funcionamiento puede ser suficiente para producir un declive de su función durante los años de movimiento repetitivo. La *cardiomiopatía familiar hipertrófica* es causa frecuente de muerte súbita en atletas jóvenes. Se trata de una enfermedad hereditaria que afecta a dos de cada mil personas y está asociada a un aumento del tamaño del corazón, a vasos vasculares coronarios anormalmente pequeños y a alteraciones en el ritmo cardíaco (arritmias cardíacas). Se ha encontrado que esta enfermedad puede estar producida por una de las 40 sutiles mutaciones puntuales posibles en los genes que codifican la cadena pesada de la miosina β cardíaca (casi todas causantes de cambios en el dominio motor o cerca de él) o una mutación en otra docena de genes que codifican proteínas contráctiles, incluyendo la cadena ligera de la miosina, la troponina cardíaca y la tropomiosina. Otras mutaciones menores sin sentido en el gen de la actina cardíaca pueden provocar otra alteración del corazón, llamada *cardiomiopatía dilatada*, que también con frecuencia es la causa de un fallo cardíaco temprano.

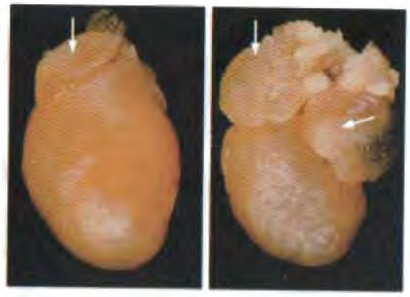


Figura 16–79 Efecto de una mutación sutil de la miosina cardíaca sobre el corazón. *Izquierda*, corazón normal de una cría de ratón de 6 días de edad. *Derecha*, corazón de una cría con una mutación puntual en las dos copias del gen de su miosina cardíaca que cambia la Arg 403 por una Gln. Las flechas indican los atrios. En el corazón de la cría con el gen mutado, los dos atrios son anormalmente grandes (hipertróficos) y el ratón muere a los pocos días de nacer. (De D. Fatkin et al., *J. Clin. Invest.* 103:147,1999. Con la autorización de The Rockefeller University Press.)

Los cilios y los flagelos son estructuras móviles formadas por microtúbulos y por dineína

Al igual que las miofibrillas, que son estructuras altamente especializadas y eficientes en cuanto a motilidad formadas por filamentos de actina y miosina, los cilios y los flagelos son estructuras móviles muy especializadas y eficientes formadas por microtúbulos y dineína. Ambas estructuras son apéndices celulares filiformes que contienen un haz de microtúbulos en su interior. Los **flagelos** se presentan en los espermatozoides y en muchos protozoos. Mediante su movimiento ondulante permiten, a las células que los poseen, nadar por los medios líquidos (**Figura 16–80**A). Los **cilios** son más cortos que los flagelos y están organizados de forma parecida, pero su movimiento es parecido al movimiento de una brazada (Figura 16–80B). Los movimientos de los cilios adyacentes están casi completamente sincronizados y dan lugar a unos patrones parecidos a olas que pueden ser observados al microscopio. El movimiento de los cilios puede empujar a las células a través de un fluido (como p. ej. es el caso del protozoo *Paramecium*) o puede desplazar un fluido por encima de la superficie de un grupo de células de un tejido. En el cuerpo humano, un número muy elevado de cilios ($10^9/cm^2$ o más) tapizan nuestro tracto respiratorio, barriendo capas de moco, atrapando partículas de polvo, expulsando bacterias hacia la cavidad bucal donde son tragadas y posteriormente eliminadas. De la misma forma, los cilios del oviducto ayudan al transporte de los embriones hasta el útero.

El movimiento de un cilio o de un flagelo está producido por el batido de su parte central, llamado **axonema**. El axonema está formado por microtúbulos y por sus proteínas asociadas que se organizan según un patrón regular y diferencial. Nueve dobletes especiales de microtúbulos (que contienen un microtúbulo completo y la mitad de otro microtúbulo fusionados de forma que comparten una pared tubular común) están organizados en un anillo alrededor de un par sencillo de microtúbulos (**Figura 16–81**). Esta organización característica se presenta en casi todos los cilios y flagelos de las células eucariotas (desde los protozoos hasta la especie humana). Los microtúbulos se extienden de forma continua a lo largo de todo el axonema, que puede tener entre 10 y 200 μm. En posiciones determinadas y regulares a lo largo de los microtúbulos, diferentes proteínas accesorias entrecruzan estos microtúbulos.

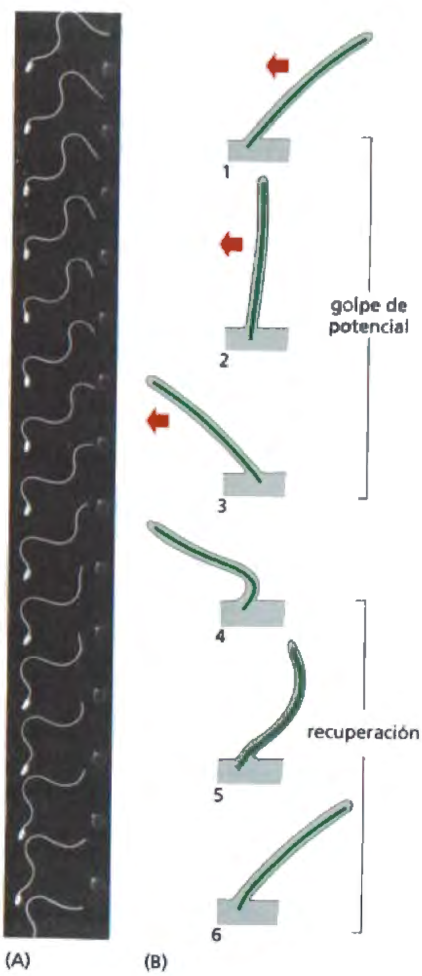


Figura 16–80 Contraste entre los movimientos de un cilio y un flagelo. (A) El movimiento ondulante del flagelo de un espermatozoide de un tunicado. La célula se fotografió con una iluminación estroboscópica de 400 destellos por segundo. Nótese que las ondas de amplitud constante se desplazan desde la base del flagelo hasta su punta. (B) El batido de un cilio que parece la brazada de un nadador. El golpe de una brazada (flechas *rojas*), durante el cual el fluido es empujado sobre la superficie de la célula, va seguido de un movimiento de recuperación lento. Por lo general, cada ciclo tarda en completarse entre 0,1 y 0,2 segundos y genera una fuerza perpendicular al eje del axonema (el núcleo del cilio). (A, por cortesía de C.J. Brokaw.)

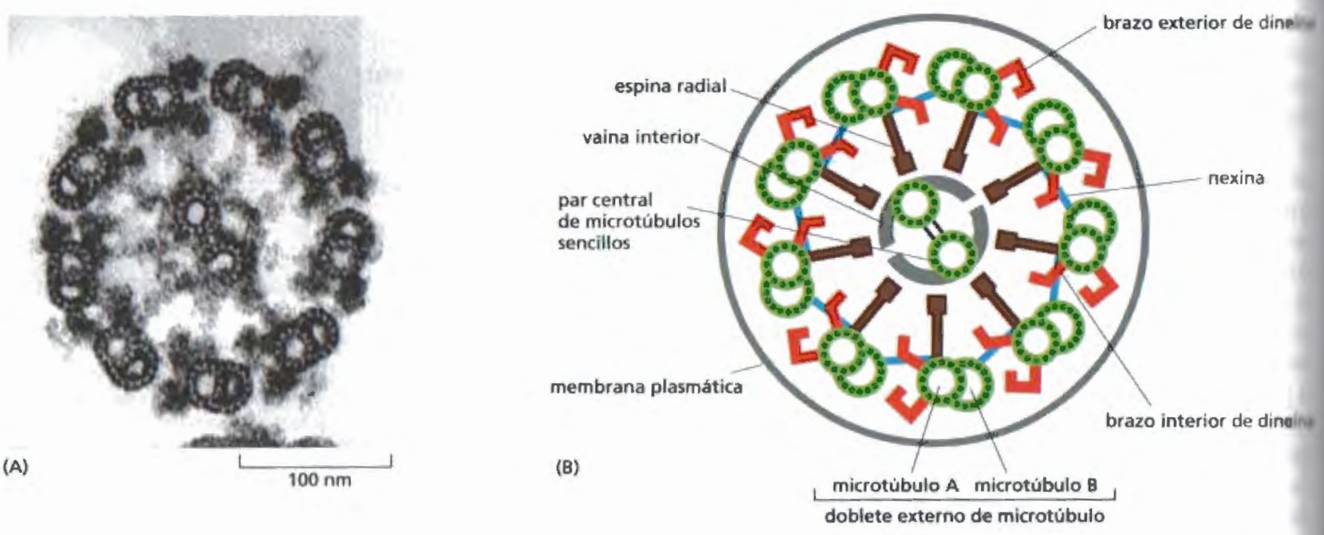


Figura 16–81 Disposición de los microtúbulos en un cilio o en un flagelo. (A) Electromicrografía que muestra una sección transversal del flagelo del alga verde (*Chlamydomonas*), en la que se pued[e] observar la disposición axonemática característica de "9 + 2" de los microtúbulo[s]. (B) Esquema de las partes de un flagelo o d[e] un cilio. Las diversas proyecciones de los microtúbulos los mantienen unidos y se producen a intervalos regulares a lo largo del axonema. (A, por cortesía de Lewis Tilne[y].)

Moléculas de *dineína ciliar* forman puentes entre los dobletes de microtúbulos vecinos alrededor de la circunferencia del axonema (**Figura 16–82**). Cuando se activa el dominio motor de esta dineína, las moléculas de dineína unidas a un doblete de microtúbulos (véase Figura 16–64) intentan desplazarse hacia el doblete siguiente, forzando a los microtúbulos adyacentes a deslizarse unos sobre otros, de forma parecida a cómo se deslizan los filamentos delgados de actina durante la contracción muscular. Sin embargo, la presencia de otras uniones entre los dobletes de microtúbulos impide este deslizamiento y la fuerza de la dineína se convierte en movimiento de flexión (**Figura 16–83**).

La longitud de los flagelos está cuidadosamente regulada. Si uno de los dos flagelos de una célula de *Chlamydomonas* es amputado, el flagelo restante se encoge mientras que el fragmento restante del flagelo amputado crece de nuevo, hasta conseguir ambos la misma longitud y continuar juntos su crecimiento hasta que son tan largos como lo eran en la célula sin amputar. Los nuevos componentes flagelares, incluyendo la tubulina y la dineína se incorporan a los flagelos en crecimientos desde los extremos distales. Así pues, incluso en estas disposiciones de filamentos motores altamente ordenadas y estables, las células utilizan la flexibilidad y adaptabilidad intrínseca del citoesqueleto para responder de forma rápida y dinámica a los cambios que experimentan.

En el hombre, algunos defectos hereditarios en la dineína ciliar provocan el síndrome de Kartagener. Este síndrome se caracteriza por la esterilidad masculina debido a la falta de

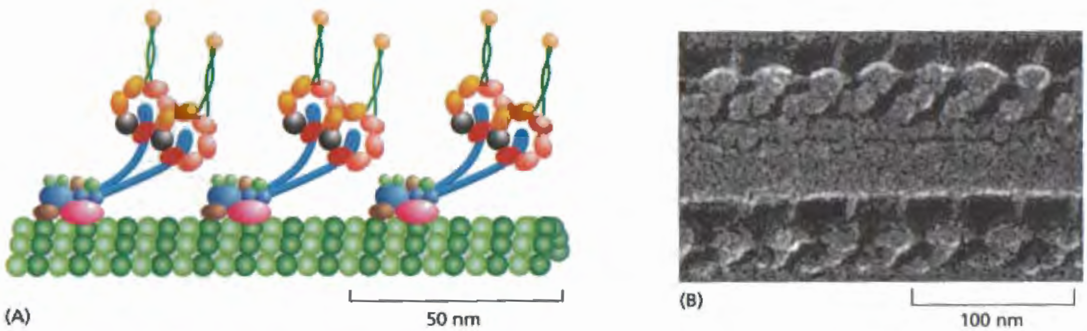


Figura 16–82 La dineína ciliar. La dineína ciliar (del axonema) es un gran complejo proteico (cerca de 2 millones de daltons) compuesto por entre 9 y 12 cadenas polipeptídicas, la mayor de las cuales es la cadena pesada que tiene más de 500.000 daltons. (A) Se cree que las cadenas pesadas constituyen la mayor parte de la cabeza globular y los dominios del tallo, y muchas de las cadenas más pequeñas se encuentran agrupadas alrededor de la base de éste (véase Figura 16–59B para observar la molécula aislada). La cola de la molécula se une fuertemente a un microtúbulo A, a través de una reacción independiente de ATP, mientras que las cabezas globulares mayores tienen un lugar de unión dependiente de ATP para un microtúbulo B (véase Figura 16–81). Cuando las cabezas hidrolizan el ATP que tienen unido, se desplazan hacia el extremo menos del microtúbulo B y producen así una fuerza de deslizamiento entre los dobletes de microtúbulos adyacentes de un cilio o de un flagelo. Para más detalles, véase Figura 16–64. (B) Electromicrografía de un cilio sometido a criofractura, mostrando los brazos de dineína proyectándose a intervalos regulares a partir de los dobletes de microtúbulos. (Por cortesía de John Heus[er].)

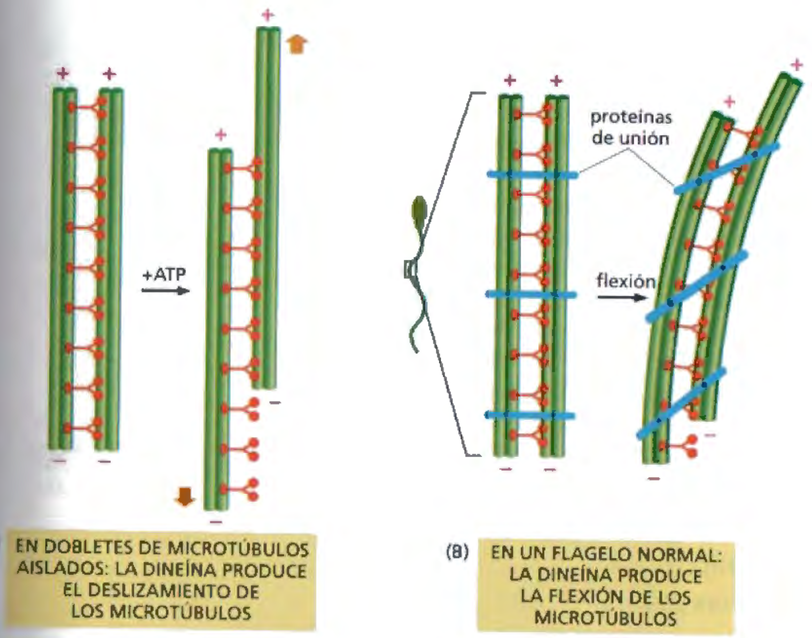


Figura 16–83 La flexión de un axonema. (A) Cuando los axonemas están expuestos a la enzima proteolítica tripsina, las uniones que mantienen unidos los dobletes de microtúbulos vecinos se rompen. En este caso, la adición de ATP permite la acción motora de las cabezas de dineína, de forma que un par de dobletes se desliza sobre otro par. (B) En un axonema intacto (como el del espermatozoide), se impide el deslizamiento de los dobletes de microtúbulos mediante la unión de proteínas flexibles. La acción motora provoca la flexión, generando olas o diversos movimientos ondulantes, como los que se muestran en la Figura 16–80.

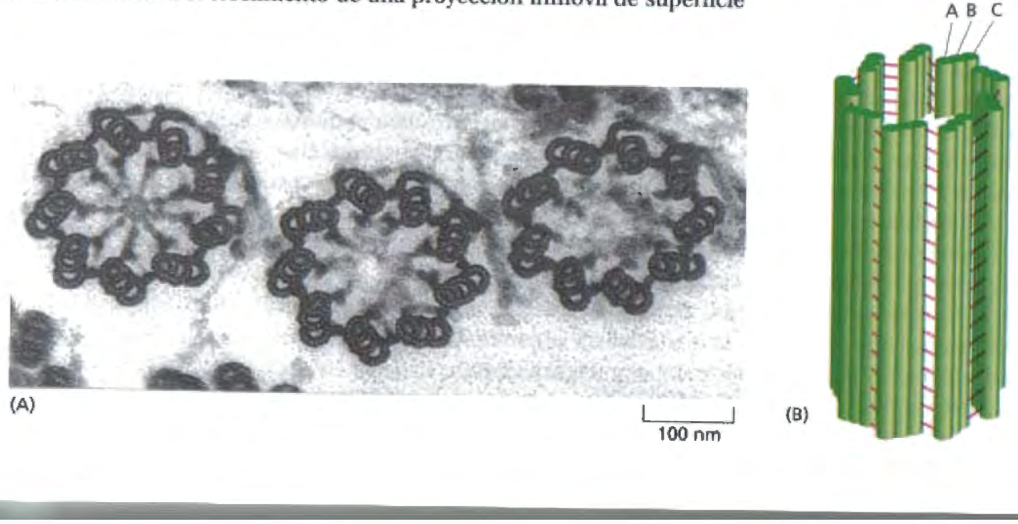
esterilidad de los espermatozoides, una alta susceptibilidad a infecciones respiratorias debidas a la paralización de los cilios de la mucosa respiratoria, que impide la eliminación de los restos celulares y bacterias, y a defectos en la determinación de los ejes laterales (izquierdo-derecho) del organismo durante el desarrollo embrionario (descrito en el Capítulo 22).

Las bacterias también se desplazan por los medios acuosos utilizando estructuras de la superficie celular llamadas flagelos, pero éstos no contienen ni microtúbulos ni dineína, con lo que ni ondean ni se flexionan. De hecho, los *flagelos bacterianos* son filamentos largos, de hélices rígidas, formados por subunidades repetidas de la proteína flagelina. Los flagelos giran como hélices, dirigidos por motores especiales de rotación inmersos en la pared celular bacteriana (véase Figura 15–71). La utilización de un mismo nombre para estos dos tipos de apéndices nadadores tan sumamente distintos es un desafortunado accidente histórico.

Unas estructuras, denominadas *corpúsculos basales*, unen firmemente los cilios y flagelos por su base a la superficie celular. Los corpúsculos basales tienen la misma forma que los centríolos que se encuentran en el centro de los centrosomas de las células animales, con nueve grupos de tripletes de microtúbulos fusionados organizados como una rueda de carro (Figura 16–84). De hecho, en algunos organismos, los corpúsculos basales y los centríolos pueden intercambiar sus funciones: por ejemplo, en el alga unicelular *Chlamydomonas*, el flagelo desaparece durante cada mitosis y los corpúsculos basales se dirigen hacia el interior celular y forman parte del huso mitótico. Aparecen nuevos centríolos y nuevos corpúsculos basales a través de un proceso replicativo curioso, mediante el cual se forma un pequeño descendiente perpendicular a la estructura original, por un mecanismo todavía desconocido (véase Figura 17–31).

Incluso en las células animales que han perdido totalmente los cilios o los flagelos, los centríolos nuclean con frecuencia el crecimiento de una proyección inmóvil de superficie

Figura 16–84 Corpúsculos basales. (A) Electromicrografía de una sección transversal a través de tres centríolos del córtex de un protozoo. (B) Esquema de un corpúsculo basal visto lateralmente. Cada corpúsculo basal constituye la porción inferior de un axonema ciliar y está formado por nueve tripletes de microtúbulos, cada uno de los cuales tiene un microtúbulo completo (el microtúbulo A) fusionado con dos microtúbulos incompletos (los microtúbulos B y C). Otras proteínas (marcadas en *rojo* en B) forman puentes que mantienen unida la disposición cilíndrica de los microtúbulos. La estructura del centríolo es esencialmente la misma (véase Figura 16–31). (A, por cortesía de D.T. Woodrow y R.W. Linck.)



rica en microtúbulos llamada *cilio primario*. El cilio primario tiene una longitud de unas cuantas micras y no contiene dineína. Se encuentran en la superficie de muchos tipos celulares distintos incluyendo fibroblastos, células epiteliales, neuronas, células óseas y condrocitos (células del cartílago). Muchas de las proteínas señalizadoras se localizan en el cilio primario, incluyendo proteínas implicadas en la vía de señalización Hedgehog (véase p. 950) y receptores para los neurotransmisores de las neuronas del sistema nervioso central. En las células epiteliales del riñón, los cilios primarios actúan como sensores de flujo que detectan el movimiento del fluido a través de los túbulos renales. Unos canales de calcio de sensibilidad mecánica se abren cuando el flujo del fluido batea los cilios primarios, regulando el crecimiento y la proliferación en el riñón. La pérdida del canal de calcio o de otros componentes estructurales del cilio primario en las células renales provoca la enfermedad renal policística, un trastorno genético común que induce hiperproliferación de las células epiteliales renales; se forman grandes cistos llenos de fluido en los órganos y finalmente se produce insuficiencia renal. Otro tipo especializado de cilio primario que por lo general no ondea es necesario para establecer la asimetría bilateral del embrión en desarrollo (véase Figura 22–87).

La dinámica de los microtúbulos y las interacciones de muchas proteínas motoras son necesarias para la formación del huso mitótico

Las miofibrillas y los cilios son estructuras relativamente permanentes especializadas en la producción de movimientos repetitivos. Pero la mayoría de movimientos celulares dependen de estructuras lábiles que aparecen en estadios concretos del ciclo celular o como respuesta a señales externas y entonces desaparecen una vez finalizan su acción. La estructura más familiar de este tipo es el huso mitótico y el anillo contráctil que se forman durante la división celular. En el Capítulo 17 describimos en detalle tanto el proceso de la mitosis como los sistemas de control del ciclo celular que determinan la aparición de los eventos de la división celular. Aquí estudiaremos brevemente unos cuantos mecanismos del citoesqueleto que contribuyen a la formación y función mecánica del huso mitótico.

La construcción del huso mitótico es un ejemplo fascinante y particularmente importante de la capacidad de autoorganización de los equipos de proteínas motoras en interacción con los filamentos dinámicos del citoesqueleto. También se incluye la participación de los cromosomas. En una rápida secuencia de acontecimientos que en las células animales dura menos de una hora, los haces en interfase de los microtúbulos se desensamblan completamente y se reorganizan formando la estructura de huso bipolar que es la responsable de segregar a los cromosomas replicados con una fidelidad perfecta en las dos células hijas. Debido a la gran importancia de la exactitud en la transmisión del material genético, la construcción y el funcionamiento del huso mitótico presentan un alto grado de redundancia, de forma que si un conjunto de mecanismos fallan por alguna causa, existen mecanismos de compensación que aseguran el posicionamiento correcto de los cromosomas.

En las primeras etapas de la mitosis, el comportamiento dinámico y la longitud media de los microtúbulos sufren cambios drásticos. En los haces en interfase, los microtúbulos son largos y casi nunca sufren catástrofes, pero durante la mitosis la longitud se reduce y se vuelven mucho más dinámicos. La nucleación de microtúbulos y su ensamblaje se incrementan en las zonas alrededor de los cromosomas condensados. Mientras los microtúbulos se ensamblan en la cromatina condensada apuntando en direcciones al azar, las acciones coordinadas de algunas proteínas motoras construyen un huso bipolar coherente a partir de la masa desorganizada de microtúbulos. En primer lugar, la quinesina-5 bipolar (véase Figura 16–58) distribuye a los microtúbulos en haces paralelos y desliza microtúbulos que se orientan en sentidos opuestos. A continuación, otra quinesina unida a los brazos de los cromosomas, la quinesina-4, se desliza hacia los extremos más de los microtúbulos asociados con los cromosomas y empuja sus extremos menos lejos de los cromosomas. Por último, el extremo menos dirigido por la dineína y la quinesina-14 forman complejos oligoméricos con proteínas de soporte que mantienen los extremos menos unidos formando los polos del huso mitótico. En la mayoría de las células animales, estos procesos están dirigidos por un par de centrosomas que ayudan en la nucleación y organización de estos extremos menos. El resultado final es un huso mitótico bipolar (**Figura 16–85**).

Una vez ensamblado, el huso mitótico puede permanecer estable y quiescente durante largos periodos de tiempo. En la mayoría de animales, los oocitos no fecundados detienen

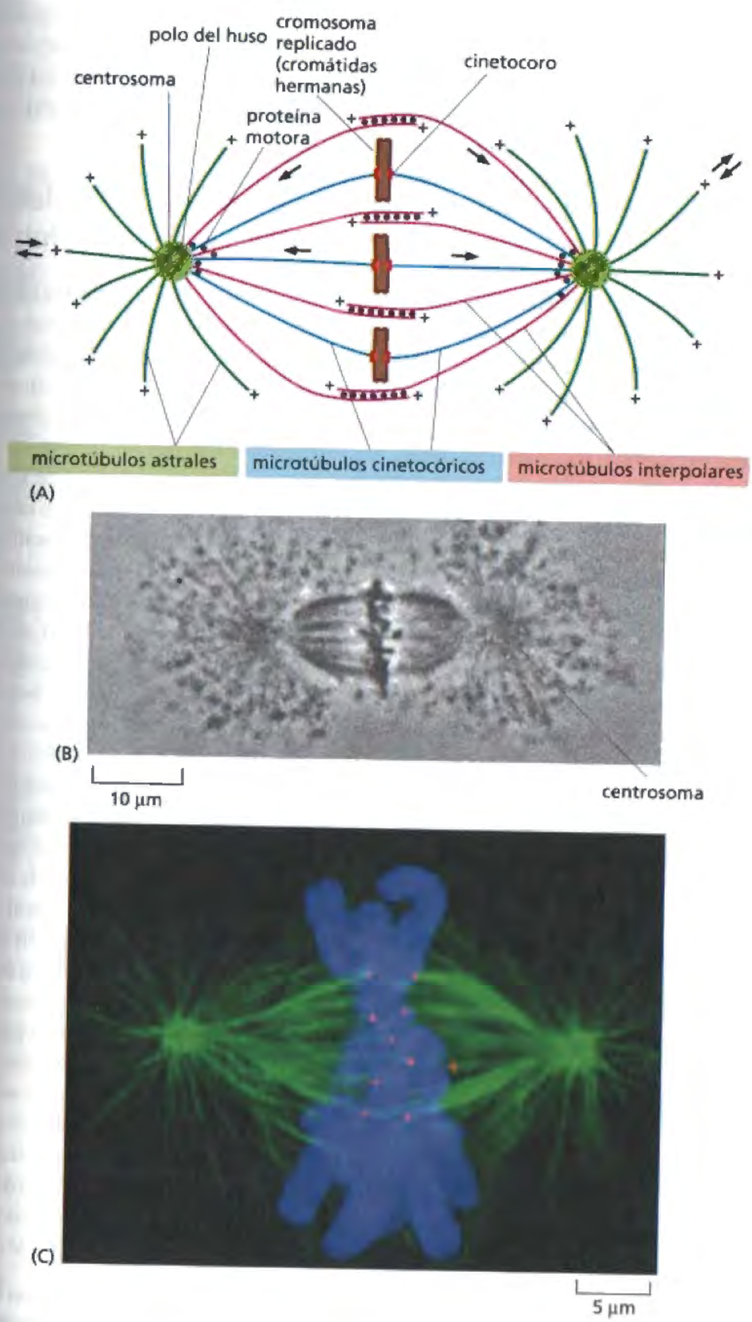


Figura 16–85 El huso mitótico en las células animales. <GTCT> (A) Existen tres clases de microtúbulos dinámicos en el huso mitótico de la metafase: microtúbulos del cinetocoro (*azul*), que unen cada cromosoma al polo del hueso; microtúbulos interpolares (*rojo*), que mantienen unidas las dos mitades del huso, y los microtúbulos astrales (*verde*), que pueden interactuar con el córtex celular. Todos los microtúbulos están orientados con sus extremos menos en los polos del huso donde están los centrosomas y los extremos más proyectándose hacia fuera. Como se indica con las flechas, los microtúbulos astrales sufren inestabilidad dinámica, creciendo y acortándose en sus extremos más, mientras que los microtúbulos del cinetocoro y los interpolares fluctúan hacia los polos del huso. (B) Micrografía de contraste de fases de un huso mitótico aislado en metafase, con los cromosomas alineados en el ecuador del huso. (C) Esta imagen de fluorescencia muestra los microtúbulos del huso en *verde* y los cromosomas en *azul*. Las manchas *rojas* marcan los cinetocoros, estructuras especializadas que conectan los microtúbulos a los cromosomas. (B, de E.D. Salmon y R.R. Segall, *J. Cell Biol.* 86:355-365, 1980. Con la autorización de The Rockefeller University Press; C, de A. Desai, *Curr. Biol.* 10:R508, 2000. Con la autorización de Elsevier.)

el ciclo celular en la metafase de la meiosis, y el huso se espera durante días o meses hasta que la fecundación comporta la progresión a través del ciclo celular (véase Capítulo 21). Esta apariencia estable es decepcionante puesto que el huso es una estructura altamente dinámica, preparada para la acción que empezará cuando los cromosomas repentinamente empiecen a separarse en la anafase. Por ejemplo, muchos de los microtúbulos del huso presentan un comportamiento llamado *flujo guardián*, en el cual se produce un aumento neto de subunidades de tubulina en los extremos más que se equilibra con la misma pérdida neta en los extremos menos cerca del polo del huso. El flujo guardián está dirigido por la acción de proteínas motoras en los extremos menos del polo del huso que están constantemente combinando microtúbulos mientras que en los microtúbulos interpolares la quinesina-5 empuja hacia fuera los extremos más (véase Figura 16–85). Como se describirá con más detalle en el Capítulo 17, el delicado equilibrio entre estos dos tipos de actividades de las proteínas motoras en el huso determina también su longitud. Por encima de todo, el huso mitótico representa un esfuerzo de colaboración en el que se combinan las propiedades dinámicas de los microtúbulos con las acciones individuales de docenas de motores moleculares y de otros componentes organizadores.

Muchas células pueden desplazarse sobre un sustrato sólido

El deslizamiento celular proporciona otro ejemplo en el que se aprecia la integración dinámica de los filamentos del citoesqueleto, los reguladores de los filamentos y las proteínas motoras. Muchas células, en lugar de utilizar cilios y flagelos para nadar, se desplazan arrastrándose sobre superficies. Las amebas predadoras se arrastran continuamente para buscar alimento y fácilmente puede observarse en una gota de agua como atacan y devoran a flagelados y ciliados más pequeños. En el caso de los animales, la mayor parte de los sistemas de locomoción también se producen arrastrándose, con la excepción de los espermatozoides. Durante la embriogénesis, la estructura de un animal se genera a partir de las migraciones de células individuales hacia localizaciones diana específicas y por el movimiento coordinado de capas epiteliales (descrito en el Capítulo 23). En los vertebrados, las *células de la cresta neural* recorren largas distancias desde su lugar de origen en el tubo neural hacia una gran variedad de destinos del embrión. Estas células tienen destinos diversos, convirtiéndose en células pigmentarias de la piel, neuronas sensoriales o simpáticas y células gliales u otros tipos celulares. Este largo recorrido es fundamental para la construcción del sistema nervioso completo: también de esta forma los conos de crecimiento en los frentes de avance, ricos en actina, de los axones en desarrollo viajan hacia sus futuras dianas sinápticas guiados, a lo largo de su recorrido, por una combinación de señales solubles y de señales asociadas con la superficie celular y con la matriz extracelular.

El animal adulto también dispone de células que se arrastran. Los macrófagos y los neutrófilos se dirigen hacia los lugares de infección y engullen a los organismos invasores extraños como función crítica de la respuesta inmune. Los osteoclastos del hueso forman canales rellenos de osteoblastos, que los siguen en un proceso continuado de remodelación y renovación del hueso. De forma parecida, los fibroblastos pueden migrar a través del tejido conjuntivo, remodelándolo donde sea necesario y ayudando a la reconstrucción de las estructuras dañadas en las heridas. En un proceso ordenado, las células del epitelio que tapiza el intestino viajan hacia las capas superiores reemplazando las células absorbentes que se han eliminado en los extremos de las vellosidades. Desgraciadamente, este desplazamiento de rastreo también es muy importante en muchos cánceres, cuando las células de un tumor primario invaden el tejido circundante, se arrastran hacia los vasos sanguíneos y linfáticos y entonces aparecen en otros lugares del organismo donde producen metástasis.

Este movimiento es un proceso complejo altamente integrado, dependiente del córtex de actina situado bajo la membrana plasmática. En él están implicadas tres actividades distintas: *protuberancia*, mediante la cual las estructuras ricas en actina son empujadas hacia el frente celular; *adhesión*, mediante la cual el citoesqueleto de actina conecta la membrana plasmática con el sustrato, y *tracción*, mediante la cual la mayor parte del citoplasma es di-

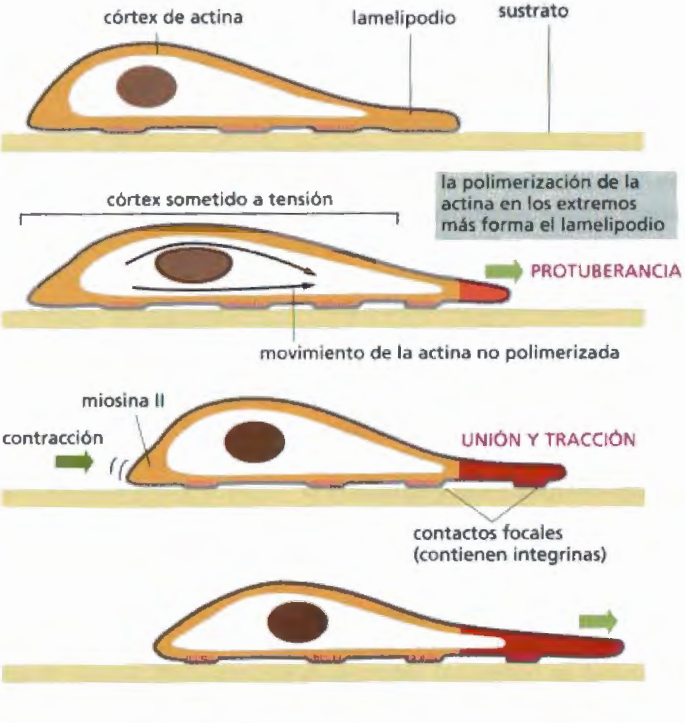


Figura 16-86 Modelo de cómo las fuerza generadas en el córtex rico en actina desplazan la célula hacia adelante. La protuberancia dependiente de la polimerización de actina, y la firme adhes de un lamelipodio en el frente de avance la célula, desplaza el extremo hacia adelan (flechas *verdes* en el frente) y contrae el có de actina. La contracción en la parte post de la célula empuja el resto del cuerpo ha adelante (flecha *verde* detrás) relajando p de la tensión generada (tracción). En el fre se forman nuevos contactos focales y los antiguos se desensamblan en la parte posterior mientras la célula se arrastra ha adelante. Este mismo ciclo se puede repe el resultado es que la célula se desplaza h adelante. Alternativamente, todos los pas pueden estar íntimamente coordinados, desplazando con suavidad la célula hacia delante. En *rojo* se muestra la actina corti polimerizada de nuevo.

cuerpo hacia adelante (**Figura 16–86**). En algunas células, como los queratinocitos de la epidermis de los peces, estas actividades están muy coordinadas y las células parece que se deslizan casi sin cambiar de forma. En otras células, como los fibroblastos, estas actividades son más independientes y la locomoción es más irregular.

La protuberancia de la membrana plasmática está dirigida por la polimerización de actina

La primera etapa de la locomoción, la protuberancia del frente de avance, parece estar dirigida por fuerzas generadas por la polimerización de actina que empujan a la membrana plasmática hacia adelante. Distintos tipos celulares generan tipos diferentes de estructuras protuberantes, como filopodios (también conocidos como microespinas), lamelipodios y pseudópodos. Todos ellos están formados por un núcleo denso de filamentos de actina, que excluye los orgánulos rodeados de membrana. Estas estructuras se diferencian por la forma de organización de la actina: en una, dos y tres dimensiones, respectivamente (ya se ha descrito cómo esto se produce a partir de la asociación de diferentes proteínas).

Los **filopodios**, formados por los conos de crecimiento en migración y en algunos tipos de fibroblastos, son esencialmente unidimensionales. Contienen un núcleo de largos haces de filamentos de actina, parecidos a los microvilli pero más largos y delgados, y también más dinámicos. Los **lamelipodios**, que se forman en células epiteliales y fibroblastos y también en algunos tipos de neuronas, son estructuras laminares bidimensionales. Están formados por una red ortogonal de filamentos de actina entrecruzados, la mayoría de los cuales descansan en un plano paralelo al sustrato sólido. Los **pseudópodos**, que se forman en amebas y en neutrófilos, son pequeñas proyecciones tridimensionales formadas por un gel filamentoso de actina <ATGG>. Probablemente debido a que la geometría bidimensional los hace muy adecuados para ser observados al microscopio óptico, disponemos de mucha más información acerca de la organización dinámica y del mecanismo de formación de las protuberancias de los lamelipodios que de los filopodios y de los pseudópodos.

Los lamelipodios disponen de toda la maquinaria necesaria para la motilidad celular. Han sido bien estudiados en las células epiteliales de la epidermis de peces y ranas, conocidas como *queratinocitos* debido a su riqueza en filamentos de queratina. Por lo general estas células recubren todo el animal, formando una capa epitelial, y están especializadas en el cierre muy rápido de heridas, desplazándose a velocidades superiores a las 30 µm/minuto. Cuando se cultivan como células individuales, adoptan una forma diferencial con un lamelipodio muy largo y un cuerpo celular pequeño que no está unido al sustrato (**Figura 16–87**). Con una micropipeta se pueden extraer fragmentos de este lamelipodio. Aunque es frecuente que estos fragmentos pierdan los microtúbulos y los orgánulos membranosos, pueden continuar arrastrándose como si fueran diminutos queratinocitos.

El comportamiento dinámico de los filamentos de actina puede estudiarse en los lamelipodios de los queratinocitos, marcando los pequeños parches de actina y examinando su

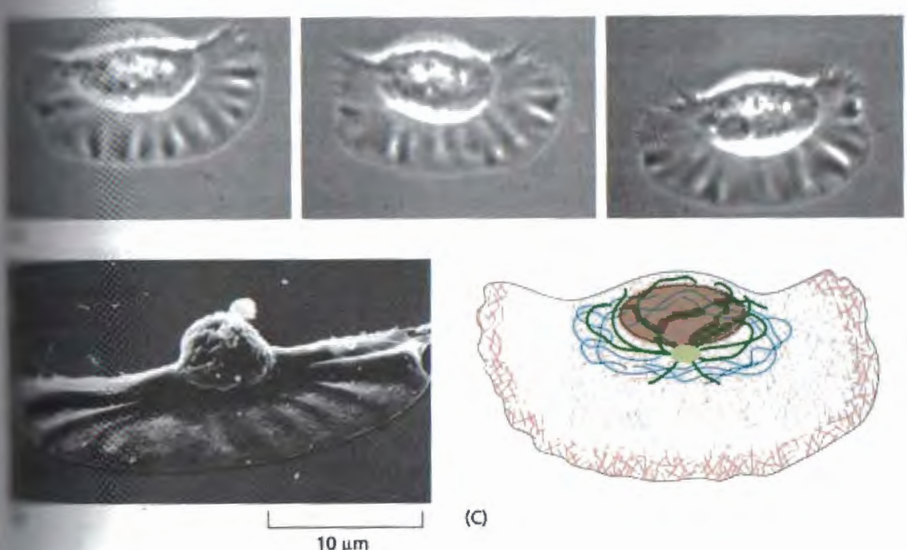


Figura 16–87 Células migratorias de la epidermis de los peces. <GTTA> (A) Micrografías obtenidas mediante un microscopio óptico de un queratinocito en cultivo, tomadas a intervalos de 15 segundos. La célula está migrando aproximadamente a 15 µm/segundo. (B) Queratinocito observado con el microscopio electrónico de barrido, mostrando su extenso y plano lamelipodio y su pequeño soma celular, que contiene el núcleo arrastrado sobre el sustrato. (C) Distribución de los filamentos del citoesqueleto en esta célula. Los filamentos de actina (*rojo*) llenan el gran lamelipodio y son los responsables del rápido movimiento de las células. Los microtúbulos (*verde*) y los filamentos intermedios (*azul*) están restringidos en la zona próxima al núcleo. (A y B por cortesía de Juliet Lee.)

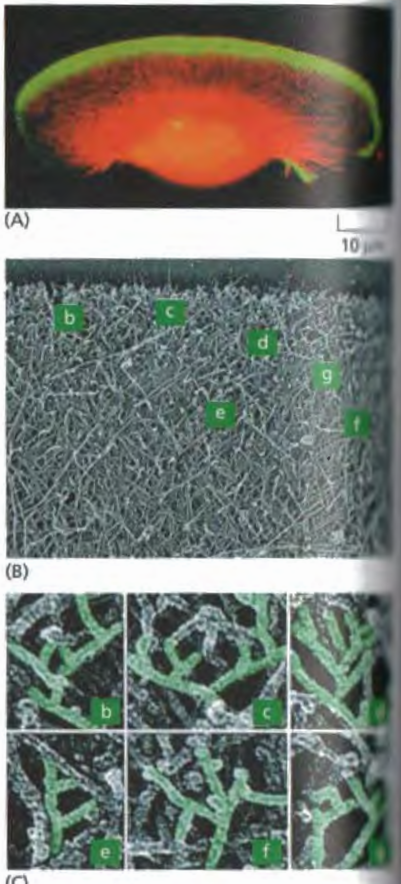


Figura 16–88 Nucleación de los filamentos de actina en el lamelipodio y formación de la red por el complejo ARP. (A) Queratinocito con filamentos de actina marcados en *rojo* con faloidina fluorescente y el complejo ARP marcado en *verde* con un anticuerpo contra uno de los componentes proteicos. Las regiones de superposición de los dos aparecen *amarillas*. El complejo ARP está muy concentrado cerca del frente del lamelipodio; en esta zona, la nucleación de actina es más activa. (B) Electromicrografía obtenida después del sombreado con platino de una réplica del frente de avance de un queratinocito, mostrando la densa red de filamentos de actina. Las marcas indican áreas aumentadas en C. (C) Imágenes a mayor aumento de las regiones de la red de actina del frente de avance mostradas en B. Se pueden observar muchos filamentos ramificados, formando el característico ángulo de 70° cuando el complejo ARP nuclea nuevos filamentos de actina hacia el exterior de un filamento preexistente (véase Figura 16–34). (De T. Svitkina y G. Borisy, *J. Cell Biol.* 145:1009-1026, 1999. Con la autorización de The Rockefeller University Press.)

aspecto. Este procedimiento revela que, mientras que el lamelipodio avanza, los filamentos de actina permanecen estacionarios con respecto al sustrato. Los filamentos de actina de la red están orientados con sus extremos más hacia adelante. Con frecuencia, el extremo menos se encuentra unido de forma lateral a los filamentos de actina mediante complejos ARP (véase Figura 16–34), lo cual facilita la formación de la red bidimensional (**Figura 16–88**). La red sufre un "recambio rotatorio", ensamblaje en el frente y desensamblaje en la parte posterior, que se parece al recambio rotatorio que se produce en los filamentos de actina y en los microtúbulos, del que hemos tratado anteriormente (véase Figura 16–14). El recambio rotatorio de una red dendrítica formada por el complejo ARP es una de las muchas maneras en que las células pueden usar los filamentos de actina dinámicos para dirigir la protuberancia del extremo de avance. Parece que algunas células de movimientos lentos, incluyendo a los fibroblastos, utilizan un mecanismo que no depende del complejo ARP, pero que sigue necesitando del ensamblaje y desensamblaje coordinado de los filamentos de actina, coordinado posiblemente por las forminas.

Se considera que para que el desplazamiento unidireccional de los lamelipodios se mantenga hace falta la cooperación y la integración mecánica de algunos factores. La nucleación de los filamentos se localiza en el frente de avance; en esta localización se produce el crecimiento de nuevos filamentos de actina y se proyecta hacia adelante la membrana plasmática. La mayor parte de la despolimerización se produce en lugares posteriores al frente de avance. Puesto que la *cofilina* (véase Figura 16–42) se une de forma cooperativa y preferencial a los filamentos de actina con ADP (forma D), los filamentos nuevos que adoptan la forma T, generados en el frente de avance, deberían presentar resistencia a la despolimerización por cofilina (**Figura 16–89**). Al aumentar la vida del filamento, se produce la hidrólisis del ATP, por lo que la cofilina desensambla de forma eficiente los filamentos más viejos. Así pues, el retraso de la hidrólisis del ATP puede constituir la base del mecanismo que mantiene un proceso de recambio rotatorio unidireccional y eficiente en el lamelipodio (**Figura 16–90**). Por último, parece que los filamentos de miosina II bipolar se asocian con los filamentos de actina de la red y los empujan hacia una nueva orientación, casi paralelos al frente de avance. Esta contracción impide la protuberancia y constriñe los extremos de los lamelipodios de forma que se mantienen en los laterales de la célula mientras ésta avanza (**Figura 16–91**).

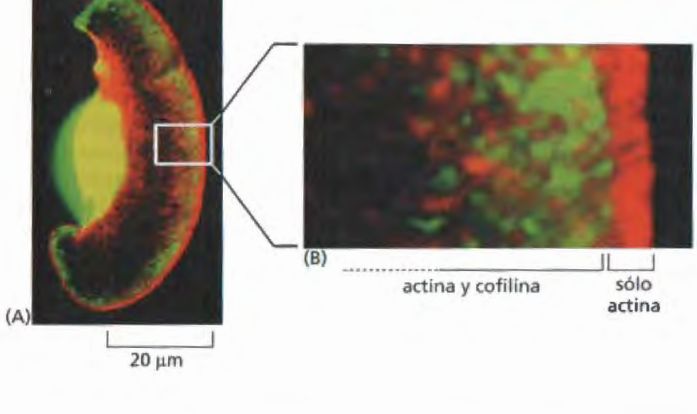


Figura 16–89 La cofilina en el lamelipodi
(A) Queratinocito con los filamentos de act
marcados en *rojo* por faloidina fluorescent
y la cofilina marcada en *verde* con un
anticuerpo fluorescente. Las regiones don
ambas se superponen se pueden observar
amarillo. Aunque la densa red de actina se
distribuye por todo el lamelipodio, la cofili
no se encuentra en el frente de avance.
(B) Imagen a mayor aumento de la región
señalada en A con un rectángulo *blanco*.
Los filamentos de actina cercanos al frente
de avance, que también son los que se han
formado más recientemente y los que
tienen actina-ATP (en lugar de actina-ADP)
por lo general no están asociados con
cofilina. (De T. Svitkina y G. Borisy,
J. Cell Biol. 145:1009-1026, 1999. Con la
autorización de The Rockefeller
University Press.)

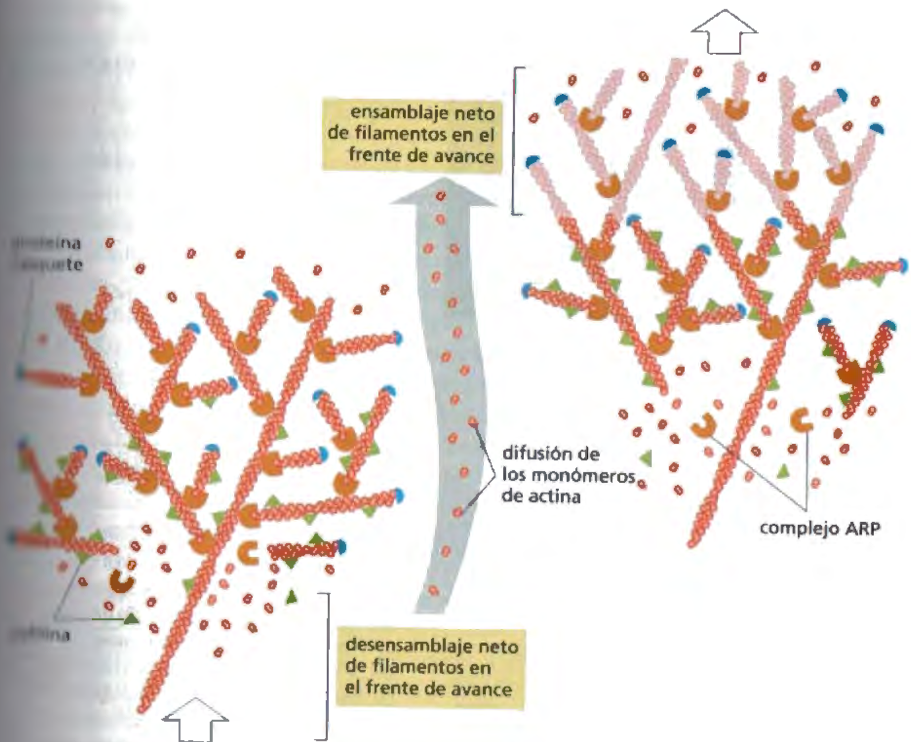


Figura 16–90 Modelo para la formación de una protuberancia de la red de actina en el frente de avance. Se ilustran dos momentos durante el avance de un lamelipodio, destacando en color más claro las estructuras ensambladas de nuevo. La nucleación está mediada por el complejo ARP del frente. Los filamentos de actina formados de nuevo se unen lateralmente a los filamentos preexistentes generalmente en un ángulo de 70°. Los filamentos se alargan, empujando a la membrana plasmática hacia delante, por algún tipo de anclaje del haz anterior. A una velocidad constante, los filamentos de los extremos más se encasquetan. Cuando los nuevos filamentos han hidrolizado su ATP, son más susceptibles a la despolimerización por cofilina. Este ciclo provoca una separación espacial entre el ensamblaje en el frente y el desensamblaje en la parte posterior; de manera que la red de actina se desplaza hacia adelante como un todo, aunque los filamentos se mantengan estacionarios respecto al sustrato.

La fuerza de empuje generada por la polimerización de una red ramificada de filamentos de actina tiene un papel importante en muchos procesos celulares. La polimerización en el extremo más puede empujar la membrana plasmática hacia fuera, como en el ejemplo que acabamos de describir (véase Figura 16–90), o puede impulsar a vesículas o partículas a través del citoplasma celular, como en el ejemplo de la bacteria *Listeria monocytogenes* descrito en el Capítulo 24 (véase Figura 24–37 <GTAT>). Además, cuando se anclan de forma más compleja en la membrana, este mismo tipo de fuerza dirige las invaginaciones de la membrana, como se produce durante los procesos de endocitosis y fagocitosis tratados en el Capítulo 13.

Es interesante comparar la organización de los lamelipodios ricos en actina con la organización del huso mitótico rico en microtúbulos. En ambos casos, la célula controla y amplifica el comportamiento dinámico intrínseco del sistema de filamentos del citoesqueleto generando grandes estructuras que determinan el comportamiento de la totalidad de la célula. Ambas estructuras proporcionan un recambio rápido de los filamentos que los constituyen, incluso cuando las estructuras permanecen intactas en un estado estacionario durante largos periodos de tiempo. La membrana plasmática del extremo de avance en el lamelipodio cumple un papel organizador análogo al de los cromosomas condensados en la organización y estimulación de la dinámica del huso mitótico. En ambos casos, las proteínas motoras ayudan a incrementar el flujo y el recambio de los filamentos del citoesqueleto en haces de gran tamaño.

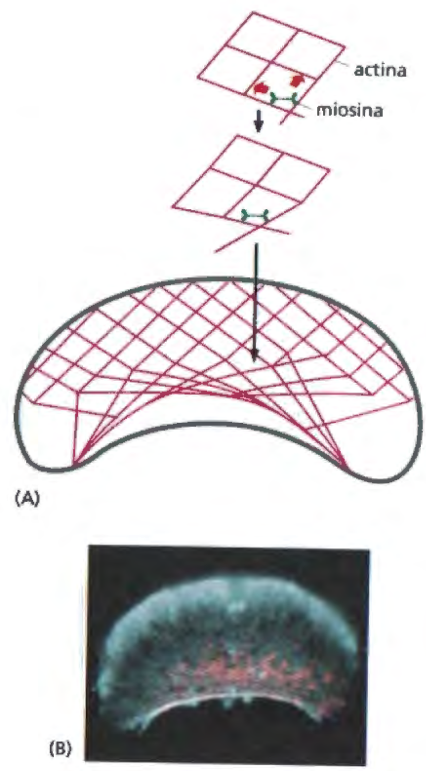
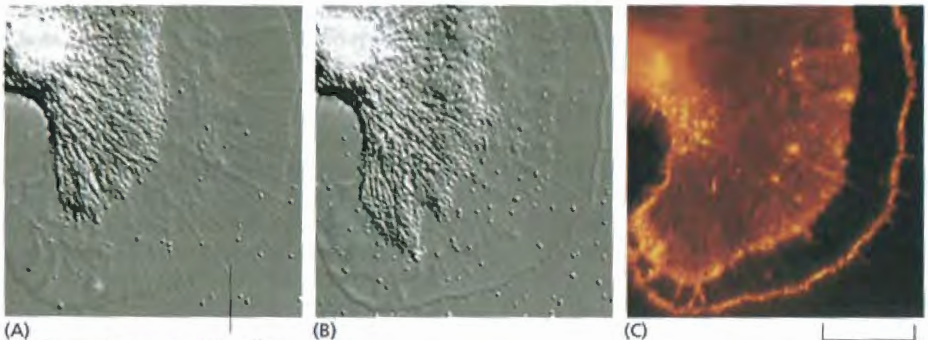


Figura 16–91 Contribución de la miosina II al movimiento celular polarizado. (A) Los filamentos bipolares de miosina II se unen a los filamentos de actina en la malla de lamelipodios dendrítica y provocan la contracción de la red. La reorientación dirigida por la miosina de los filamentos de actina en la malla dendrítica forma un haz de actina que atrae más miosina II y contribuye a generar las fuerzas contráctiles necesarias para la retracción del extremo posterior de la célula en movimiento. (B) Se pueden aislar los fragmentos de un gran lamelipodio de un queratinocito del soma celular principal, ya sea por cirugía con una micropipeta o tratando a la célula con fármacos. Muchos de estos fragmentos continúan moviéndose rápidamente, con la misma organización del citoesqueleto que en el queratinocito intacto. La actina (*azul*) forma una malla que sobresale en el frente del fragmento. La miosina II (*rosa*) se encuentra en forma de banda, detrás. (De A. Verkovsky et al., *Curr. Biol.* 9:11-20, 1999. Con la autorización de Elsevier.)



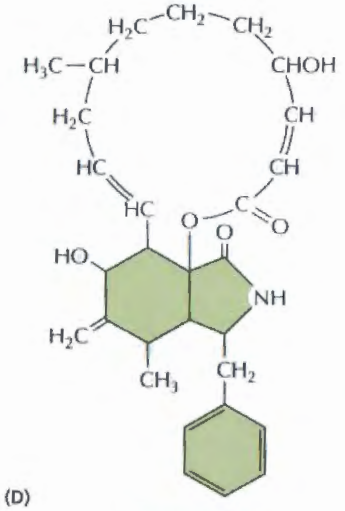

(D)
citocalasina B

Figura 16-92 Movimiento de la parte posterior de la red de actina de un cono en crecimiento en un lamelipodio. (A) Se ha cultivado un cono en crecimiento de una neurona del alga de mar *Aplysia* sobre un sustrato altamente adhesivo y se ha observado mediante microscopía de contraste diferencial interferencial. Los microtúbulos y los orgánulos membranosos se encuentran en el área posterior, brillante, del cono en crecimiento (*izquierda*), mientras que la red de filamentos de actina está en el lamelipodio (*derecha*). (B) Tras un corto tratamiento con citocalasina que se une a los extremos más de los filamentos de actina (véase Tabla 16-2, p. 988), la red de actina se separa del frente de avance y la célula es empujada hacia atrás. (C) En el momento mostrado en B, la célula ha sido fijada y marcada con faloidina ligada a rodamina para mostrar la distribución de los filamentos de actina. Puede observarse que en el frente de avance existen algunos filamentos de actina, mientras que en la región de detrás del extremo en avance del cono en crecimiento tratado con citocalasina está por completo desprovista de ellos. Obsérvese la banda puntiaguda del movimiento retrógrado de la red de actina. (D) La compleja estructura química de la citocalasina B. (A-C, por cortesía de Paul Forscher.)

La adhesión celular y la tracción permiten avanzar a las células

Parece que los lamelipodios de todas las células comparten una organización básica, simple y dinámica, en la que el ensamblaje de los filamentos de actina se produce sobre todo en el extremo en avance y el desensamblaje en el extremo posterior. Sin embargo, las interacciones entre la célula y su entorno físico normal hacen que la situación sea considerablemente más compleja que la de los queratinocitos de peces arrastrándose por la superficie del medio de cultivo. Un aspecto muy importante de la locomoción es la íntima relación entre el citoesqueleto y el aparato de adhesión celular. Aunque para que se produzca cualquier tipo de arrastre es necesario un cierto grado de adhesión al sustrato, parece que las velocidades de adhesión y de locomoción están relacionadas de forma inversa, de manera que las células muy adhesivas se desplazan más lentamente que las células con adhesión débil. Los queratinocitos de peces están poco unidos al sustrato de manera que la fuerza de la polimerización de actina empuja el frente de avance de manera muy rápida. Por el contrario, cuando las neuronas del alga marina *Aplysia* se cultivan en un sustrato, forman grandes lamelipodios que se adhieren demasiado como para permitir el avance. En estos lamelipodios continúa funcionando el mismo ciclo de nucleación localizada de nuevos filamentos de actina, despolimerización de los filamentos viejos y contracción dependiente de miosina. Sin embargo, puesto que el frente de avance tiene un impedimento físico para desplazarse, es la red entera de actina la que retrocede hacia el cuerpo celular, empujada por miosinas (**Figura 16-92**). Por lo general, el grado de adhesión de la mayoría de las células se encuentra entre estos dos extremos, y la mayoría de lamelipodios presentan algún tipo de combinación de protuberancias de filamentos de actina en avance (como los queratinocitos) o flujos reversos de actina (como las neuronas de *Aplysia*).

Como los lamelipodios, los filopodios o los pseudópodos se desplazan sobre un sustrato y pueden generar nuevos lugares de unión en el frente de avance que permanecen estacionarios hasta que la célula se desplaza, manteniéndose incluso hasta que el extremo



Figura 16-93 Lamelipodios y microespinas del extremo anterior de un fibroblasto humano en cultivo que está migrando. La *flecha* en esta electromicrografía de barrido indica la dirección que sigue el desplazamiento de la célula. A medida que la célula avanza, los lamelipodios pierden su unión al sustrato y se enrollan sobre la superficie dorsal: un movimiento conocido como "rizado". (Por cortesía de Julian Heath.)

posterior se fija a ellos. Cuando los lamelipodios dejan de estar adheridos al sustrato, se sitúan en la superficie dorsal de la célula y son transportados hacia atrás como un "rizo" (Figura 16–93).

Los lugares de adhesión establecidos en el frente de avance actúan de puntos de anclaje que permiten a las células generar tracción con el sustrato y empujar el cuerpo celular hacia adelante. Parece que las fuerzas de tracción se generan mediante proteínas motoras tipo miosina, en especial miosina II. En muchas células en movimiento, la miosina II está muy concentrada en la parte posterior de la célula donde puede contribuir a empujar el cuerpo celular hacia adelante, igual que la pasta de dientes saliendo del tubo de dentífrico (**Figura 16–94**; véase también Figura 16–91). La ameba *Dictyostelium* que no tiene miosina II es capaz de emitir pseudópodos a velocidades normales, pero la translocación de su cuerpo celular es mucho más lenta que en las amebas normales, lo cual indica la importancia de la contracción de la miosina II en esta parte del ciclo del movimiento. Además de contribuir a empujar el cuerpo de la célula hacia adelante, la contracción del córtex rico en actina en la parte posterior de la célula también puede debilitar selectivamente las interacciones adhesivas más viejas que mantienen unida la parte posterior. La miosina II puede transportar componentes del cuerpo celular hacia adelante sobre un haz de filamentos de actina polarizados.

Las fuerzas de tracción generadas por las células móviles realizan un empuje significativo sobre el sustrato (**Figura 16–95**). En un animal vivo, la mayoría de las células se arrastran sobre un sustrato semiflexible fabricado de matriz extracelular, que puede ser deformado y reorganizado por estas fuerzas celulares. En cultivo, el desplazamiento de los fibroblastos a través de un gel de fibras de colágeno, alinea el colágeno, generando una matriz extracelular organizada que a su vez afecta la forma y el sentido del desplazamiento de los fibroblastos en su interior (**Figura 16–96**). Por el contrario, la tensión mecánica o el estiramiento aplicados de forma externa a la célula provocarán el ensamblaje de fibras de estrés y adhesiones focales, haciendo que sea más contráctil. Aunque todavía no se comprende completamente, esta doble interacción mecánica entre las células y su entorno físico puede ser la forma primitiva en que se organizan los tejidos de los vertebrados.

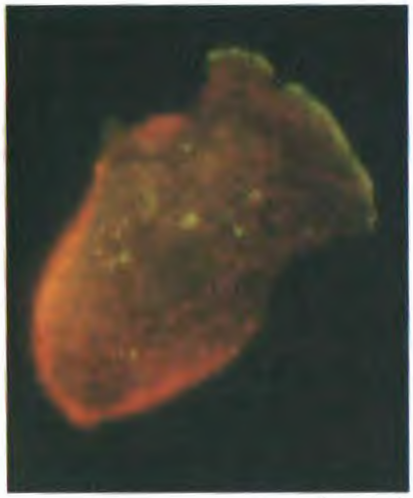


Figura 16–94 Localización de miosina I y miosina II durante el desplazamiento de la ameba *Dictyostelium*. En el momento de fijar esta célula, se estaba arrastrando hacia la parte superior derecha de la imagen. Se ha marcado con anticuerpos específicos contra las dos isoformas de miosina. La miosina I (*verde*) está restringida principalmente en el frente de avance del pseudópodo, en el frente celular. En cambio, la miosina II (*rojo*) es más elevada en el córtex posterior rico en actina. La contracción del córtex en la parte posterior de la célula mediada por la miosina II puede ayudar a empujar el cuerpo celular hacia adelante. (Cortesía de Yoshio Fukui).

Los miembros de la familia de proteínas Rho inducen reorganizaciones importantes del citoesqueleto de actina

La migración celular es un ejemplo de un proceso que necesita comunicación y coordinación de larga distancia entre los dos extremos celulares. Durante la migración dirigida es importante que el frente de avance de la célula sea estructural y funcionalmente distinto que el extremo posterior. Además de dirigir los procesos mecánicos locales como las protuberancias en el frente de avance y las retracciones en el extremo posterior, el citoesqueleto es el responsable de coordinar la forma celular, la organización y las propiedades mecánicas, desde un extremo al otro de la célula, una distancia que es típicamente de decenas de micras para las células animales. En muchos casos, incluidos aunque no limitados a la migración celular, las grandes coordinaciones del citoesqueleto permiten establecer la polaridad celular,



Figura 16–95 Las células adhesivas ejercen fuerzas de tracción sobre el sustrato. Estos fibroblastos han sido cultivados sobre una lámina muy fina de silicona. La adhesión seguida de la contracción del citoesqueleto ha provocado la formación de arrugas en el sustrato. (De A.K. Harris, P. Wild y D. Stopak, *Science* 208:177-179, 1980. Con la autorización de AAAS.)



Figura 16–96 Forma de la matriz extracelular durante el empuje celular. Esta micrografía muestra una región situada entre dos zonas del corazón embrionario del pollo (explantes de tejido ricos en fibroblastos y células musculares cardíacas) que crecieron en cultivo en un gel de colágeno durante 4 días. Entre ambos explantes se ha formado un conjunto de fibras densas de colágeno alineadas, resultado del desplazamiento de los fibroblastos por la matriz. (De D. Stopak y A.K. Harris, *Dev. Biol.* 90:383-398, 1982. Con la autorización de Academic Press.)

según la cual una célula construye estructuras diferentes con componentes moleculares distintos en el frente respecto al extremo posterior o en la parte apical respecto a la parte basal. El movimiento celular necesita una polarización inicial de la célula en un sentido determinado. El control de la polarización celular también es necesario para las divisiones celulares orientadas en los tejidos y para la formación de una estructura multicelular organizada y coherente. Estudios genéticos en levaduras, moscas y gusanos han proporcionado la mayor parte de la información de que se dispone actualmente sobre las bases moleculares de la polaridad celular. Los mecanismos que generan la polaridad celular en los vertebrados están siendo ahora explorados. Sin embargo, en todos los casos conocidos, el citoesqueleto desempeña un papel central y la mayoría de los componentes moleculares se han conservados a lo largo de la evolución.

Para el citoesqueleto de actina, diversos receptores de la superficie celular provocan reorganizaciones estructurales globales en respuesta a señales externas. Pero parece que estas señales convergen en el interior de la célula en un grupo de GTPasas íntimamente relacionadas que pertenecen a la **familia de proteínas Rho:** *Cdc42, Rac* y *Rho*. Parece que esta misma familia de Rho también está implicada en el establecimiento de la mayoría de tipos de polaridad celular.

Al igual que otros miembros de la superfamilia de Ras, estas proteínas Rho actúan como interruptores moleculares que controlan los procesos celulares ciclando entre un estado activo unido a GTP a un estado inactivo unido a GDP (véase Figura 3–71). La activación de Cdc42 en la membrana plasmática comporta la polimerización de la actina y su ensamblaje formando filopodios o protuberancias celulares cortas llamadas microespinas. La activación de Rac induce la polimerización de la actina en la periferia celular e implica la formación de extensiones de lamelipodios en forma de sábana y rizos de membrana, que son protuberancias ricas en actina en la superficie dorsal de la célula (véase Figura 16–93). La activación de

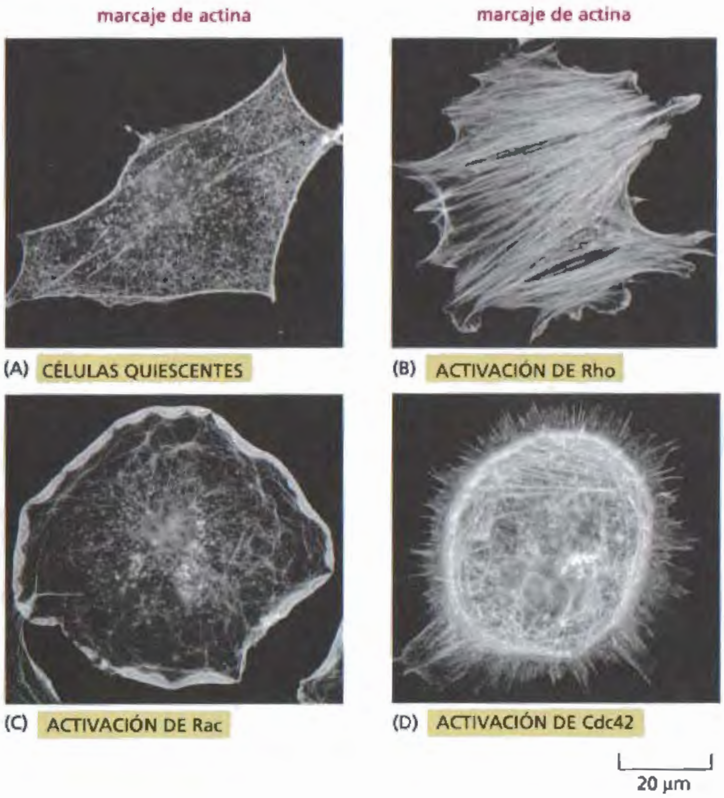


Figura 16–97 Efectos drásticos de Rac, **Rho y Cdc42 sobre la organización de** la actina **en fibroblastos.** En todos los casos, los filamentos de actina han sido marcados con faloidina fluorescente. (A) Fibroblastos en ausencia de suero, que presentan filamentos de actina sobre todo en el córtex y relativamente pocas fibras de estrés. (B) La microinyección de una proteína Rho, constitutivamente activada, provoca un ensamblaje rápido de muchas fibras de estrés. (C) La microinyección de una proteína Rac activada constitutivamente, muy relacionada con la GTPasa monomérica, provoca la formación de un lamelipodio enorme que se extiende por toda la circunferencia de la célula. (D) En cambio, la microinyección de una proteína Cdc42, otro miembro de la familia de Rho, provoca la protuberancia de muchos filopodios largos en la periferia celular. Los diferentes efectos globales de las tres GTPasas sobre la organización del citoesqueleto de actina están mediados por la acción de docenas de otras moléculas proteicas reguladas por estas GTPasas. Muchas de estas proteínas diana incluyen algunas de las diversas proteínas asociadas a la actina descritas en este capítulo. (De A. Hall, *Science* 279:509-514, 1998. Con la autorización de AAAS.)

Rho induce el ensamblaje de fibras de actina y de filamentos de miosina II en las fibras de estrés y la clusterización de las integrinas y de proteínas asociadas formando los contactos focales (**Figura 16–97**). Estos cambios estructurales dramáticos y complejos se suceden debido a que cada uno de estos tres interruptores moleculares tiene numerosas proteínas diana que afectan la dinámica y la organización de la actina.

Algunas dianas clave de Cdc42 activado son miembros de la familia de proteínas WASp. Pacientes humanos deficientes en WASp sufren el síndrome de Wiskott-Aldrich, una inmunodeficiencia grave en la que las células del sistema inmune tienen un movimiento anormal dependiente de actina y las plaquetas no pueden formarse de forma adecuada. Aunque WASp sólo se expresa en las células de la sangre y del sistema inmune, otros miembros de la familia tienen una expresión más ubicua que permite a Cdc42 activado incrementar la polimerización de actina. Las **proteínas WASp** pueden existir en una conformación plegada inactiva y una conformación abierta activa. La asociación de GTP a Cdc42 estabiliza la forma abierta de WASp, permitiéndole su unión al complejo ARP y aumentando considerablemente la actividad nucleadora de actina de este complejo (véase Figura 16–34). De esta forma, la activación de Cdc42 aumenta la nucleación de actina.

Rac-GTP también activa a los miembros de la familia de WASp y así induce la actividad de unión de la proteína formadora de geles filamina, inhibe la actividad contráctil de la proteína motora miosina II, estabiliza los lamelipodios e inhibe la formación de las fibras de estrés contráctiles (**Figura 16–98**A).

La proteína Rho-GTP tiene un conjunto muy diverso de dianas. En vez de activar al complejo ARP para formar redes de actina, Rho-GTP puede activar las forminas para construir haces paralelos de actina. Al mismo tiempo, Rho-GTP activa una proteína quinasa que indirectamente inhibe la actividad de cofilina, conduciendo a la estabilización de los filamentos de actina. La misma proteína quinasa inhibe una fosfatasa que actúa sobre las cadenas ligeras de miosina (véase Figura 16–72). El consiguiente incremento de la cantidad neta de fosforilación de la cadena ligera de miosina aumenta la cantidad de miosina contráctil e induce la formación de estructuras dependientes de tensión tales como las fibras de estrés (Figura 16–98B).

En algunos tipos celulares, Rac-GTP activa Rho, habitualmente con una cinética mucho más lenta que la activación del complejo ARP por Rac. Esto le permite a la célula utilizar la vía de Rac para construir nuevas estructuras de actina que activa de forma secuencial la vía de Rho induciendo contractibilidad que permite incrementar la tensión en esta estructura. Este proceso se produce, por ejemplo, durante la formación y maduración de los contactos célula-célula. Como exploraremos con más detalle más adelante, la comunicación entre las vías de Rac y de Rho también facilita el mantenimiento de las grandes diferencias que existen entre el frente celular y el extremo posterior de la célula durante la migración.

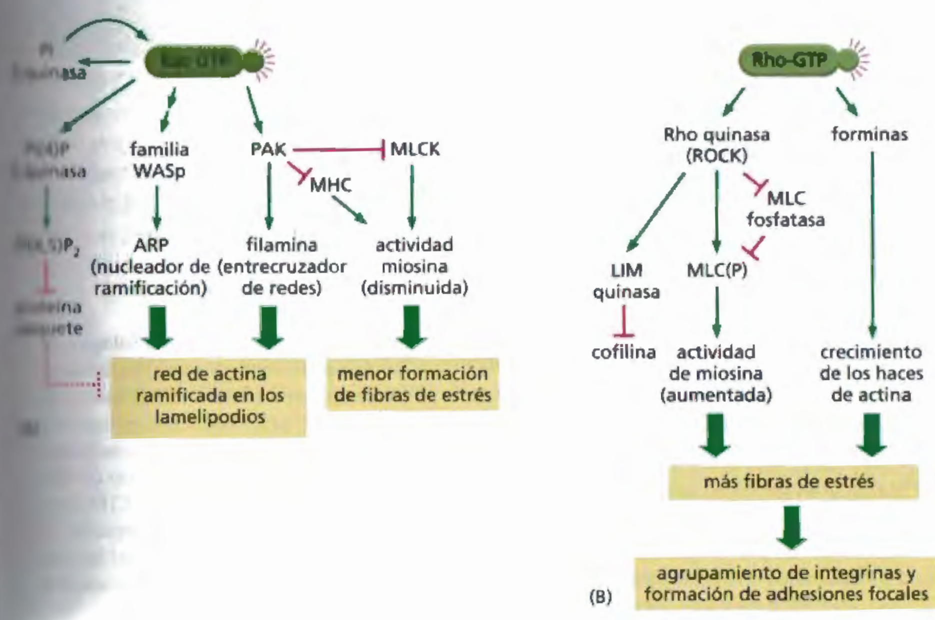


Figura 16–98 Los efectos contradictorios de la activación de Rac y Rho en la organización de actina. (A) La activación de la pequeña GTPasa Rac comporta la nucleación de actina por el complejo ARP y otras alteraciones en proteínas accesorias de la actina que favorecen la formación de redes de actina, como los lamelipodios. Otras vías diferentes contribuyen de manera independiente. Rac-GTP activa miembros de la familia de proteínas WASp, que a su vez activan la nucleación de actina y la formación de redes ramificadas por el complejo ARP. En una vía paralela, Rac-GTP activa una proteína quinasa, PAK, que tiene distintas dianas que incluyen la proteína entrecruzadora y formadora de redes filamina, que se activa mediante fosforilación, y la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), que se inhibe mediante fosforilación. La disminución en la fosforilación de la cadena ligera reguladora de la miosina comporta el desensamblaje del filamento de miosina II y una disminución de la actividad contráctil. En algunas células, PAK inhibe también de forma directa la actividad de la miosina II mediante fosforilación de la cadena pesada de la miosina (MHC). Otro conjunto de vías por debajo de la activación de Rac están mediadas por señales lipídicas tipo fosfatidilinositol. La formación local de PIP_2 [$PI(4,5)P_2$] contribuye a la reducción de la actividad de la proteína formadora de casquetes y ayuda a la polimerización de actina. La activación de la PI 3-quinasa que produce PIP_3 a partir de PIP_2 implica una posterior activación del propio Rac; este fenómeno genera un ciclo de retroalimentación positivo.
(B) La activación de la GTPasa relacionada Rho supone la nucleación de los filamentos de actina mediados por las forminas y aumenta la contracción por miosina II, promoviendo la formación de haces contráctiles de actina tales como las fibras de estrés. La activación de la miosina II mediada por Rho necesita una proteína quinasa dependiente de Rho, llamada Rock. Esta quinasa inhibe a la fosfatasa que libera los grupos fosfato activados de las cadenas ligeras de la miosina II (MLC); puede fosforilar directamente a las cadenas ligeras de miosina en algunos tipos celulares. Rock también activa a otras proteínas quinasa como por ejemplo la LIM quinasa, que a su vez contribuye a la formación de los haces estables de actina contráctil mediante inhibición de la cofilina, el factor despolimerizador de actina. Para formar el anillo contráctil necesario durante la citocinesis es importante una vía de señalización similar (véase Figura 17–52).

Algunas señales extracelulares pueden activar a los tres miembros de la familia de proteínas Rho

La activación de las GTPasas monoméricas Rho, Rac y Cdc42 se produce por un intercambio entre un GTP y una molécula de GDP fuertemente unida, catalizado por un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF: *guanidine exchange factor*). De los 85 GEF identificados en el genoma humano algunos son específicos para un miembro concreto de la familia de Rho, mientras que parece que otros actúan sobre los tres miembros de la familia. El número de GEF supera al número de GTPasas de Rho puesto que algunos GEF están restringidos a tejidos específicos, incluso tienen localizaciones subcelulares concretas, y son sensibles a distintos tipos de señales reguladoras. Diversos receptores de la superficie celular activan a los GEF. Un ejemplo es el receptor tirosina quinasa de Eph implicado en el crecimiento neural que se describe con detalle en el Capítulo 15. Sorprendentemente, algunos miembros de la familia de GEF de Rho se asocian con los extremos de los microtúbulos en crecimiento uniéndose a uno de los +TIP. Esto proporciona una conexión entre la dinámica del citoesqueleto de microtúbulos y la gran organización del citoesqueleto de actina, importante para la integración total de la forma y el movimiento celular.

Las GTPasas de la familia de Rho también son los determinantes primarios de la polaridad celular en la levadura. Los análisis en este campo han aumentado nuestra comprensión de los mecanismos generales implicados. Durante los periodos de falta de alimento, las levaduras, igual que muchos otros organismos unicelulares, producen esporas. Sin embargo la esporulación puede producirse sólo en las células de levadura diploides mientras que la proliferación es exclusiva de los organismos haploides. Un individuo haploide tiene que localizar a una pareja de apareamiento opuesto y aparearse con él antes de la esporulación. Las células de levadura son incapaces de nadar y tampoco llegan a sus parejas mediante crecimiento polarizado. La forma haploide de la levadura dispone de dos tipos de apareamiento, **a** y α, que secretan factores de apareamiento conocidos como factor **a** y factor α respectivamente. Estas moléculas señalizadoras se unen a receptores de la superficie celular que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (descritos en el Capítulo 15). Una consecuencia de la unión del factor α a su receptor es la polarización de la célula receptora que adopta una forma que se conoce como "shmoo" (**Figura 16–99**). En presencia de un gradiente de factor α, el extremo **a** de la célula shmoo se dirige hacia la concentración más alta de la molécula señalizadora y esto, bajo circunstancias normales, la conducirá hacia una amorosa célula α situada en un lugar próximo.

Este crecimiento celular polarizado requiere una alineación del citoesqueleto de actina como respuesta a la señal del factor de apareamiento. Cuando la señal se une a su receptor, el receptor activa a Cdc42, que a su vez induce el ensamblaje de los filamentos de actina en un lugar próximo a la fuente de la señal. La activación local de Cdc42 se incrementa después mediante un anillo de retroalimentación positivo, que necesita de un transporte dependiente de actina para Cdc42 y para sus GEF, a lo largo de las estructuras de actina ensambladas de nuevo hacia los lugares de la señal. Por consiguiente, los cables de actina se ensamblan apuntando hacia el lugar de acumulación de Cdc42 debido a la activación de otro miembro de la familia de Rho que a su vez estimula a la formina de la levadura. Los cables de actina actúan de vías para el transporte dirigido y la exocitosis del material de pared de la nueva célula, induciendo el crecimiento polarizado del extremo denominado shmoo (**Figura 16–100**).

Las células de levadura haploides utilizan la misma maquinaria de polarización durante el crecimiento vegetativo. Para formar la yema que crecerá hasta convertirse en una célula hija, la levadura tiene que dirigir su membrana plasmática de nueva síntesis y el material para la pared celular hasta una localización concreta. Igual que en la formación de shmoo, este proceso requiere un citoesqueleto con una determinada polaridad y con la mayoría de parches de actina en la yema en crecimiento y los cables de actina orientados a lo largo del eje de la yema. En las células haploides, se construye un nuevo lugar de gemación siempre adyacente al lugar de gemación previo. En este caso, las orientaciones espaciales que establecen la polaridad del citoesqueleto son intrínsecas a la célula, dejada previamente por otras rondas de división celular. Cdc42 está de nuevo implicado en la transducción de la señal desde el sitio de gemación hasta el citoesqueleto y la mayoría de proteínas implicadas en las vías, tanto por arriba como por abajo, se han identificado mediante experimentos genéticos. Después de su identificación en las levaduras, se ban encontrado homólogos de la mayoría de ellas en otros organismos, donde a menudo están implicados en el establecimiento de la polaridad celular.

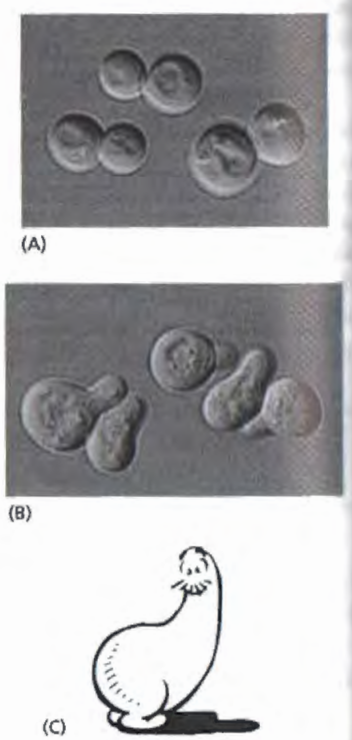


Figura 16–99 Polarización morfológica de las células de levadura como respuesta al factor de apareamiento. (A) Normalmente las células de *Saccharomyces cerevisiae* son esféricas. (B) Se polarizan cuando se tratan con un factor de apareamiento. Las células polarizadas se llaman "shmoos". (C) El Shmoo original, famoso personaje de cómic de Al Capp. (A y B, cortesía de Michael Synder; C, © 1948 Capp Enterprises, Inc., usado bajo autorización.)

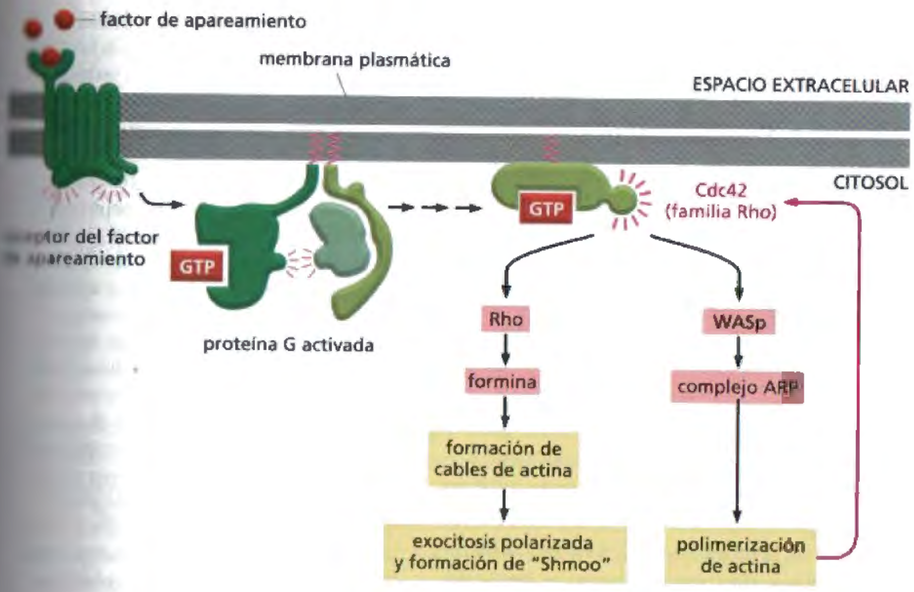


Figura 16–100 Vía de señalización del factor de respuesta de apareamiento en la levadura. El factor de apareamiento extracelular se une a un receptor ligado a proteína G en la membrana plasmática. La activación del receptor comporta la disociación de la subunidad Gα-unida a GTP de la proteína G heterotrimérica (tratado en el Capítulo 15). Este hecho, a su vez, activa la proteína Cdc42 de la familia de proteínas unidas a GTP Rho. Como en las células de mamífero, Cdc42 activa una proteína WASp que activa el complejo ARP, que permite la nucleación local de actina en el lugar de unión del factor de apareamiento. La nucleación local de actina y el crecimiento del filamento generan un ciclo de retroalimentación positiva en el cual la actividad de Cdc42 aumenta de forma progresiva. Esto implica la activación de Rho y formina y finalmente la formación de cables de actina, un crecimiento polarizado y, la adquisición, de la forma shmoo. Además, la activación del receptor comporta otras respuestas a través de la cascada de MAP-quinasas (descrito en el Capítulo 15), preparando a la célula haploide para el apareamiento (no se muestra).

Señales externas pueden dictar la dirección de la migración celular

La *quimiotaxis* se define como un desplazamiento celular en un sentido, controlado por un gradiente de una sustancia química que difunde. Este es un caso particularmente interesante en el que diferentes señales externas activan las proteínas de la familia de Rho para establecer una gran polaridad celular que va a influenciar la organización del sistema necesario para la motilidad celular. Un ejemplo muy bien estudiado es el desplazamiento quimiotáctico de un tipo de células sanguíneas, llamadas *neutrófilos*, hacia una fuente de infección bacteriana. Unas proteínas receptoras situadas en su superficie permite a los neutrófilos detectar concentraciones muy bajas de péptidos *N*-formilados, derivados de las proteínas bacterianas (sólo los procariotas empiezan la síntesis proteica con una *N*-formilmetionina). Usando estos receptores, los neutrófilos son guiados hacia las dianas bacterianas gracias a su capacidad para detectar diferencias de concentraciones de sólo un 1% de estos péptidos difundidos, entre un lado de la célula y el otro (**Figura 16–101**).

Tanto en este caso como en el similar de la quimiotaxis de la ameba *Dictyostelium* hacia una fuente de AMP cíclico, se produce una polimerización local de actina cerca de los receptores a los que se ha unido su ligando. Esta polimerización de actina depende de GTPasas de la familia Rho, que ya hemos descrito. Como en la levadura "shmoo" (véase Figura 16–99), la célula responde extendiendo una protuberancia hacia la señal. Para las células quimiotácticas, la unión del ligando a su receptor acoplado a una proteína G activa la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K: *phosphatidilinositol 3 kinase*), que genera una moléculas señalizadora de base lipídica ($PI(3,4,5)P_3$), que a su vez activa la GTPasa de Rac. Entonces Rac activa el complejo ARP y se produce la formación de lamelipodios (véase Figura 16–98). A través de un mecanismo desconocido, la acumulación de una red de actina polarizada en el frente de avance puede provocar un incremento de la actividad de PI3K produciéndose un anillo de retroalimentación positivo que comporta la formación de más protuberancias. El $PI(3,4,5)P_3$ que activa Rac no puede difundir muy lejos de su lugar de síntesis puesto que es transformado con rapidez en PIP_2 por una fosfatasa de lípidos constitutivamente activa. Al mismo

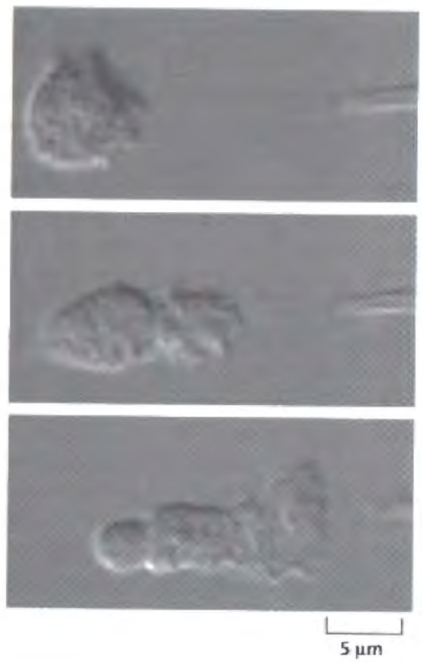


Figura 16–101 Polarización y quimiotaxis de los neutrófilos. <GTCG><TGTA> El extremo de la pipeta, a la derecha de la imagen, está liberando una pequeña cantidad del péptido formil-Met-Leu-Phe. Sólo las proteínas bacterianas presentan residuos de metionina formilados, de forma que los neutrófilos humanos reconocen estos péptidos como el producto de un invasor (se describe en el Capítulo 24). El neutrófilo extiende rápidamente un nuevo lamelipodio hacia la fuente de péptido (*superior*). Entonces extiende este lamelipodio y polariza su citoesqueleto de forma que la miosina II contráctil se localiza en la parte posterior, en sentido opuesto al lugar del lamelipodio (*medio*). Por último, la célula se arrastra hacia la fuente de este péptido (*inferior*). Si en lugar de la pipeta, la fuente del péptido fuese una bacteria real, el neutrófilo la fagocitaría y la destruiría (véase también la Figura 16-4). (De O.D. Weiner et al., *Nat. Cell Biol.* 1:75-81, 1999. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

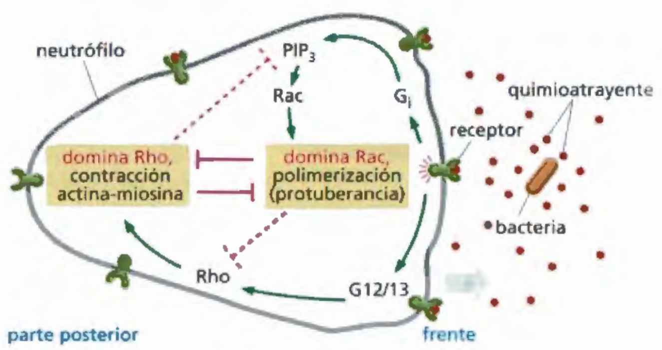


Figura 16–102 Señalización durante la polarización de un neutrófilo. Las bacterias que invaden el cuerpo humano secretan moléculas que son reconocidas como ajenas por el sistema inmune, incluyendo a los neutrófilos. La unión de las moléculas bacterianas a un receptor acoplado a proteína G en la superficie del neutrófilo estimula un movimiento dirigido. Estos receptores se han encontrado por toda la superficie celular, pero la unión al ligando bacteriano se produce más fácilmente en el frente. Dos vías de señalización distintas contribuyen a la polarización celular. En el frente de la célula, cerca de la fuente de la señal bacteriana, la estimulación de la vía de Rac comporta, mediante la acción de una proteína G trimérica, Gi, el crecimiento de redes protuberantes de actina. Algunos segundos mensajeros de esta vía son de vida media corta, de forma que la protuberancia está limitada a la región celular próxima al estímulo. El mismo receptor estimula también una segunda vía señalizadora, a través de las proteínas G triméricas G12 y G13 (señaladas como G12/13), que conduce a la activación de Rho. Las dos vías se excluyen mutuamente. Puesto que la protuberancia dependiente de Rac es activa en el frente celular, Rho se activa sólo en la parte posterior, estimulando la contracción del extremo posterior celular y favoreciendo el movimiento dirigido. Para un ejemplo real de la eficiencia de este sistema de señalización, véase Figura 16–4.

tiempo, la unión del ligando quimiotáctico a su receptor activa otra vía señalizadora que implica a Rho e incrementa la contractibilidad basada en actina. Los dos procesos se inhiben mutuamente y el resultado es que la activación de Rac domina en el frente de la célula mientras que la activación de Rho domina en la parte posterior (**Figura 16–102**). Este mecanismo permite a la célula mantener su polaridad funcional con protuberancias en el frente de avance y contracciones en la parte posterior.

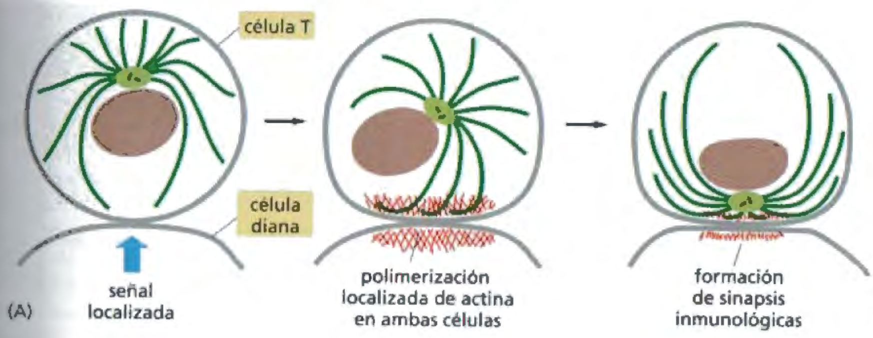
La dirección de la migración celular también puede estar influenciada por sustancias químicas no difusibles unidas a la matriz extracelular o a la superficie de las células. La activación de receptores por estas señales puede provocar, además de una polimerización dirigida de actina, un incremento de la adhesión celular. La mayoría de los desplazamientos largos de las células animales, incluyendo la migración de las células de la cresta neural y los movimientos de los conos neuronales, dependen de una combinación de señales difusibles y no difusibles, que transportan a las células móviles o a los conos en crecimiento hacia los lugares apropiados de destino (véase Figura 15–62).

La comunicación entre el citoesqueleto de microtúbulos y el de actina coordina la polarización y el movimiento de las células

Para colaborar en la organización de un desplazamiento persistente en una dirección determinada, las células utilizan sus microtúbulos junto con sus filamentos de actina. En muchas células móviles, la posición del centrosoma está influida por la localización de la polimerización protuberante de actina, que se encuentra en la parte posterior del núcleo. El mecanismo de reorientación del centrosoma no está claro, aunque existen evidencias de que Cdc42 podría estar implicado. Se cree que la activación de receptores en un extremo de la célula podría no sólo estimular allí la polimerización de actina (y por tanto la protuberancia local) sino también activar de forma local a las proteínas motoras tipo dineína que desplazarían el centrosoma empujando los microtúbulos. Algunas proteínas efectoras por debajo de Rac y Rho modulan de forma directa la dinámica de los microtúbulos. Por ejemplo, una proteína quinasa activada por Rac puede fosforilar y, por tanto, inhibir, la proteína de unión a tubulina, estatmina (véase Panel 16–3, pp. 994-995), desestabilizando los microtúbulos; en cambio, la activación de Rho podría estabilizarlos.

A su vez, la dinámica de los microtúbulos influencia las reorganizaciones de actina. El centrosoma nuclea un gran número de microtúbulos dinámicos y su cambio de posición indica que muchos tienen sus extremos más extendiéndose desde el centrosoma hacia la región protuberante de la célula. Los extremos más muy dinámicos indirectamente pueden modular una adhesión local y activar las GTPasas de tipo Rac que activarán la polimerización de actina en la región protuberante mediante la transferencia de Rac-GEF que se unen a los +TIP viajando en los extremos de los microtúbulos en crecimiento. El aumento de la concentración de los microtúbulos favorecería posteriores protuberancias, creando una retroalimentación positiva que permitiría mantener el desplazamiento en el mismo sentido durante un periodo prolongado. Además de este mecanismo, la orientación del centrosoma parece reforzar la información de la polaridad que el citoesqueleto de actina recibe del mundo exterior y posibilita una respuesta sensible a señales débiles.

Un mecanismo cooperativo parecido a éste actúa en muchos otros casos de polarización celular. Un ejemplo en particular interesante es la muerte de células diana determinada por los linfocitos T. Estas células son un componente crítico de la respuesta adaptativa



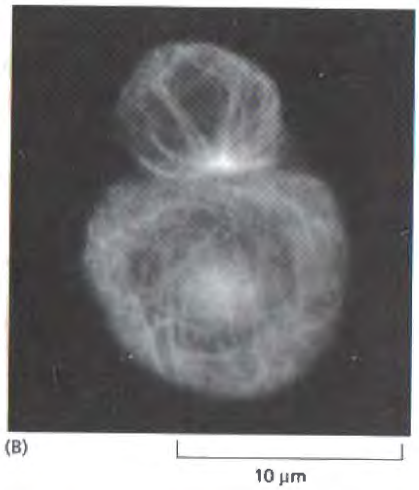


Figura 16–103 Polarización de una célula T citotóxica tras el reconocimiento de una célula diana. (A) Cambios en el citoesqueleto de una célula T citotóxica después de entrar en contacto con una célula diana. El reconocimiento comporta la aparición de señales que causan la polimerización de actina en ambas células, en el lugar de contacto. En la célula T, las interacciones entre las zonas de contacto ricas en actina y los microtúbulos procedentes del centrosoma, provocan la reorientación del centrosoma, de forma que el complejo de Golgi asociado se coloca adyacente a la célula diana. (B) Micrografía obtenida por inmunofluorescencia en la que la célula T (*superior*) y su célula diana (*inferior*) han sido marcadas con un anticuerpo contra los microtúbulos. En la célula T, el centrosoma y los microtúbulos que irradian a partir de él están orientados hacia el punto de contacto de ambas células. Al contrario, en la célula diana el haz de microtúbulos no está polarizado. (B, reproducida de B. Geiger, D. Rosen y G. Berke, *J. Cell Biol.* 95:137-143, 1982, con la autorización de The Rockefeller University Press.)

inmune de los vertebrados a la infección por virus. Las células T, igual que los neutrófilos, utilizan un movimiento basado en actina para desplazarse a través de los tejidos del cuerpo y encontrar a las células diana infectadas. Cuando una célula T entra en contacto con una célula infectada por virus y sus receptores reconocen a los antígenos virales como extraños, la misma maquinaria de polarización se activa de forma muy diferente para facilitar la muerte de la célula diana. Rac se activa en el lugar del contacto célula-célula, provoca la polimerización de actina en este lugar y genera una región especializada del córtex. Este lugar especializado provoca la reorientación del centrosoma, desplazándose junto con sus microtúbulos hacia la zona de contacto entre la célula diana y la célula T (**Figura 16–103**). Entonces los microtúbulos colocan al complejo de Golgi debajo de la zona de contacto, apuntando la maquinaria "asesina" hacia la célula diana. El mecanismo de la muerte celular se describe en el Capítulo 25 (véase Figura 25–47).

La compleja especialización morfológica de las neuronas depende del citoesqueleto

El último caso de formas en que las propiedades intrínsecas del citoesqueleto eucariota permiten grandes comportamientos celulares específicos y enormemente complicados son las neuronas. En el embrión, las neuronas nacen como células poco importantes, que utilizan los filamentos de actina para migrar hacia sus localizaciones específicas. Sin embargo, una vez allí, envían hacia el exterior una serie de extensiones celulares largas y especializadas que les permitirán recibir señales eléctricas (*dendritas*) o transmitir estas señales hacia células diana (*axones*). <TACC> La preciosa y elaborada ramificación morfológica de los axones y de las dendritas permite a las neuronas formar redes de señalización altamente complejas e interactuar con muchas otras células de forma simultánea y hacen posible el complicado y a menudo impredecible comportamiento de los animales superiores. Ambos tipos de extensiones celulares (llamados colectivamente *neuritas*) están repletas de haces de microtúbulos, que son críticos tanto para su estructura como para su función.

En los axones, todos los microtúbulos están orientados en la misma dirección, con sus extremos menos apuntando hacia la parte posterior del soma celular y sus extremos más dirigidos hacia el terminal axonal (**Figura 16–104**). Cada microtúbulo no va desde el soma celular hasta el axón terminal; por lo general cada uno de ellos no tiene más de unas cuantas micras de longitud, pero grandes cantidades de ellos están organizados en haces superpuestos. Este conjunto de microtúbulos perfectamente alineados funciona como una pista de transporte para proteínas específicas o para vesículas que contienen proteínas y mRNA hacia los axones terminales donde se forman y mantienen las sinapsis. El axón más largo del organismo se forma en la base del cordón espinal hacia el extremo del dedo gordo del pie y tiene más de un metro de longitud.

Este largo viaje en este sentido (anterógrado) lo realizan mitocondrias, un gran número de proteínas específicas empaquetadas en vesículas de transporte y vesículas sinápticas precursoras. Son transportadas mediante proteínas motoras de la familia de las dineínas dirigidas hacia los extremos más de los microtúbulos, que pueden desplazarlas cerca de un metro cada dos o tres días. Este transporte es mucho más eficaz que la difusión, ya que ésta tardaría aproximadamente algunas décadas en desplazar una mitocondria a esta distancia. Muchos miembros de la superfamilia de las quinesinas contribuyen a este *transporte axonal anterógrado*, transportando conjuntos específicos de orgánulos rodeados de membrana a lo largo de los microtúbulos. La gran diversidad de proteínas motoras de la familia de las quinesinas

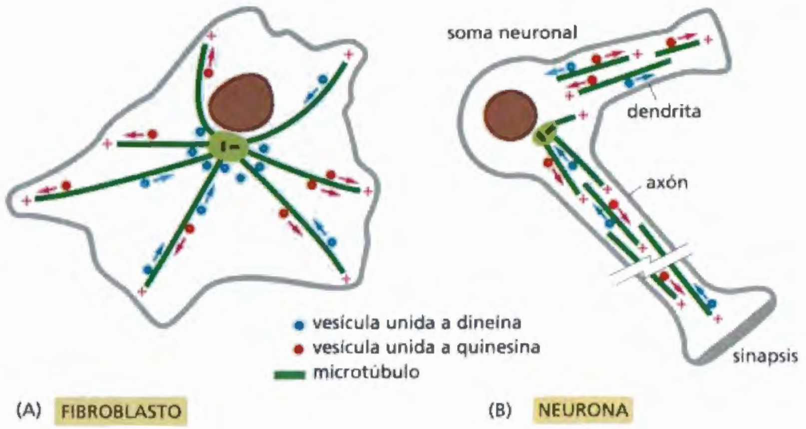


Figura 16–104 Organización de los microtúbulos en fibroblastos y neuronas. (A) En un fibroblasto, los microtúbulos irradian del centrosoma, situado en el centro de la célula. Las vesículas con los extremos más asociados a la quinesina se mueven hacia el exterior, mientras que las vesículas con los extremos menos asociados a dineína se desplazan hacia el interior. (B) En una neurona la organización de los microtúbulos es más compleja. En el axón, todos los microtúbulos tienen la misma polaridad, con los extremos más apuntando hacia el exterior del axón. Ningún microtúbulo cubre la longitud entera del axón; de hecho, las vías para el rápido transporte axonal están constituidas por pequeños segmentos superpuestos de microtúbulos paralelos. En las dendritas, los microtúbulos tienen polaridades mezcladas, de forma que algunos extremos más apuntan al exterior y otros hacia el interior.

usadas en el transporte axonal sugiere que además del desplazamiento, pueden estar implicadas en dirigir su carga hacia estructuras específicas cerca del final o a lo largo de la vía y también en el desplazamiento de la carga. Simultáneamente, los componentes viejos de los axones vuelven hacia el soma celular para su degradación y reciclaje mediante un *transporte axonal retrógrado.* Este transporte se produce a lo largo de los mismos microtúbulos orientados y está producido por la dineína citoplasmática, proteína motora que se dirige hacia los extremos menos. El transporte retrógrado también es crítico para comunicar la presencia de señales de crecimiento y supervivencia recibidas en el nervio hacia el núcleo, para influenciar la expresión génica.

Una forma de neuropatía periférica humana, la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, está provocada por una mutación puntual en un miembro de la familia de las quinesinas que transporta los precursores de las vesículas sinápticas hacia los axones. Otros tipos de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer pueden en parte estar provocadas por interrupciones en el tráfico neuronal; como se indicó anteriormente, el precursor amiloide de la proteína APP es parte de un complejo proteico que funciona como receptor para la unión de la quinesina-1 a otras vesículas de transporte axonal.

La estructura de los axones depende tanto los microtúbulos axonales como de la contribución de los otros dos sistemas principales del citoesqueleto: los filamentos de actina y los filamentos intermedios. Los filamentos de actina rodean el córtex del axón, justo debajo de la membrana plasmática. Las proteínas motoras basadas en actina como la miosina V también son abundantes en los axones, quizás para ayudar a desplazar los materiales, aunque se desconoce cuál es su función exacta. Los neurofilamentos, filamentos intermedios especializados de las células nerviosas, proporcionan el soporte estructural más importante de los axones. Una rotura de la estructura de los neurofilamentos o del entrecruzamiento de las proteínas, que unen los neurofilamentos a los microtúbulos y a los filamentos de actina distribuidos a lo largo del axón, puede provocar una desorganización axonal y finalmente una degeneración axonal.

La construcción de la elaborada arquitectura ramificada de las neuronas durante el desarrollo embrionario necesita del movimiento basado en actina. Como ya se señaló, los extremos de los axones en crecimiento y las dendritas se extienden a través de un *cono de crecimiento,* una estructura móvil especializada rica en actina (**Figura 16–105**). La mayoría de conos de crecimiento neuronales producen filopodios y algunos también lamelipodios. La formación y estabilización de los filopodios del cono de crecimiento es muy sensible a las variaciones ambientales. Algunas células secretan proteínas solubles, como por ejemplo la netrina, para atraer o repeler a los conos de crecimiento. Esto modula la estructura y movilidad del cono en crecimiento alterando el balance entre la actividad de Rac y la de Rho en el frente de avance (véase Figura 15–62). Además existen marcadores que los guían a lo largo del camino, adheridos a la matriz extracelular o a la superficie de las células. Cuando los filopodios encuentran estos "puestos guía" en su exploración, rápidamente forman contactos adhesivos. Se cree que un colapso dependiente de miosina de la red de actina en la parte no estabilizada del cono de crecimiento provoca que el axón en desarrollo efectúe un giro hacia el puesto guía.

Así pues, una combinación compleja de señales positivas y negativas, tanto solubles como insolubles, guían el cono de crecimiento hacia su destino final. Los microtúbulos refuer-

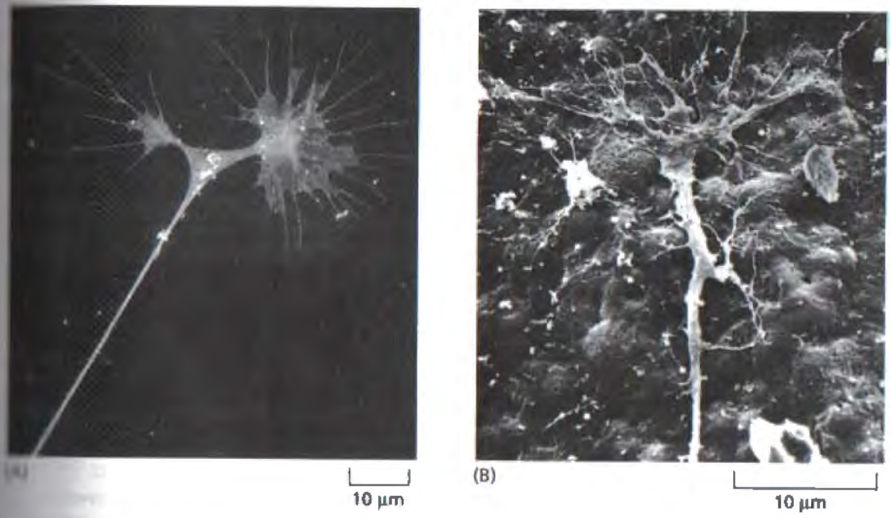


Figura 16–105 Crecimiento de los conos neurales. <AAGA> (A) Electromicrografía obtenida con el microscopio electrónico de barrido de dos conos en crecimiento en el extremo de una neurita, procedente de una neurona simpática de pollo mantenida en cultivo. En este caso, previamente, un cono sencillo en crecimiento ha sido fragmentado en dos mitades. Obsérvese la gran cantidad de filopodios existentes y el gran lamelipodio. La forma tirante de la neurita es debida a la tensión generada por el desplazamiento anterógrado de los conos de crecimiento que son los que a menudo fijan los puntos de adhesión del axón con el sustrato. (B) Electromicrografía obtenida con el microscopio electrónico de barrido de un cono en crecimiento de una neurona sensorial arrastrándose por la superficie interna de la epidermis de un renacuajo de *Xenopus*. (A, de D. Bray, en Cell Behaviour [R. Bellairs, A. Curtis y G. Dunn, eds.]. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1982; B, de A. Roberts, *Brain Res.* 118:526-530, 1976. Con la autorización de Elsevier.)

con las decisiones direccionales tomadas por las estructuras ricas en actina en el frente de avance del cono de crecimiento. Los microtúbulos de los haces paralelos del axón, justo detrás del cono de crecimiento, están creciendo constantemente hacia el interior del cono y acortándose en la parte posterior por inestabilidad dinámica. Las señales adhesivas que sirven de guía están relacionadas con los extremos dinámicos de los microtúbulos, de forma que los microtúbulos que crecen en la dirección correcta están estabilizados contra su desensamblaje. De esta forma, detrás del cono queda un axón rico en microtúbulos, que marca el camino por donde ha viajado dicho cono de crecimiento.

Por lo general, las dendritas son proyecciones más cortas que los axones y reciben señales sinápticas en lugar de haberse especializado en enviarlas como los axones. Todos los microtúbulos en las dendritas están dispuestos en paralelo unos con otros, y con sus polaridades mezcladas, de forma que algunos tienen sus extremos más apuntando hacia los extremos de las dendritas, mientras los de otros apuntan hacia el cuerpo celular. De todas formas, las dendritas también se forman como resultado de la actividad de un cono de crecimiento. Así pues, el crecimiento de los conos en los extremos tanto de axones como de dendritas crea la morfología compleja y altamente individualizada de cada tipo de célula neuronal madura (**Figura 16–106**).

Aunque las neuronas del sistema nervioso central son células de vida larga, esto no significa que sean estáticas. Las sinapsis se forman constantemente, aumentan, disminuyen y son eliminadas mientras el cerebro aprende, evalúa y olvida. Imágenes de alta resolución de la estructura de las neuronas del cerebro han revelado que la morfología neuronal sufre reordenaciones constantes mientras se forman y rompen las sinapsis (**Figura 16–107**). Se cree que estas reorganizaciones dependientes de actina son críticas en el aprendizaje y en la memoria de larga duración. De esta forma, el citoesqueleto proporciona la máquina para la construcción de todo el sistema nervioso y de las estructuras de soporte que refuerzan, estabilizan y mantienen sus componentes.

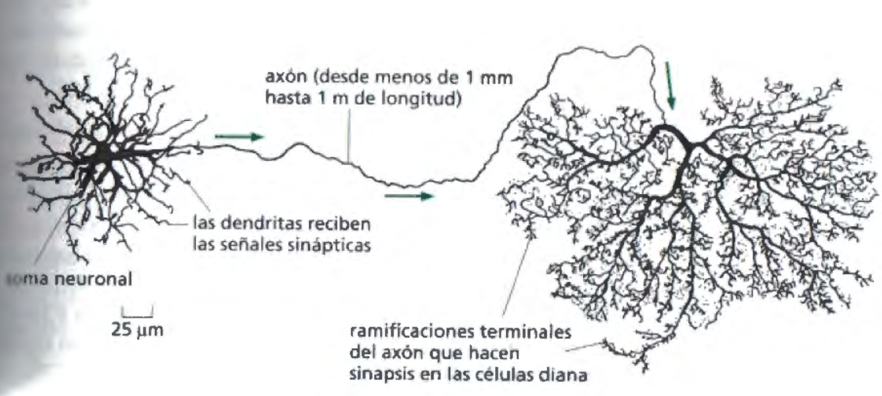


Figura 16–106 La compleja arquitectura de una neurona de un vertebrado. Esta neurona procede de la retina de un mono. Las flechas indican el sentido en el que viajan las señales eléctricas a lo largo del axón. En el cuerpo humano, las neuronas más largas y más grandes se extienden hasta distancias de cerca de 1 m (1 millón de µm), desde la base de la cuerda espinal hasta la punta del dedo gordo del pie, y tienen axones de un diámetro de 15 µm. (Adaptado de B.B. Boycott, en Essays on the Nervous System [R. Bellairs y E.G. Gray, eds.]. Oxford, UK: Clarendon Press, 1974.)

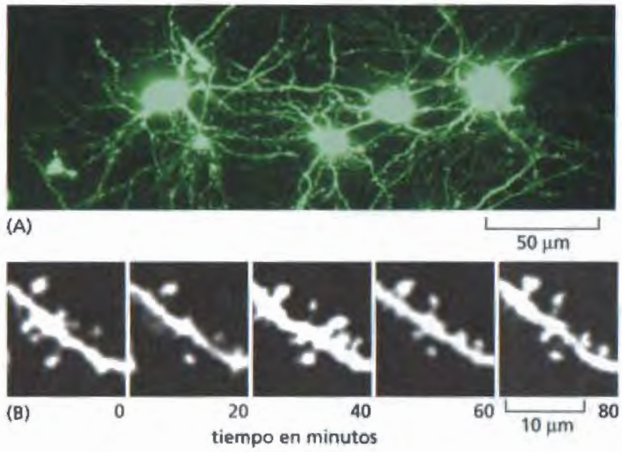


Figura 16–107 Cambios rápidos en la estructura de las dendritas en el cerebro de un ratón vivo. (A) Imagen de neuronas corticales en un ratón transgénico que ha sido generado para expresar la proteína fluorescente verde en un pequeño número de sus células cerebrales. Se pueden observar cambios en estas neuronas y en sus proyecciones durante meses usando microscopios fluorescentes de alta sensibilidad. Para estas observaciones, el ratón debe ser sometido a una operación quirúrgica que introduce una pequeña ventana transparente a través de su cráneo y debe ser anestesiado cada vez que se graba una imagen. (B) Una dendrita, imagen obtenida durante un periodo de 80 minutos, demuestra que las dendritas están constantemente enviando y retrayendo delgadas protuberancias dependientes de actina, generando las espinas dendríticas que reciben la gran mayoría de sinapsis excitadoras procedentes de los axones del cerebro. Se considera que estas espinas, que pueden estabilizarse y persistir durante meses, son importantes para la función cerebral y pueden intervenir en la memoria a largo plazo. (Cortesía de Karel Svoboda.)

Resumen

Dos tipos de estructuras especializadas diferentes en las células eucariotas están formadas por haces de proteínas motoras muy ordenadas que se desplazan a lo largo de las vías de filamentos estabilizados. El sistema miosina-actina de los sarcómeros permite la contracción de diversos tipos de músculos, incluyendo el esquelético, el liso y el músculo cardíaco. El sistema microtúbulos-dineína del axonema permite el batido de los cilios y las ondulaciones de los flagelos.

Los movimientos globales, las formas a gran escala y la estructura de las células necesitan de la actividad coordinada de los tres tipos de filamentos básicos y de la actividad de una gran variedad de proteínas accesorias del citoesqueleto, incluyendo las proteínas motoras. Durante la división celular, las funciones del huso mitótico formado por microtúbulos necesitan de una cooperación temporal y espacial entre los filamentos dinámicos del citoesqueleto, proteínas motoras activas molecularmente y una gran variedad de factores accesorios. El desplazamiento de las células –un comportamiento muy extendido e importante en el desarrollo embrionario, en la cicatrización de heridas, en el mantenimiento de los tejidos y en el funcionamiento del sistema inmune en los animales adultos– es otro ejemplo de las acciones coordinadas y complejas del citoesqueleto. Para que una célula se desplace, debe generar y mantener una polaridad estructural general, que está influenciada por señales externas. Además, la célula tiene que coordinar protuberancias en el frente de avance (ensamblando nuevos filamentos de actina), adhesión en la parte nueva de unión de la célula con el sustrato, tracción mediante motores moleculares para retraer el corpúsculo celular y desensamblaje de los contactos célula-sustrato ya establecidos.

Células complejas como las neuronas, necesitan del ensamblaje coordinado de microtúbulos, neurofilamentos (filamentos intermedios neuronales) y filamentos de actina, así como de la acción de docenas de motores moleculares altamente especializados para transportar los componentes subcelulares a sus lugares de destino.

PROBLEMAS

¿Qué afirmaciones son ciertas? Explicar por qué sí o por qué no

16–1 El papel de la hidrólisis del ATP en la polimerización de actina es parecido al papel de la hidrólisis de GTP en la polimerización de tubulina: ambos sirven para debilitar los enlaces en el polímero y en consecuencia provocar la despolimerización.

16–2 En la mayoría de células animales, los motores microtubulares dirigidos hacia los extremos menos transfieren su carga a la periferia de la célula, mientras que los extremos más lo hacen hacia el interior de la célula.

16–3 Las neuronas motoras transfieren potenciales de acción a las membranas de las células musculares que abren canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje en los túbulos T. Esto permite la entrada de Ca^{2+} al citosol, que se une a la troponina C y se inicia una rápida contracción muscular.

Resolver los siguientes problemas

16–4 Con una concentración de tubulina pura de 1,4 mg/mL los microtúbulos crecen a 2 µm/min. Con esta tasa de crecimiento, ¿cuántos dímeros de tubulina αβ (de 8 nm de longitud) son añadidos por segundo a los extremos de los microtúbulos?

16–5 Se considera que una solución de dímeros puros de tubulina αβ nuclea a los microtúbulos formando un protofilamento lineal de cerca de siete dímeros de longitud. En este punto, las probabilidades de que el siguiente dímero αβ se una lateralmente o se una al extremo del protofilamento son casi las mismas. Se considera que el acontecimiento crítico para la formación de los microtúbulos es la primera asociación lateral (**Figura P16–1**). ¿Cómo puede la asociación lateral estimular la formación rápida de un microtúbulo?

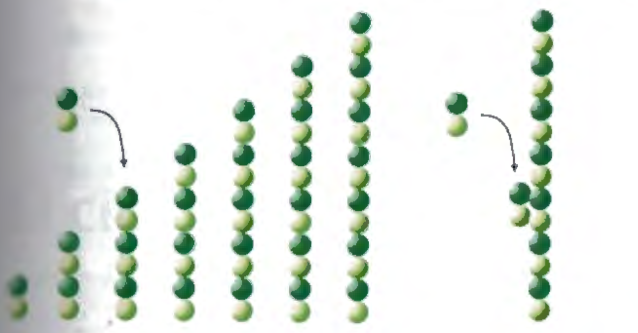


Figura P16–1 Modelo para la nucleación de un microtúbulo mediante dímeros puros de tubulina αβ (Problema 16–5).

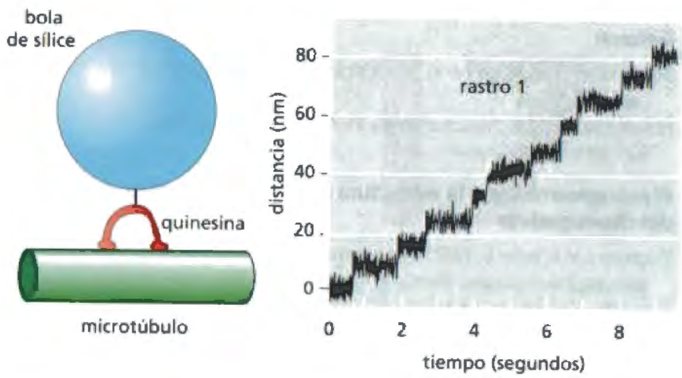


Figura P16–2 Movimiento de la quinesina a lo largo de un microtúbulo (Problema 16–8) (A) Sistema experimental con la quinesina unida a una bola de sílice, moviéndose a lo largo de un microtúbulo. (B) Posición de la quinesina (visualizada mediante la posición de la bola de sílice) en relación al centro del patrón de interferencia, como función del tiempo de movimiento a lo largo del microtúbulo. La naturaleza dentada del rastro es el resultado del movimiento browniano de la bola.

16–6 ¿Cómo "sabe" un centrosoma que ha encontrado el centro de la célula?

16–7 La concentración de actina en las células es de 50 a 100 veces más elevada que la concentración crítica observada para la actina pura en un tubo de ensayo. ¿Cómo es posible este hecho? ¿Qué impide que las subunidades de actina de las células polimericen en filamentos? ¿Por qué es ventajoso para las células mantener un almacén tan grande de subunidades de actina?

16–8 Los movimientos de una proteína motora simple pueden ser analizados de forma directa. Mediante la utilización de un láser polarizado de luz es posible crear patrones de interferencia que ejercen una fuerza centralmente dirigida, que va del cero en el centro a unos pocos piconewtons en la periferia (cerca de 200 nm del centro). Las moléculas individuales que entran en el patrón de interferencia son rápidamente empujadas hacia el centro, donde son capturadas y dirigidas según considere necesario el experimentador.

Utilizando estas "pinzas ópticas", las moléculas simples de quinesina pueden ser colocadas en un microtúbulo fijado a un cubreobjetos. Aunque una sola molécula de quinesina no puede ser observada ópticamente, puede marcarse con una bola de sílice y se puede seguir indirectamente al seguir la bola (**Figura P16–2**A). En ausencia de ATP, la molécula de quinesina permanece en el centro del patrón de interferencia, pero con ATP se mueve hacia el extremo más del microtúbulo. Al moverse a lo largo del microtúbulo, la quinesina se encuentra con la fuerza del patrón de interferencia que simula la carga que transporta la quinesina durante su función en la célula. Además, la presión contra las bolas de sílice contrarresta los efectos del movimiento browniano (térmico), de forma que la posición de la bola refleja de forma precisa la posición de la molécula de quinesina en el microtúbulo.

Los rastros de los movimientos de la molécula de quinesina a lo largo de los microtúbulos se muestran en la Figura P16–2B.

A. Como se muestra en la Figura P16–2B, todos los movimientos de la quinesina son en un sentido (hacia el extremo más del microtúbulo). ¿Qué proporciona la energía libre necesaria para asegurar el movimiento unidireccional a lo largo del microtúbulo?

B. ¿Cuál es la velocidad media del movimiento de la quinesina a lo largo del microtúbulo?

C. ¿Cuál es la longitud de cada paso que realiza la quinesina al moverse a lo largo del microtúbulo?

D. Se sabe por otros estudios que la quinesina tiene dos dominios globulares que pueden unirse a la tubulina β y que la quinesina se desplaza a lo largo de un solo protofilamento en un microtúbulo. En cada protofilamento, la subunidad de tubulina β se repite a intervalos de 8 nm. Dada la longitud del paso y los intervalos entre subunidades de tubulina β, ¿cómo se desplaza una molécula de quinesina a lo largo de un microtúbulo?

E. ¿Hay algo en los datos de la Figura P16–2B que permita saber cuántas moléculas de ATP se hidrolizan en cada paso?

16–9 ¿Cómo se mantiene el movimiento unidireccional de un lamelipodio?

16–10 Las medidas detalladas de la longitud de un sarcómero y de la tensión durante la contracción isométrica del músculo estriado proporcionan una base crucial inicial para el modelo del deslizamiento del filamento de la contracción muscular. A partir de los conocimientos del modelo del filamento deslizante y de la estructura de un sarcómero, proponer una explicación molecular para la relación de la longitud del sarcómero en las porciones de la **Figura P16–3** marcadas como I, II, III y IV. (En este músculo, la longitud del filamento de miosina es de 1,6 μm y la longitud de los filamentos delgados de actina que se proyectan a partir de los discos Z es de 1,0 μm.)

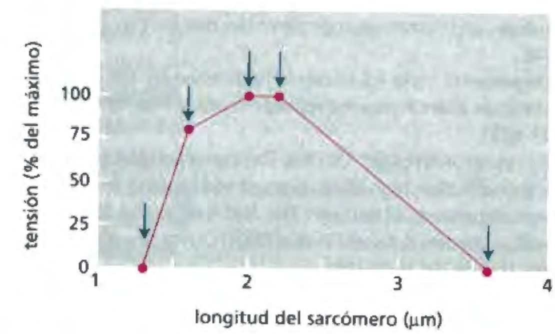


Figura P16–3 La tensión como función de la longitud de un sarcómero durante la contracción isométrica (Problema 16–10).

BIBLIOGRAFÍA

General

Bray D (2001) Cell Movements: From Molecules to Motility, 2.ª ed. New York: Garland Science.

Howard J (2001) Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton. Sunderland, MA: Sinauer.

El autoensamblaje y la estructura dinámica de los filamentos del citoesqueleto

Dogterom M & Yurke B (1997) Measurement of the force-velocity relation for growing microtubules. *Science* 278:856–860.

Garner EC, Campbell CS & Mullins RD (2004) Dynamic instability in a DNA-segregating prokaryotic actin homolog. *Science* 306:1021–1025.

Helfand BT, Chang L & Goldman RD (2003) The dynamic and motile properties of intermediate filaments. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:445–467.

Hill TL & Kirschner MW (1982) Bioenergetics and kinetics of microtubule and actin filament assembly-disassembly. *Int Rev Cytol* 78:1–125.

Hotani H & Horio T (1988) Dynamics of microtubules visualized by darkfield microscopy: treadmilling and dynamic instability. *Cell Motil Cytoskeleton* 10:229–236.

Jones LJ, Carballido-Lopez R & Errington J (2001) Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* 104:913–922.

Kerssemakers JW, Munteanu EL, Laan L et al (2006) Assembly dynamics of microtubules at molecular resolution. *Nature* 442:709–712.

Luby-Phelps K (2000) Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int Rev Cytol* 192:189–221.

Mitchison T & Kirschner M (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312:237–242.

Mitchison TJ (1995) Evolution of a dynamic cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 349:299–304.

Mukherjee A & Lutkenhaus J (1994) Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J Bacteriol* 176:2754–2758.

Oosawa F & Asakura S (1975) Thermodynamics of the polymerization of protein. New York: Academic Press, pp 41–55, pp 90–108.

Pauling L (1953) Aggregation of Globular Proteins. *Discuss Faraday Soc* 13:170–176

Rodionov VI & Borisy GG (1997) Microtubule treadmilling *in vivo*. *Science*. 275:215–218.

Shih YL & Rothfield L (2006) The bacterial cytoskeleton. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:729–754.

Theriot JA (2000) The polymerization motor. *Traffic* 1:19–28.

Cómo regulan las células los filamentos de su citoesqueleto

Aldaz H, Rice LM, Stearns T & Agard DA (2005) Insights into microtubule nucleation from the crystal structure of human gamma-tubulin. *Nature* 435:523–527

Bretscher A, Chambers D, Nguyen R & Reczek D (2000) ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:113–143.

Doxsey S, McCollum D & Theurkauf W (2005) Centrosomes in cellular regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:411–434.

Garcia ML & Cleveland DW (2001) Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease. *Curr Opin Cell Biol* 13:41–48.

Holy TE, Dogterom M, Yurke B & Leibler S (1997) Assembly and positioning of microtubule asters in microfabricated chambers. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6228–6231.

Mullins RD, Heuser JA & Pollard TD (1998) The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6181–6186.

Robinson RC, Turbedsky K, Kaiser DA et al (2001) Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science* 294:1679–1684.

Quarmby L (2000) Cellular Samurai: katanin and the severing of microtubules. *J Cell Sci* 113:2821–2827.

Stearns T & Kirschner M (1994) *In vitro* reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of gamma-tubulin. *Cell* 76:623–637.

Wiese C & Zheng Y (2006) Microtubule nucleation: gamma-tubulin and beyond. *J Cell Sci* 119:4143–4153.

Zheng Y, Wong ML, Alberts B & Mitchison T (1995) Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* 378:578–583.

Zigmond SH (2004) Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol* 16:99–105.

Motores moleculares

Burgess SA, Walker ML, Sakakibara H et al (2003) Dynein structure and power stroke. *Nature* 421:715–718.

Hirokawa N (1998) Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279:519–526.

Howard J, Hudspeth AJ & Vale RD (1989) Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature* 342:154–158.

Howard J (1997) Molecular motors: structural adaptations to cellular functions. *Nature* 389:561–567.

Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Base K et al (1993) Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* 261:50–58.

Reck-Peterson SL, Yildiz A, Carter AP et al (2006) Single-molecule analysis of dynein processivity and stepping behavior. *Cell* 126:335–348.

Rice S, Lin AW, Safer D et al (1999) A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature* 402:778–784.

Richards TA & Cavalier-Smith T (2005) Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature* 436:1113–1118.

Svoboda K, Schmidt CF, Schnapp BJ & Block SM (1993) Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature* 365:721–727.

Vikstrom KL & Leinwand LA (1996) Contractile protein mutations and heart disease. *Curr Opin Cell Biol* 8:97–105.

Wells AL, Lin AW, Chen LQ et al (1999) Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature* 401:505–508.

Yildiz A, Forkey JN, McKinney SA et al (2003) Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* 300:2061–2065.

Yildiz A & Selvin PR (2005) Kinesin: walking, crawling or sliding along? *Trends Cell Biol* 15:112–120.

El citoesqueleto y el comportamiento celular

Abercrombie M (1980) The crawling movement of metazoan cells. *Proc Roy Soc B* 207:129–147.

Cooke R (2004) The sliding filament model: 1972–2004. *J Gen Physiol* 123:643–656.

Dent EW & Gertler FB (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40:209–227.

Lauffenburger DA & Horwitz AF (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84:359–369.

Lo CM, Wang HB, Dembo M & Wang YL (2000) Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J* 79:144–152.

Madden K & Snyder M (1998) Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Annu Rev Microbiol* 52:687–744.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K et al (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302:1704–1709.

Rafelski SM & Theriot JA (2004) Crawling toward a unified model of cell motility: spatial and temporal regulation of actin dynamics. *Annu Rev Biochem* 73:209–239.

Parent CA & Devreotes PN (1999) A cell's sense of direction. *Science* 284:765–770.

Pollard TD & Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112:453–465.

Purcell EM (1977) Life at low Reynolds' number. *Am J Phys* 45:3–11.

Wittmann T, Hyman A & Desai A (2001) The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nature Cell Biol* 3:E28–E34.

El ciclo celular

17

En este capítulo

VISIÓN GENERAL DEL CICLO CELULAR	1054
EL SISTEMA DE CONTROL DEL CICLO CELULAR	1060
FASE S	1067
MITOSIS	1071
CITOCINESIS	1092
CONTROL DE LA DIVISIÓN CELULAR Y DEL CRECIMIENTO CELULAR	1101

La única forma de obtener una nueva célula es duplicar una célula ya existente. Este simple hecho, establecido por primera vez a mediados del siglo XIX, contiene un profundo mensaje sobre la continuidad de la vida. Desde el origen de la vida hace más de tres mil millones de años, todos los organismos vivos, desde las bacterias a los mamíferos, son el resultado de repetidas rondas de crecimiento y división celular.

Una célula se reproduce llevando a cabo una secuencia ordenada de acontecimientos en los que duplica su contenido y luego se divide en dos. Este ciclo de duplicación y división, conocido como **ciclo celular**, es el mecanismo esencial mediante el cual todos los seres vivos se reproducen. En las especies unicelulares, como las bacterias y las levaduras, cada división celular genera un nuevo organismo completo. En las especies pluricelulares, para producir un organismo funcional se requieren secuencias de divisiones celulares largas y complejas. Incluso en el adulto, la división celular es necesaria para reemplazar las células que mueren. De hecho, cada uno de nosotros debe fabricar muchos millones de células cada segundo simplemente para sobrevivir: si todas las divisiones celulares se detuvieran –por ejemplo, por la exposición a grandes dosis de rayos X– moriríamos al cabo de pocos días.

Los pormenores del ciclo celular varían de un organismo a otro y en los diferentes momentos de la vida de un organismo. Sin embargo, ciertas características son universales. El conjunto mínimo de procesos que una célula tiene que realizar son aquellos que le permiten llevar a cabo su tarea más importante: la transmisión de su información genética a la siguiente generación de células. Para producir dos células hijas genéticamente idénticas, el DNA de cada cromosoma debe ser replicado fielmente generando dos copias completas y luego los cromosomas replicados tienen que ser distribuidos (*segregados*) con exactitud a las dos células hijas, de manera que cada célula reciba una copia de todo el genoma (**Figura 17–1**).

Las células eucariotas han desarrollado una compleja red de proteínas reguladoras, conocida como *sistema de control del ciclo celular*, que gobierna la progresión a través del ciclo celular. El núcleo de este sistema es una serie ordenada de interruptores bioquímicos que inician los principales acontecimientos del ciclo, incluidas la duplicación y la segregación de los cromosomas. En la mayoría de células, existen otros niveles de regulación que aumentan la fidelidad de la división celular y permiten que el sistema de control responda a varias señales procedentes tanto del interior como del exterior de la célula. En el interior de la célula, el sistema de control comprueba la progresión a través del ciclo celular y retrasa los acontecimientos posteriores hasta que se hayan completado los acontecimientos previos. Por ejemplo, se impiden los preparativos para la segregación de los cromosomas duplicados mientras no se ha completado la replicación del DNA. El sistema de control también comprueba el entorno de la célula. En un animal pluricelular, el sistema es muy sensible a las señales de otras células, estimulando la división celular cuando se necesitan más células y bloqueándola cuando no se necesitan. Por lo tanto, el sistema de control del ciclo celular desempeña un papel fundamental en la regulación del número de células de los tejidos del organismo. Cuando el sistema funciona de forma incorrecta, un exceso de divisiones celulares puede producir cáncer.

Además de duplicar su genoma, la mayoría de células también duplican sus orgánulos y macromoléculas; de lo contrario, las células hijas se volverían más pequeñas con cada división. Para mantener su tamaño, las células en división tienen que coordinar su crecimiento (es decir, el aumento de su masa celular) con su división.

Este capítulo describe los diferentes acontecimientos del ciclo celular y cómo se controlan y coordinan. Comenzaremos con una breve visión general del ciclo celular. Después, describiremos el sistema de control del ciclo celular y explicaremos cómo desencadena los diferentes

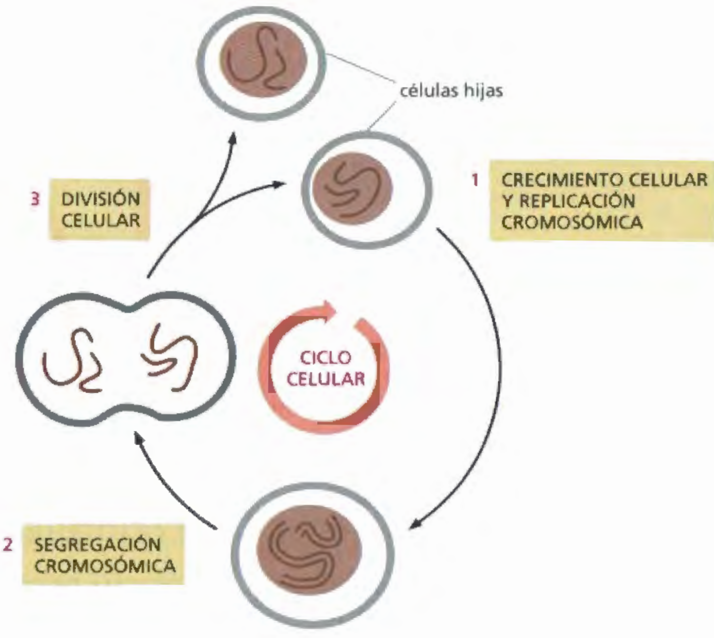


Figura 17–1 El ciclo celular. Se muestra la división de una hipotética célula eucariota con dos cromosomas para ilustrar cómo se forman dos células hijas genéticamente idénticas en cada ciclo. Con frecuencia cada una de las células hijas continúa dividiéndose pasando a través de ciclos celulares adicionales.

acontecimientos del ciclo celular. A continuación, se considerarán en detalle las principales etapas del ciclo celular, en las que los cromosomas se duplican y luego se segregan en dos células hijas. Por último, se explicará cómo las señales extracelulares controlan las velocidades del crecimiento y de la división celular y cómo se coordinan estos dos procesos.

VISIÓN GENERAL DEL CICLO CELULAR

Esta sección se inicia con una breve descripción de las cuatro *fases* del ciclo celular eucariota. Después, trataremos algunos de los métodos y sistemas celulares modelo utilizados para estudiar el ciclo celular.

El ciclo celular eucariota se divide en cuatro fases

La función más importante del ciclo celular es duplicar con exactitud la gran cantidad de DNA de los cromosomas y luego segregar las copias con precisión en dos células hijas genéticamente idénticas. Estos procesos definen las dos fases principales del ciclo celular. La duplicación de los cromosomas sucede en la *fase S* (S de **s**íntesis de DNA), la cual requiere entre 10 y 12 horas y ocupa alrededor de la mitad del tiempo que dura el ciclo celular en una célula de mamífero típica. Después de la fase S, la segregación de los cromosomas y la división celular ocurren en la *fase M* (M de **m**itosis), la cual ocupa mucho menos tiempo (menos de una hora en una célula de mamífero). La fase M comprende dos acontecimientos principales: la división nuclear, o *mitosis*, durante la cual los cromosomas copiados se distribuyen en un par de núcleos hijos; y la división citoplasmática, o *citocinesis*, cuando la célula se divide en dos (**Figura 17–2**).

Al final de la fase S, las moléculas de DNA de cada par de cromosomas duplicados están entrelazadas y se mantienen estrechamente unidas mediante uniones proteicas especializadas. Al principio de la mitosis en una etapa denominada *profase*, las dos moléculas de DNA se desenrollan de forma gradual y se condensan en parejas de bastones rígidos y compactos llamados **cromátidas hermanas**, las cuales se mantienen juntas mediante la *cohesión de las cromátidas hermanas*. Cuando la envoltura nuclear se desensambla, las cromátidas hermanas se unen al *huso mitótico*, un gigantesca estructura bipolar de microtúbulos (véase Capítulo 16). Las cromátidas hermanas se unen a los polos opuestos del huso y, al final, todas las cromátidas hermanas se alinean en el ecuador del huso en una etapa denominada *metafase*. La pérdida de la cohesión de las cromátidas hermanas al inicio de la *anafase* separa las cromátidas hermanas, las cuales son arrastradas hacia los polos opuestos del huso. Después, se desensambla el huso y los cromosomas segregados se empaquetan en

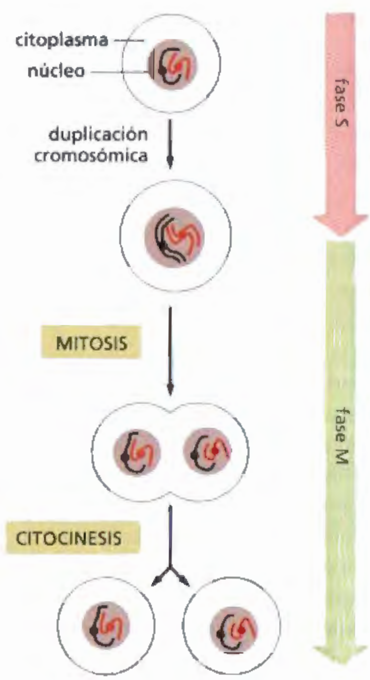
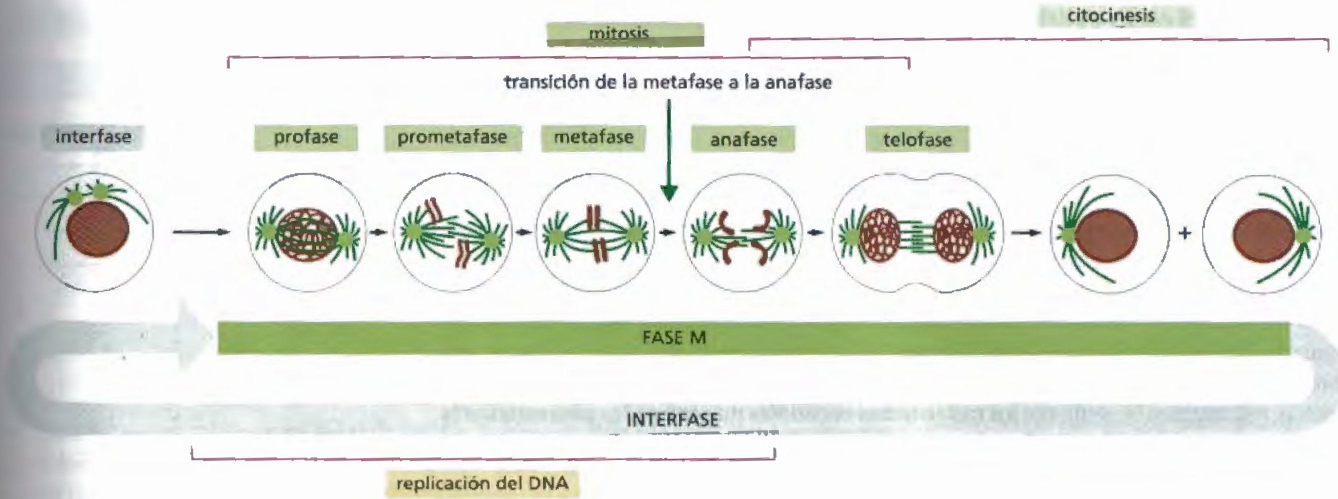


Figura 17–2 Principales acontecimientos del ciclo celular. Los principales acontecimientos cromosómicos del ciclo celular suceden en la fase S, cuando los cromosomas se duplican, y en la fase M, cuando los cromosomas duplicados se segregan en un par de núcleos hijos (en la mitosis), después de lo cual la célula se divide en dos (citocinesis).



núcleos distintos durante la *telofase*. Por último, la citocinesis divide a la célula en dos, de manera que cada célula hija hereda uno de los dos núcleos (**Figura 17–3**). <TACT> <TCAA>

La mayoría de células tardan mucho más tiempo en crecer y duplicar su masa de proteínas y orgánulos del que necesitan para duplicar sus cromosomas y dividirse. La mayoría de ciclos celulares disponen de *fases preparativas (gap phases)* adicionales para, en parte, dejar más tiempo para crecer: la **fase G_1** entre la fase M y la fase S, y la **fase G_2** entre la fase S y la mitosis. Así, el ciclo celular eucariota se divide en cuatro fases secuenciales: G_1, S, G_2 y M. A las fases G_1, S y G_2 se las denomina, en conjunto, **interfase** (**Figura 17–4** y véase Figura 17–3). En una célula humana típica que prolifera en cultivo, la interfase puede durar 23 de las 24 horas de un ciclo, con una hora para la fase M. El crecimiento celular se produce durante todo el ciclo celular, con excepción de la mitosis.

Las fases G_1 y G_2 son mucho más que meros periodos de espera que le permiten a la célula crecer. Proporcionan tiempo para que la célula compruebe el medio interno y externo para así asegurarse de que las condiciones son adecuadas y de que se han completado los preparativos antes de que la célula desencadene los principales acontecimientos de la fase S y de la mitosis. La fase G_1 es en especial importante a este respecto. Su duración puede variar mucho dependiendo de las condiciones externas y de las señales extracelulares procedentes de otras células. Por ejemplo, si las condiciones extracelulares son desfavorables, las células retrasan su progresión a través de la fase G_1 e incluso pueden entrar en un estado de reposo especializado llamado G_0 (G cero), en el cual pueden permanecer durante días, semanas o incluso años antes de volver a proliferar. En efecto, muchas células se mantienen permanentemente en G_0 hasta que ellas o el organismo mueren. Si las condiciones extracelulares son favorables y hay señales para crecer y dividirse, las células en G_1 temprana o G_0 progresan a través de un punto de determinación próximo al final de G_1 denominado **Inicio** (en levaduras) o **punto de restricción** (en células de mamífero). Utilizaremos el término Inicio tanto para levaduras como para células animales. Superado este punto, las células quedan determinadas para replicar el DNA, incluso aunque desaparezcan las señales extracelulares que estimulan el crecimiento y la división celular.

Figura 17–3 Los acontecimientos de la división celular en los eucariotas vistos al microscopio. Los procesos fáciles de observar de la división nuclear (mitosis) y de la división celular (citocinesis), denominados en conjunto fase M, sólo ocupan una pequeña fracción del ciclo celular. La otra parte del ciclo, de mayor duración, recibe el nombre de interfase, la cual incluye las fases G_1, S y G_2 (se describe en el texto). Se muestran las cinco etapas de la mitosis: durante la transición de la metafase a la anafase se produce un cambio abrupto en el estado bioquímico de la célula. Una célula puede detenerse en la metafase antes de este punto de transición, pero una vez que supera este punto, la célula continuará hasta el final de la mitosis y a través de la citocinesis a la interfase.

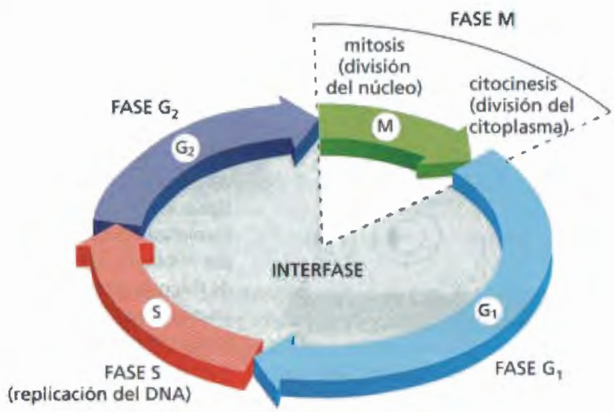


Figura 17–4 Las cuatro fases del ciclo celular. En la mayoría de las células, las fases G_1 y G_2 separan los principales acontecimientos de la fase S y de la fase M. G_1 es el intervalo entre la fase M y la fase S, mientras que G_2 es el intervalo entre la fase S y la fase M.

El control del ciclo celular es semejante en todos los eucariotas

Algunas características del ciclo celular, incluido el tiempo que se necesita para completar ciertos acontecimientos, varían mucho de un tipo celular a otro, incluso en un mismo organismo. En cambio, en todas las células eucariotas, la organización básica del ciclo es esencialmente la misma y, al parecer, todos los eucariotas conducen y regulan los acontecimientos del ciclo celular mediante sistemas y mecanismos de control semejantes. Por ejemplo, las proteínas del sistema de control del ciclo celular aparecieron por primera vez hace más de mil millones de años. Cabe destacar que se han conservado tan bien en el transcurso de la evolución que muchas de ellas funcionan perfectamente cuando se transfieren de una célula humana a una célula de levadura. Por lo tanto, podemos estudiar el ciclo celular y su regulación en una gran variedad de organismos eucariotas y utilizar todos los hallazgos para obtener una visión unificada de cómo se dividen las células eucariotas. En el resto de esta sección, revisaremos brevemente los tres sistemas eucariotas más utilizados para estudiar la organización y el control del ciclo celular: levaduras, embriones animales y células de mamífero en cultivo.

El control del ciclo celular se puede diseccionar genéticamente analizando levaduras mutantes

Las levaduras son hongos unicelulares de pequeño tamaño con un sistema de control del ciclo celular muy parecido al nuestro. En los estudios del ciclo celular, por lo general se utilizan dos especies de levaduras. La **levadura de fisión** *Schizosaccharomyces pombe* recibe este nombre por la cerveza africana en cuya fabricación se utiliza. Se trata de una célula en forma de bastón que crece por el alargamiento de sus extremos. La división tiene lugar cuando se forma un septo, o placa celular, en la mitad del bastón (**Figura 17–5**A). La **levadura de gemación** *Saccharomyces cerevisiae* es utilizada tanto por cerveceros como panaderos. Se trata de una célula ovalada que se divide formando una yema, la cual comienza a aparecer durante G_1 y crece despacio hasta que se separa de la célula madre después de la mitosis (Figura 17–5B).

A pesar de sus diferencias externas, las dos especies de levaduras comparten muchas características muy útiles para los estudios genéticos. Se reproducen casi tan rápido como las bacterias y el tamaño de su genoma es inferior al 1% del de un mamífero. Son ideales para llevar a cabo manipulaciones genéticas de carácter molecular, en las que sus genes se pueden eliminar, sustituir o modificar con facilidad. Lo que todavía es más importante es su habilidad de proliferar en un estado *haploide*, con tan sólo una copia de cada uno de sus genes. Cuando las células son haploides, es fácil aislar y estudiar mutaciones que inactivan un gen, ya que evitamos la complicación de tener una segunda copia del gen en la célula.

Muchos descubrimientos sobre el control del ciclo celular se han obtenido en levaduras, mediante búsquedas de mutaciones que inactivan genes que codifican componentes

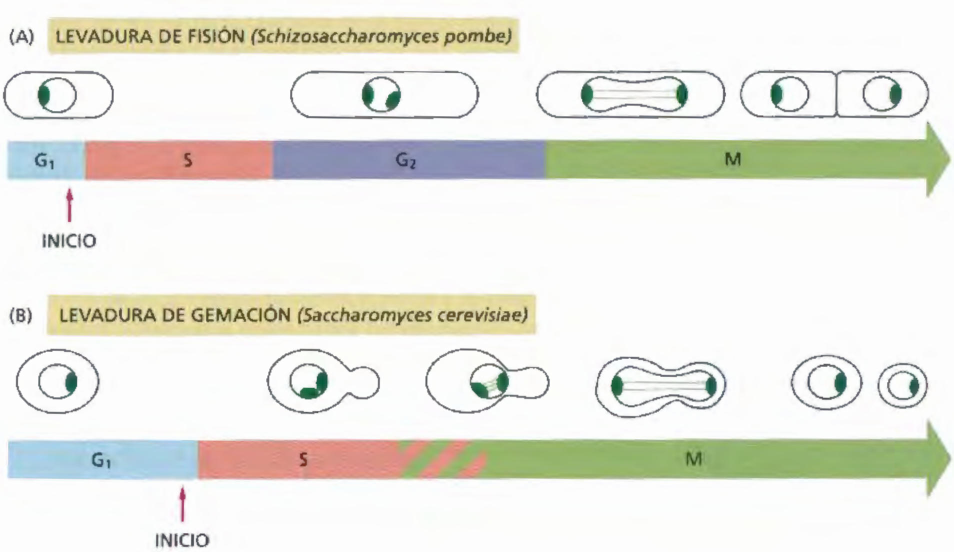


Figura 17–5 Comparación de los ciclos celulares de las levaduras de fisión y de las levaduras de gemación. (A) La levadura de fisión tiene un ciclo celular eucariota típico con las fases G_1, S, G_2 y M. La envoltura nuclear de las levaduras, a diferencia de la envoltura nuclear de las células de los organismos eucariotas superiores, no se desorganiza durante la fase M. Los microtúbulos del huso mitótico (*verde claro*) se forman dentro del núcleo y se unen a los corpúsculos polares del huso (*verde oscuro*) en su periferia. La célula se divide formando un tabique (conocido como placa celular) y se escinde en dos. (B) La levadura de gemación tiene fases G_1 y S normales pero no tiene una fase G_2 típica. En cambio, hacia el final de la fase S, comienza a constituirse un huso formado por microtúbulos; como en las levaduras de fisión, la envoltura nuclear permanece intacta durante la mitosis y el huso se forma dentro del núcleo. A diferencia de una levadura de fisión, la célula se divide mediante gemación.

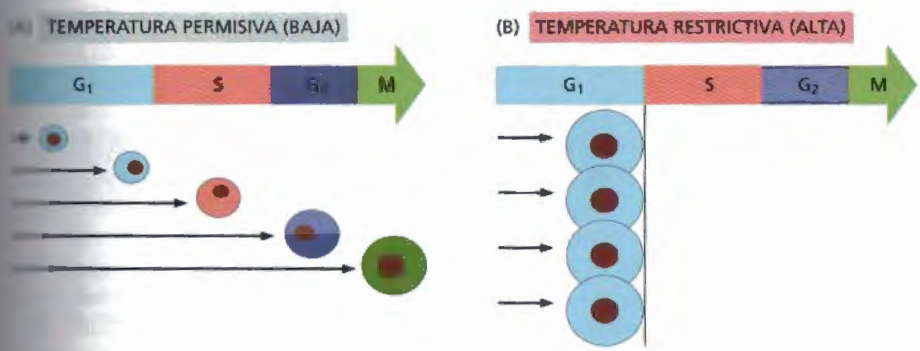


Figura 17-6 Comportamiento de una célula mutante *Cdc* termosensible. (A) A la temperatura permisiva (baja), las células se dividen normalmente y se encuentran en cualquiera de las fases del ciclo (la fase celular se indica por su color). (B) Si se eleva la temperatura hasta que sea lo bastante restrictiva (alta), para que el producto del gen mutado deje de funcionar de forma correcta, las células mutantes continúan progresando a través del ciclo celular hasta que alcanzan un punto determinado que no pueden superar (en este ejemplo, el inicio de la fase S). Dado que los mutantes *Cdc* todavía continúan creciendo, se vuelven demasiado grandes. Por el contrario, si las células que carecen de mutaciones del tipo *Cdc* fueran deficientes en un proceso necesario durante todo el ciclo para la biosíntesis y el crecimiento (como la producción de ATP), se detendrían al azar en cualquier etapa del ciclo celular, según el momento en el que se agotaran sus reservas bioquímicas (no se muestra).

esenciales del sistema de control del ciclo celular. Los genes afectados por algunas de estas mutaciones se llaman **genes del ciclo de división celular** o **genes *Cdc***. Muchas de estas mutaciones detienen a las células en un punto específico del ciclo celular, lo cual indica que el producto del gen normal es necesario para que superen ese punto.

En cambio, un mutante que no puede completar el ciclo celular no puede propagarse. Por este motivo, los mutantes *Cdc* sólo pueden ser seleccionados y mantenidos si su fenotipo es *condicional*, es decir, sólo si el producto del gen mutado no es funcional en ciertas condiciones específicas. La mayoría de mutaciones condicionales del ciclo celular son *mutaciones termosensibles*, en las cuales la proteína mutada no es funcional a altas temperaturas, pero a bajas temperaturas funciona lo suficientemente bien como para permitir la división celular. Un mutante *Cdc* termosensible se puede propagar a baja temperatura (*condición permisiva*) para que luego al aumentar la temperatura (*condición restrictiva*) se desactive la función del gen mutado. En la temperatura más elevada, las células continúan progresando a través del ciclo celular hasta que alcanzan el punto en el que la función del gen mutado es imprescindible para seguir progresando y en ese punto concreto se detienen (**Figura 17-6**). En las levaduras de gemación, podemos detectar una detención del ciclo celular de este tipo observando las células: la presencia o ausencia de una yema, así como su tamaño, indican el punto del ciclo en el que se ha detenido el mutante (**Figura 17-7**).

El control del ciclo celular se puede analizar bioquímicamente en embriones de animales

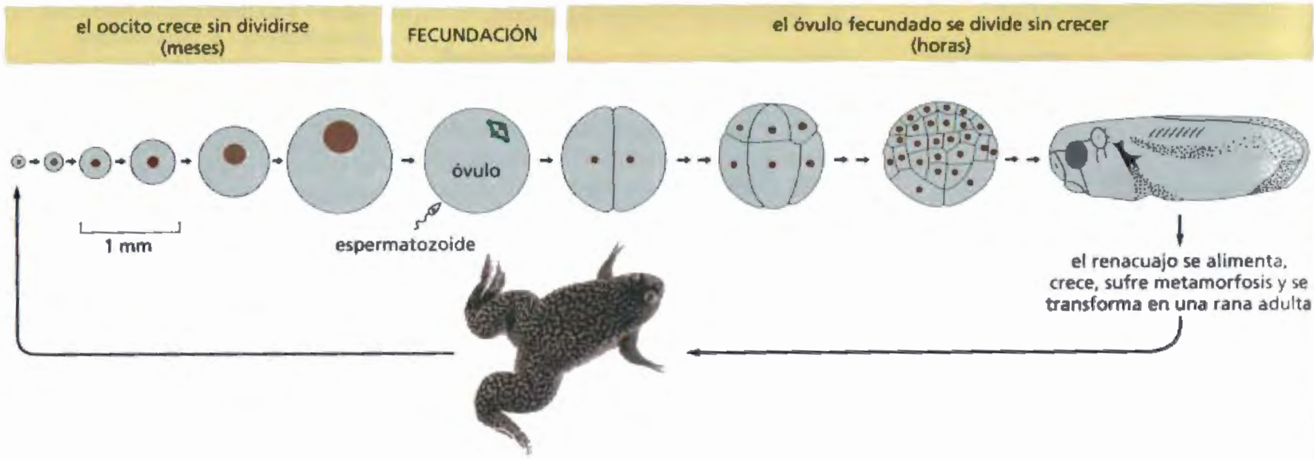
Las características bioquímicas del ciclo celular se analizan con facilidad en los óvulos gigantes de muchos animales tras su fecundación, los cuales contienen grandes reservas de las proteínas necesarias para la división celular. Por ejemplo, el óvulo de la rana *Xenopus* mide un poco más de un 1 mm de diámetro y contiene 100.000 veces más citoplasma que una célula de tamaño medio del cuerpo humano (**Figura 17-8**). La fecundación de los óvulos de



Figura 17-8 Un óvulo maduro de *Xenopus* preparado para la fecundación. La mancha pálida próxima al ápice muestra la situación del núcleo, el cual ha desplazado al pigmento *marrón* de la capa superficial del citoplasma del óvulo. Aunque no se puede observar en la imagen, la envoltura nuclear se ha disgregado durante el proceso de maduración del óvulo. (Cortesía de Tony Mills.)



Figura 17-7 Morfología de las levaduras de gemación cuyo ciclo está detenido por una mutación *Cdc*. (A) En una población normal de levaduras en proliferación, las yemas varían de tamaño según la etapa del ciclo celular. (B) En un mutante *Cdc15* que crece a la temperatura restrictiva, las células finalizan la anafase pero no pueden completar la salida de la mitosis y la citocinesis. En consecuencia, se detienen uniformemente presentando yemas grandes, las cuales son características del final de la mitosis. (Cortesía de Jeff Ubersax.)



Xenopus desencadena una secuencia muy rápida de divisiones celulares, denominadas *divisiones de segmentación*, en las cuales la célula gigante se divide, sin crecer, generando un embrión que contiene miles de células más pequeñas (**Figura 17–9**). <ATTT> Después de la primera división, de unos 90 minutos, las 11 divisiones siguientes se suceden, más o menos sincrónicamente, a intervalos de 30 minutos, produciéndose alrededor de 4096 (2^{12}) células en 7 horas. Cada ciclo se divide en las fases S y M de unos 15 minutos cada una, sin fases G_1 o G_2 aparentes.

Así, las células de los embriones en desarrollo de *Xenopus*, las de la almeja *Spisula* y las de la mosca de la fruta *Drosophila* pueden realizar divisiones muy rápidas en ausencia de crecimiento o de muchos de los mecanismos de control (se describe después) que funcionan en los ciclos celulares más complejos. Por lo tanto, estos *primeros ciclos celulares embrionarios* revelan el funcionamiento del sistema de control del ciclo celular simplificado hasta el mínimo imprescindible, manteniendo los requisitos más fundamentales: la duplicación del genoma y su segregación en dos células hijas. El gran tamaño de estos embriones es otra ventaja para el análisis del ciclo celular. Es relativamente fácil inyectar fármacos dentro de un óvulo fecundado y determinar su efecto sobre la progresión del ciclo celular. También es posible obtener citoplasma casi puro de óvulos de *Xenopus* y reconstituir muchos acontecimientos del ciclo celular en un tubo de ensayo (**Figura 17–10**). En tales extractos celulares, podemos observar y manipular acontecimientos del ciclo celular en condiciones muy simplificadas y controlables.

Figura 17–9 Crecimiento del oocito y segmentación del zigoto de *Xenopus*. El oocito crece sin dividirse durante muchos meses en el ovario de una rana y al final madura en forma de un óvulo (se describe en el Capítulo 21). Una vez fecundado, el óvulo se divide muy rápido –inicialmente a una velocidad de un ciclo de división cada 30 minutos– y forma en uno o dos días un renacuajo pluricelular. Las células se hacen progresivamente más pequeñas en cada división y el embrión mantiene el mismo tamaño. El crecimiento sólo comienza cuando el renacuajo empieza a alimentarse. Todos los dibujos de la línea superior están a la misma escala (pero la rana del nivel inferior no).

El control del ciclo celular se puede estudiar en células de mamífero en cultivo

En un mamífero intacto no es fácil observar células individualizadas. Por esta razón, en la mayoría de estudios sobre el control del ciclo celular de mamíferos se utilizan células que se

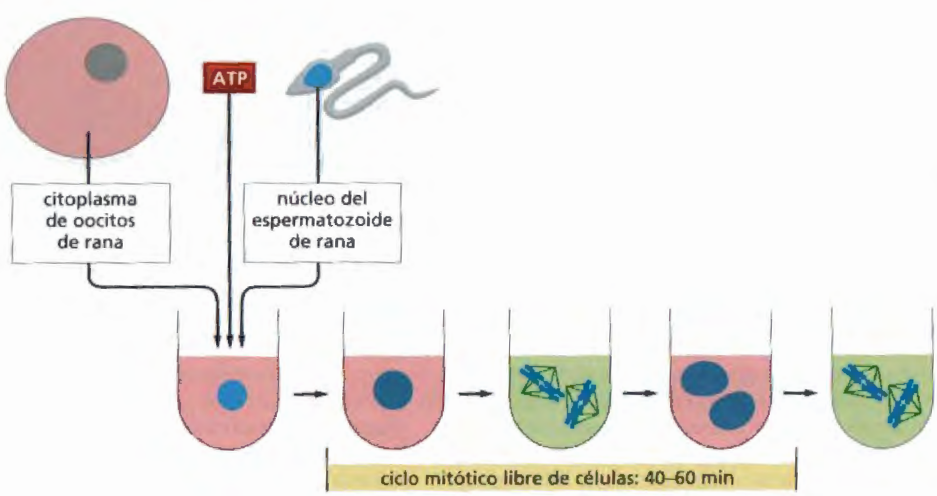


Figura 17–10 Estudio del ciclo celular en un sistema libre de células. Se realiza una centrifugación suave para lisar una gran cantidad de oocitos de rana y separar el citoplasma de los otros componentes celulares. Se recoge el citoplasma no diluido y se le añade un núcleo de espermatozoide junto con ATP. El núcleo del espermatozoide se descondensa y experimenta repetidos ciclos de replicación del DNA y de mitosis, lo que indica que el sistema de control del ciclo celular es operativo en este extracto citoplasmático libre de células.

han aislado de tejidos normales o de tumores y que se hacen crecer en placas de cultivo de plástico en presencia de nutrientes esenciales y de otros factores (**Figura 17–11**). No obstante, existe una complicación. Cuando las células procedentes de tejidos normales de mamífero se cultivan en condiciones estándar, con frecuencia dejan de proliferar después de un número limitado de ciclos de división. Los fibroblastos humanos, por ejemplo, dejan de dividirse permanentemente después de 25-40 divisiones, un proceso denominado *senescencia celular replicativa*, sobre el cual trataremos más adelante.

Las células de mamífero sufren a veces mutaciones que les permiten proliferar de forma indefinida en cultivo como *líneas celulares* "inmortalizadas". Aunque no son células normales, dichas líneas celulares se utilizan con frecuencia en los estudios del ciclo celular –y en biología celular en general– ya que proporcionan una fuente ilimitada de células genéticamente homogéneas. Además, estas células son lo bastante grandes como para permitir observaciones citológicas detalladas de los acontecimientos del ciclo celular y son adecuadas para el análisis bioquímico de las proteínas implicadas en el control del ciclo celular.

Los estudios de células en cultivo de mamíferos han sido sobre todo útiles para analizar los mecanismos moleculares que gobiernan el control de la proliferación celular en los organismos pluricelulares. Estos estudios son importantes no sólo para entender el control normal del número de células de los tejidos sino también para comprender la pérdida de estos controles en el cáncer (véase Capítulo 20).

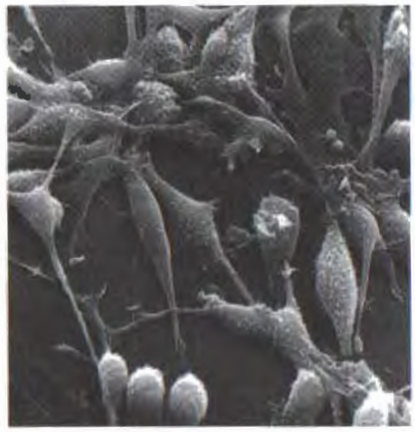


Figura 17–11 Células de mamífero proliferando en cultivo. Las células de esta electromicrografía de barrido son fibroblastos de rata. (Cortesía de Guenter Albrecht-Buehler.)

La progresión del ciclo celular se puede estudiar de varias formas

¿Cómo es posible saber en qué etapa del ciclo celular se encuentra una célula animal? Una forma sencilla es observar células vivas con un microscopio. La observación de una población de células de mamífero que proliferan en cultivo revela que una fracción se han redondeado y están en mitosis (véase Figura 17–11). Otras se pueden observar en el proceso de la citocinesis. Podemos conseguir indicios adicionales sobre la posición del ciclo celular con colorantes fluorescentes que se unen al DNA (los cuales revelan la condensación de los cromosomas en la mitosis) o con anticuerpos que reconocen componentes celulares específicos como los microtúbulos (revelando el huso mitótico). Asimismo, las células que están en la fase S se pueden identificar en el microscopio si les suministramos moléculas visualizables que se incorporan en el DNA recién sintetizado, como el análogo artificial de la timidina denominado bromodeoxiuridina (BrdU). Los núcleos celulares que han incorporado BrdU se visualizan mediante el marcaje con anticuerpos anti-BrdU (**Figura 17–12**).

Por lo general, en una población de células que están proliferando rápida pero asincrónicamente, cerca del 30-40% de ellas se encuentra en algún punto de la fase S y quedarán marcadas por un pulso breve de BrdU. A partir de la proporción de células de dicha población que se ha marcado (*índice de marcaje*), podemos estimar la duración de la fase S como una fracción de la duración total del ciclo celular. Asimismo, a partir de la proporción de células en mitosis (*índice mitótico*), se calcula la duración de la fase M. Además, dando un pulso de BrdU y dejando que las células continúen progresando a través del ciclo celular durante periodos de tiempo determinados, podemos determinar cuánto tiempo tarda una célula en fase S en progresar a través de G_2 hasta la fase M, a través de la fase M hasta G_1 y, finalmente, a través de G_1 hasta volver a la fase S.

Otra forma de determinar la etapa que una célula ha alcanzado en el ciclo celular es midiendo su contenido de DNA, el cual se duplica durante la fase S. Esta estrategia se ve facilitada en gran manera mediante el uso de colorantes fluorescentes que se unen al DNA y un *citómetro de flujo*, el cual permite analizar grandes cantidades de células rápida y automáticamente (**Figura 17–13**). También podemos utilizar la citometría de flujo para determinar la duración de las fases G_1, S y G_2 + M, siguiendo durante el tiempo a una población de células con el DNA marcado, seleccionada previamente por encontrarse todas las células en una misma fase del ciclo celular: las mediciones del contenido de DNA de dicha población celular sincronizada revelan cómo progresan las células a través del ciclo.

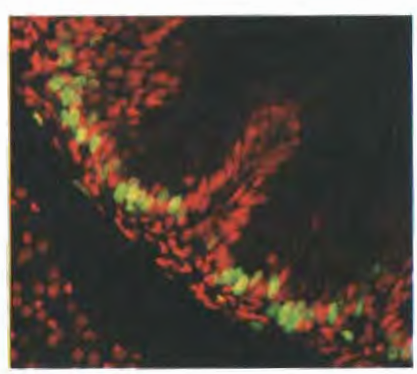


Figura 17–12 Marcaje de células en fase S. Micrografía de inmunofluorescencia de células epiteliales del intestino del pez cebra marcadas con BrdU. El pez fue expuesto a BrdU, después de lo cual el tejido se fijó y se procesó para el marcaje con anticuerpos fluorescentes anti-BrdU (*verde*). Todas las células están teñidas con un colorante fluorescente *rojo*. (Cortesía de Cécile Crosnier.)

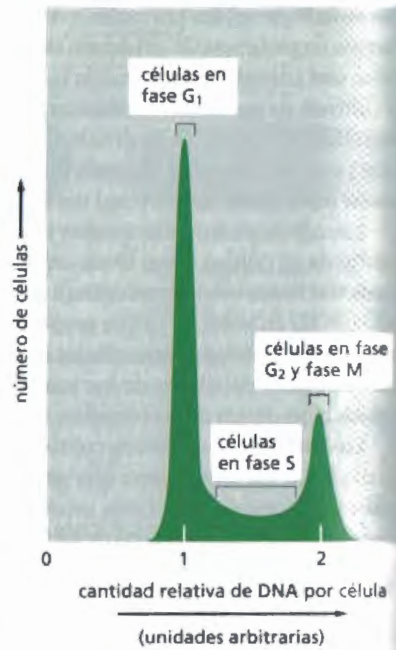


Figura 17–13 Análisis del contenido de DNA con un citómetro de flujo. Esta gráfica muestra los resultados típicos que se obtienen en una población celular en proliferación cuando se determina el contenido de DNA de cada una de sus células mediante un citómetro de flujo. (El citómetro de flujo, también llamado separador de células activadas por fluorescencia o FACS, también se utiliza para clasificar células en función de su fluorescencia –véase Figura 8–2.) Las células analizadas fueron teñidas con un colorante que se vuelve fluorescente cuando se une al DNA, de modo que la cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de DNA de cada célula. Las células se reparten en tres categorías: células que tienen un complemento de DNA no replicado y, por lo tanto, se encuentran en G_1; células que han replicado todo el DNA (duplican el contenido de DNA de G_1) y se encuentran en la fase G_2 o M, y células que tienen una cantidad intermedia de DNA y se encuentran en la fase S. En el caso que se ilustra, la distribución de las células indica que hay más células en G_1 que en las fases G_2 + M, lo que indica que en esta población la duración de G_1 es superior a la de G_2 + M.

Resumen

Por lo general, la división celular comienza con la duplicación del contenido de la célula, seguido por la distribución de esos contenidos en dos células hijas. La duplicación de los cromosomas se produce durante la fase S del ciclo celular, mientras que la mayoría de los otros componentes celulares se duplican continuamente durante todo el ciclo. Durante la fase M, los cromosomas replicados se segregan en núcleos individuales (mitosis) y entonces la célula se divide en dos (citocinesis). Cuando diferentes señales intracelulares y extracelulares regulan la progresión del ciclo celular, la fase S y la fase M suelen estar separadas por fases intercaladas denominadas G_1 y G_2. El control y la organización del ciclo celular se han conservado muy bien durante la evolución y los estudios de una gran variedad de sistemas –incluyendo levaduras, embriones de animales y células de mamífero en cultivo– han conducido a una visión unificada del control del ciclo celular eucariota.

EL SISTEMA DE CONTROL DEL CICLO CELULAR

Durante muchos años los biólogos celulares observaron, como si se tratara de una suerte de espectáculo de marionetas, la síntesis del DNA, la mitosis y la citocinesis sin saber qué había detrás del telón controlando estos procesos. El sistema de control del ciclo celular era simplemente una caja negra dentro de la célula. Ni siquiera se sabía si existía un sistema de control independiente o si los procesos de síntesis de DNA, mitosis y citocinesis se autocontrolaban de algún modo. Hacia finales de la década de 1980 se realizó un descubrimiento fundamental al identificar las proteínas clave del sistema de control, junto a la constatación de que eran distintas de las proteínas que llevan a cabo los procesos de la replicación del DNA, la segregación de los cromosomas, etc.

En esta sección, se tratarán los principios básicos sobre los que trabaja el sistema de control del ciclo celular. Después, estudiaremos las proteínas que forman parte del sistema de control y cómo colaboran programando y coordinando los acontecimientos del ciclo celular.

El sistema de control del ciclo celular desencadena los principales acontecimientos del ciclo celular

El **sistema de control del ciclo celular** funciona de forma muy parecida a como lo hace un temporizador u oscilador que desencadena los acontecimientos del ciclo celular en una secuencia determinada (**Figura 17–14**). En su forma más simple –como se ha indicado en los sencillos ciclos celulares embrionarios mencionados– el sistema de control es como un temporizador programado de forma estricta, que proporciona una cantidad fija de tiempo para que se realice cada uno de los procesos del ciclo celular. En estas células, el sistema de control es independiente de los acontecimientos que controla, de manera que sus mecanismos de cronometraje siguen funcionando aunque esos acontecimientos fallen. En cambio, en la mayoría de células, el sistema de control reacciona a la información procedente de los propios procesos que controla. Por ejemplo, los sensores detectan que la síntesis del DNA ha finalizado, de modo que si algo funciona mal impiden que ese proceso finalice, enviando señales al sistema de control para que retrase la progresión hacia la fase M. Estas demoras proporcionan tiempo para que la maquinaria sea reparada y evitan el desastre que podría



Figura 17–14 Control del ciclo celular. El sistema de control del ciclo celular desencadena los procesos esenciales del ciclo celular –como la replicación del DNA, la mitosis y la citocinesis. El sistema de control se representa aquí como un brazo central –el controlador– que gira en el sentido de las agujas del reloj, desencadenando los procesos básicos cuando alcanza puntos de control específicos del dial externo. La información sobre la finalización de los acontecimientos del ciclo celular, así como las diversas señales que proceden del entorno, pueden provocar que el sistema de control detenga el ciclo en estos puntos de control. Los puntos de control más importantes se han destacado en *recuadros amarillos*.

ocurrir si el ciclo progresara prematuramente hacia la etapa siguiente y, por ejemplo, se segregaran cromosomas replicados de forma incompleta.

El sistema de control del ciclo celular se basa en una serie de interruptores bioquímicos conectados, cada uno de los cuales inicia un acontecimiento específico del ciclo celular. Este sistema de interruptores posee importantes características técnicas que aumentan la exactitud y la fiabilidad de la progresión del ciclo celular. En primer lugar, por lo general los interruptores son *binarios* (encendido/apagado) y ponen en marcha los acontecimientos de forma completa e irreversible. Por ejemplo, sería sin duda desastroso que procesos como la condensación de los cromosomas o el desensamblaje de la envoltura nuclear se iniciaran pero no se completaran. En segundo, el sistema de control del ciclo celular es extraordinariamente resistente y fiable, en parte porque existen mecanismos auxiliares y otras características que permiten que el sistema funcione con eficacia bajo diversas circunstancias incluso aunque algunos componentes fallen. Por último, el sistema de control es muy flexible y se puede modificar adaptándose a tipos celulares específicos o respondiendo a señales intracelulares o extracelulares específicas.

En la mayoría de células eucariotas, el sistema de control del ciclo celular desencadena la progresión del ciclo celular en tres transiciones reguladoras principales o **puntos de control** (véase Figura 17–14). El primer punto de control es el Inicio (o el punto de restricción) en las postrimerías de G_1, cuando la célula queda determinada a entrar en el ciclo celular y a duplicar los cromosomas, como se ha mencionado anteriormente. El segundo es el **punto de control G_2/M**, en el que el sistema de control desencadena los acontecimientos mitóticos iniciales que conducen a la alineación de los cromosomas en el huso mitótico durante la metafase. El tercero es la **transición de la metafase a la anafase**, cuando el sistema de control estimula la separación de las cromátidas hermanas, conduciendo a la finalización de la mitosis y la citocinesis. El sistema de control bloquea la progresión a través de cada uno de estos puntos de control si detecta problemas dentro o fuera de la célula. Por ejemplo, si el sistema de control percibe problemas en la finalización de la replicación del DNA mantendrá a la célula en el punto de control G_2/M hasta que estos problemas se hayan resuelto. Asimismo, si las condiciones extracelulares no son las apropiadas para la proliferación celular, el sistema de control bloquea la progresión a través del Inicio e impide así la división celular hasta que las condiciones sean favorables.

El sistema de control del ciclo celular depende de proteínas quinasa dependientes de ciclina (Cdk) que se activan cíclicamente

Los componentes fundamentales del sistema de control del ciclo celular son miembros de una familia de proteínas quinasa denominadas **quinasas dependientes de ciclina (Cdk:**

cyclin-dependent kinases). La actividad de estas quinasas aumenta y disminuye a medida que la célula progresa a través del ciclo, provocando cambios cíclicos en la fosforilación de proteínas intracelulares que inician o regulan los principales acontecimientos del ciclo celular. Por ejemplo, un incremento de la actividad Cdk en el punto de control G_2/M aumenta la fosforilación de las proteínas que controlan la condensación de los cromosomas, la desorganización de la envoltura nuclear, el ensamblaje del huso mitótico y otros acontecimientos que suceden al comienzo de la mitosis.

Los cambios cíclicos de la actividad Cdk están regulados por una compleja trama de enzimas y de otras proteínas que regulan estas quinasas. Los reguladores más importantes de las Cdk son las proteínas denominadas **ciclinas**. Las Cdk, como su nombre indica, dependen de las ciclinas para realizar su actividad: a no ser que estén unidas a una ciclina, no tienen actividad proteína quinasa (**Figura 17–15**). Originalmente, las ciclinas recibieron este nombre porque experimentan un ciclo de síntesis y degradación en cada ciclo celular. Por el contrario, los niveles de las proteínas Cdk son constantes, al menos en los ciclos celulares más sencillos. Los cambios cíclicos en los niveles proteicos de las ciclinas producen variaciones cíclicas en el ensamblaje y activación de los **complejos Cdk-ciclina**; esta activación sucesiva desencadena los acontecimientos del ciclo celular.



Figura 17–15 Dos componentes clave del sistema de control del ciclo celular. Cuando la ciclina forma un complejo con la Cdk, la proteína quinasa se activa desencadenando acontecimientos específicos del ciclo celular. En ausencia de la ciclina, la Cdk es inactiva.

Existen cuatro clases de ciclinas, cada una de las cuales está definida por la etapa del ciclo celular en la que se unen a las Cdk y actúan. Todas las células eucariotas necesitan tres de estas clases (**Figura 17–16**):

1. Las **ciclinas G_1/S** activan las Cdk en las postrimerías de G_1 y así ayudan a desencadenar la progresión a través del Inicio, quedando la célula determinada a entrar en el ciclo celular. Sus niveles descienden en la fase S.
2. Las **ciclinas S** se unen a las Cdk poco después de la progresión a través del Inicio y ayudan a estimular la duplicación de los cromosomas. Los niveles de las ciclinas S permanecen elevados hasta la mitosis y estas ciclinas también contribuyen al control de algunos acontecimientos mitóticos iniciales.
3. Las **ciclinas M** activan las Cdk que estimulan la entrada en la mitosis en el punto de control G_2/M. Las ciclinas M son degradadas hacia la mitad de la mitosis mediante mecanismos que se describirán más adelante.

En la mayoría de células, una cuarta clase de ciclinas, las **ciclinas G_1**, ayudan a controlar las actividades de las ciclinas G_1/S, las cuales regulan la progresión a través del Inicio en las postrimerías de G_1.

En las levaduras, una sola proteína Cdk se une a todas las clases de ciclinas y desencadena diferentes acontecimientos del ciclo celular cambiando de ciclina en las diferentes etapas del ciclo. Por el contrario, en las células de los vertebrados existen cuatro Cdk. Dos de ellas interactúan con las ciclinas G_1, una con las ciclinas G_1/S y con las ciclinas S, y otra con las ciclinas M. En este capítulo, denominaremos a los diferentes complejos Cdk-ciclina sencillamente como **Cdk-G_1**, **Cdk-G_1/S**, **Cdk-S** y **Cdk-M**. En la **Tabla 17–1** se indican los nombres de las diferentes Cdk y ciclinas.

¿Cómo desencadenan los diferentes complejos Cdk-ciclina los diversos acontecimientos del ciclo celular? La respuesta parece ser que, al menos en parte, la ciclina no sólo activa su Cdk asociada sino que también la dirige hacia sus proteínas diana específicas. Por consiguiente, cada complejo Cdk-ciclina fosforila un grupo diferente de proteínas sustrato. Además, un mismo complejo Cdk-ciclina también puede inducir efectos distintos en momentos

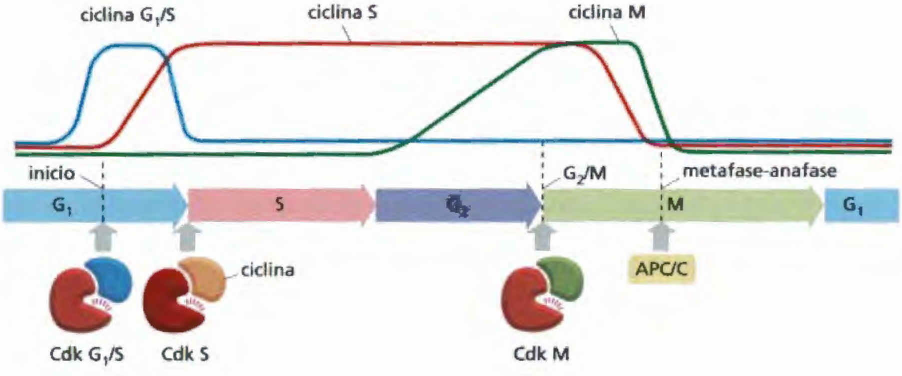


Figura 17–16 Complejos Cdk-ciclina del sistema de control del ciclo celular. Las concentraciones de los tres principales tipos de ciclinas oscilan durante el ciclo celular, mientras que las concentraciones de las Cdk (no se muestra) no cambian y sobrepasan a las de las ciclinas. En las postrimerías de G_1, los niveles crecientes de las ciclinas G_1/S promueven la formación de los complejos Cdk-G_1/S que desencadenan la progresión a través del punto de control del Inicio. Los complejos Cdk-S se forman al comienzo de la fase S y desencadenan la replicación del DNA, así como algunos acontecimientos mitóticos tempranos. Los complejos Cdk-M se forman durante G_2 pero se mantienen en un estado inactivo mediante mecanismos que se describirán más adelante. Estos complejos se activan al final de la fase G_2 y desencadenan los acontecimientos iniciales de la mitosis. Una proteína reguladora distinta, el APC/C, del cual trataremos después, inicia la transición de la metafase a la anafase.

Tabla 17–1 Principales ciclinas y Cdk presentes en los vertebrados y en la levadura de gemación

COMPLEJO CDK-CICLINA	VERTEBRADOS CICLINA	VERTEBRADOS CDK ASOCIADA	LEVADURA DE GEMACIÓN CICLINA	LEVADURA DE GEMACIÓN CDK ASOCIADA
Cdk-G_1	ciclina D*	Cdk4, Cdk6	Cln3	Cdk1**
Cdk-G_1/S	ciclina E	Cdk2	Cln1, 2	Cdk1
Cdk-S	ciclina A	Cdk2, Cdk1**	Clb5, 6	Cdk1
Cdk-M	ciclina B	Cdk1	Clb1, 2, 3, 4	Cdk1

* En mamíferos hay tres ciclinas D (ciclinas D1, D2 y D3).
** El nombre original de Cdk1 fue Cdc2 tanto en vertebrados como en la levadura de fisión y Cdc28 en la levadura de gemación.

diferentes del ciclo celular, probablemente porque la accesibilidad de algunos de los sustratos de la Cdk cambia durante el ciclo celular. Por ejemplo, determinadas proteínas que participan en la mitosis sólo pueden fosforilarse en G_2.

Los estudios de las estructuras tridimensionales de las Cdk y de las ciclinas han revelado que, en ausencia de la ciclina, el sitio activo de la Cdk se encuentra parcialmente tapado por una región de la proteína, como una piedra que bloquea la entrada de una cueva (**Figura 17–17A**). La unión de la ciclina hace que esa región se aparte del sitio activo, provocando la activación parcial de la enzima Cdk (Figura 17–17B). La activación total del complejo Cdk-ciclina sucede después, cuando una quinasa distinta, la **quinasa activadora de Cdk** (**CAK**: ***Cdk-activating kinase***), fosforila un aminoácido próximo a la entrada al sitio activo de la Cdk. Esta fosforilación induce un pequeño cambio conformacional que aumenta la actividad de la Cdk y permite que la quinasa fosforile eficazmente sus proteínas diana desencadenando acontecimientos específicos del ciclo celular (Figura 17–17C). <TAGA>

Las fosforilaciones inhibidoras y las proteínas inhibidoras de Cdk (CKI) pueden inhibir la actividad Cdk

El aumento y descenso de los niveles de las ciclinas es el principal determinante de la actividad Cdk en el ciclo celular. No obstante, otros mecanismos regulan con precisión la actividad Cdk en etapas específicas del ciclo celular.

La fosforilación de dos aminoácidos situados sobre el sitio activo de la quinasa inhibe la actividad de los complejos Cdk-ciclina. La fosforilación de estos residuos por la proteína quinasa denominada **Wee1** inhibe la actividad Cdk, mientras que la desfosforilación de estos residuos por una fosfatasa llamada **Cdc25** aumenta la actividad Cdk (**Figura 17–18**). Más adelante veremos que estos mecanismos reguladores son particularmente importantes en el control de la actividad Cdk-M durante el inicio de la mitosis.

Los complejos Cdk-ciclina también se regulan por la unión de **proteínas inhibidoras de Cdk** (**CKI**: ***Cdk inhibitor proteins***). La estructura tridimensional de un complejo Cdk-ciclina-CKI muestra que la unión de la CKI induce una gran reorganización de la estructura

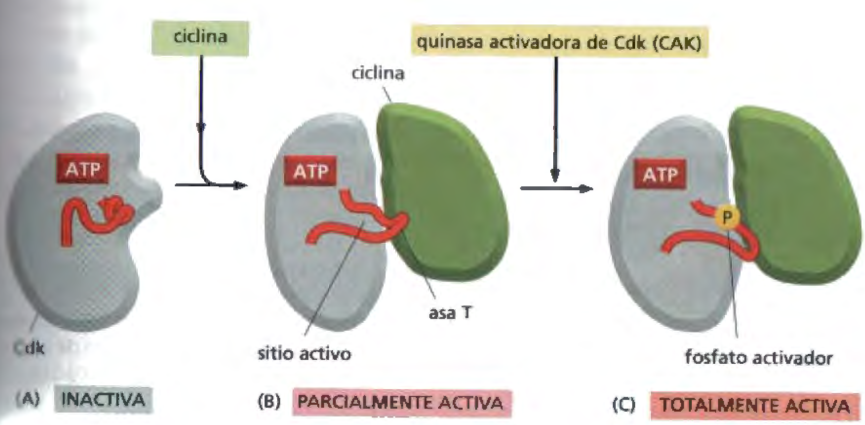


Figura 17–17 Bases estructurales de la activación de las Cdk. Estos esquemas están basados en la estructura tridimensional de la Cdk2 humana, obtenida mediante cristalografía de rayos X. Se indica la localización del ATP unido. La enzima se muestra en tres estados. (A) En el estado inactivo, sin la unión de la ciclina, el sitio activo está bloqueado por una región de la proteína llamada asa T (*rojo*). (B) La unión de la ciclina hace que el asa T desaloje el sitio activo, provocando la activación parcial de Cdk2. (C) La fosforilación de Cdk2 (por CAK) en un residuo de treonina localizado en el asa T activa aún más la enzima al cambiar la forma del asa T, mejorando la capacidad de la enzima para unirse a sus sustratos proteicos.

del sitio activo de la Cdk, volviéndola inactiva (**Figura 17–19**). Las células utilizan fundamentalmente las CKI para ayudar a regular las actividades de los complejos Cdk-G_1/S y Cdk-S en las primeras etapas del ciclo celular.

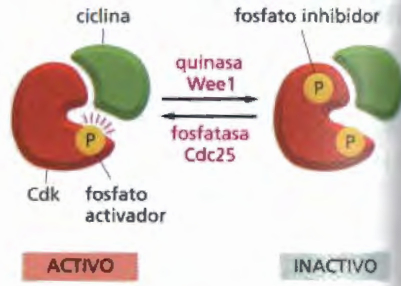


Figura 17–18 Regulación de la actividad Cdk mediante fosforilaciones inhibidoras. El complejo Cdk-ciclina activo se inactiva cuando la quinasa Wee1 fosforila dos residuos contiguos que se encuentran sobre el sitio activo. La eliminación de estos fosfatos por la fosfatasa Cdc25 provoca la activación del complejo Cdk-ciclina. Para simplificar, sólo se muestra un fosfato inhibidor. CAK añade el fosfato activador, como se muestra en la Figura 17–17.

El sistema de control del ciclo celular depende de la proteolisis cíclica

Mientras que la activación de complejos Cdk-ciclina específicos dirige la progresión a través de los puntos de control del Inicio y de G_2/M (véase Figura 17–16), la progresión a través de la transición de la metafase a la anafase no se desencadena mediante la fosforilación de proteínas sino mediante la degradación proteica, conduciendo a las etapas finales de la división celular.

El regulador clave de la transición de la metafase a la anafase es el **complejo promotor de la anafase** o **ciclosoma** (**APC/C**: *anaphase-promoting complex*, o cyclosome), un miembro de la familia de enzimas ubiquitina ligasa. Tal como se describió en el Capítulo 3, muchas de estas enzimas participan en numerosos procesos celulares estimulando la degradación de proteínas reguladoras específicas. Transfieren múltiples copias de la pequeña proteína ubiquitina a proteínas diana específicas, provocando su degradación proteolítica en los proteosomas. Otras ubiquitinas ligasa marcan las proteínas con propósitos diferentes a los de la degradación.

El APC/C cataliza la ubiquitinización y degradación de dos proteínas principales. La primera es la *segurina*, la cual normalmente protege los enlaces proteicos que mantienen unidas a las cromátidas hermanas al comienzo de la mitosis. La degradación de la segurina en la transición de la metafase a la anafase, activa una proteasa que separa las cromátidas hermanas y desencadena la anafase. Las ciclinas S y M son la segunda diana principal del APC/C. Cuando estas ciclinas son degradadas, la mayoría de las Cdk de la célula se inactivan (véase Figura 17–16). Como consecuencia de ello, muchas proteínas fosforiladas por las Cdk desde la fase S hasta el inicio de la mitosis son defosforiladas por diferentes fosfatasas presentes en la célula anafásica. Esta defosforilación de las dianas de las Cdk es necesaria para la finalización de la fase M, incluyendo las últimas etapas de la mitosis y el proceso de la citocinesis. Tras su activación hacia la mitad de la mitosis, el APC/C se mantiene activo en G_1, proporcionando así un periodo estable de inactividad Cdk. Cuando los complejos Cdk-G_1/S se activan a finales de G_1, el APC/C se inactiva, permitiendo así la acumulación de las ciclinas para empezar el siguiente ciclo celular.

El sistema de control del ciclo celular también utiliza otra ubiquitina ligasa denominada **SCF** (en referencia a los nombres de sus tres subunidades). El SCF ubiquitiniza ciertas proteínas CKI a finales de G_1 y facilita en gran medida el control de la activación de Cdk-S y la replicación del DNA.

Aunque tanto el APC/C como el SCF son grandes complejos proteicos que contienen algunos componentes homólogos, su regulación es diferente. La actividad del APC/C cambia durante el ciclo celular, fundamentalmente como consecuencia de su asociación con una subunidad activadora: **Cdc20** durante la anafase o **Cdh1** desde las postrimerías de la mitosis hasta G_1 temprana. Estas subunidades ayudan a que el APC/C reconozca a sus proteínas diana (**Figura 17–20**A). La actividad del SCF también depende de las subunidades denominadas proteínas con caja F, las cuales ayudan a que el complejo reconozca a sus proteínas diana. Sin embargo, a diferencia de la actividad del APC/C, la actividad del SCF es constante durante el ciclo celular. La ubiquitinización mediada por el SCF está regulada por cambios en el estado de fosforilación de sus proteínas diana, ya que las subunidades con caja F sólo reconocen proteínas fosforiladas de forma específica (Figura 17–20B).

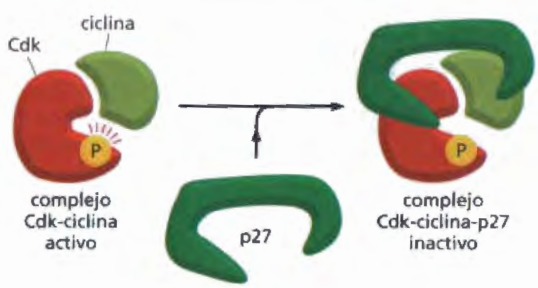


Figura 17–19 Inhibición de un complejo Cdk-ciclina por una CKI. Este esquema está basado en la estructura tridimensional del complejo Cdk2-ciclina A humano unido a la CKI p27, la cual se determinó mediante cristalografía de rayos X. La proteína p27 se une tanto a la ciclina como a la Cdk del complejo, deformando el sitio activo de la Cdk. Además, se inserta en el sitio de unión del ATP e inhibe aún más la actividad de la enzima.

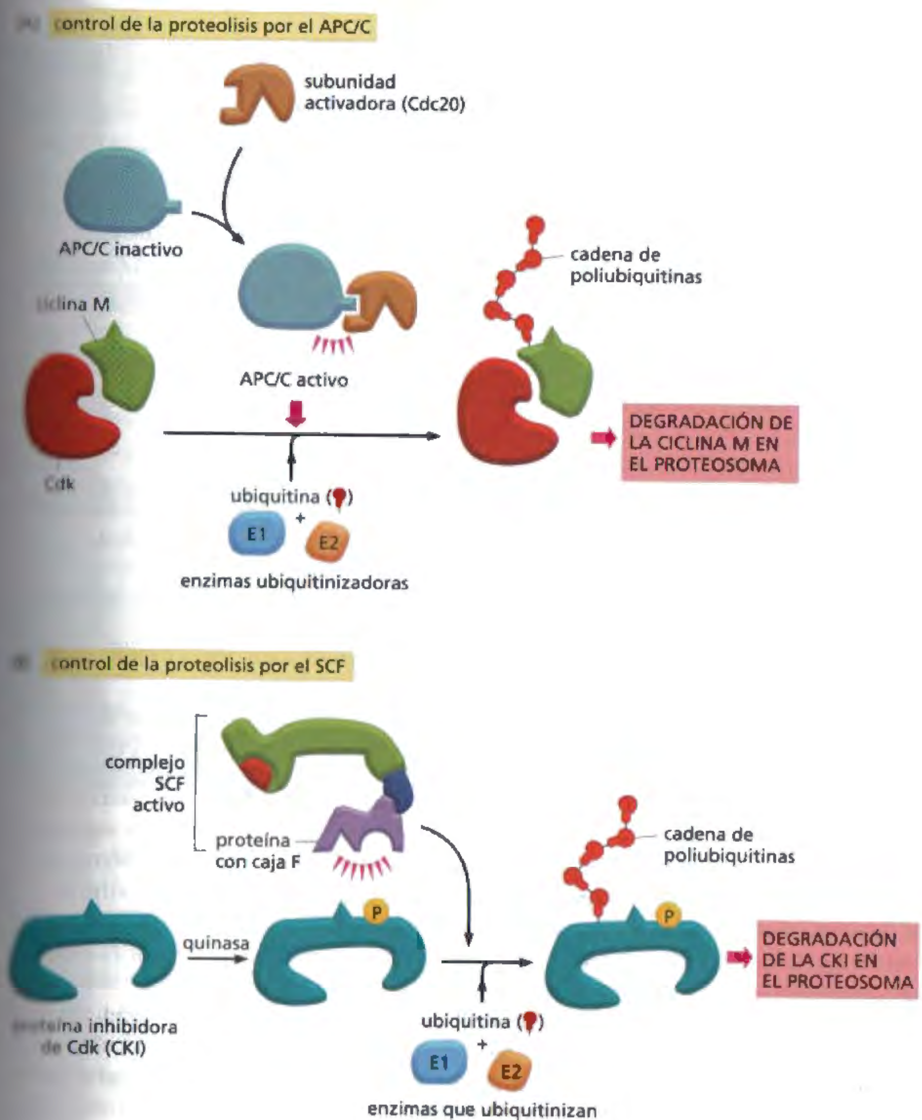


Figura 17-20 Control de la proteolisis por el APC/C y el SCF durante el ciclo celular. (A) El APC/C se activa durante la fase de la mitosis al asociarse con la subunidad activadora Cdc20, que reconoce secuencias específicas de aminoácidos de la ciclina M y de otras proteínas diana. Con la colaboración de dos proteínas adicionales denominadas E1 y E2, el APC/C transfiere numerosas moléculas de ubiquitina a la proteína diana. Entonces, la diana poliubiquitinada es reconocida y degradada en el proteosoma. (B) La actividad de la ubiquitina ligasa SCF depende de las subunidades de unión al sustrato denominadas proteínas con caja F, de las que hay muchos tipos diferentes. La fosforilación de una proteína diana, como la CKI mostrada, permite que la diana sea reconocida por una subunidad específica de la proteína con caja F.

El control del ciclo celular depende de la regulación transcripcional

En el ciclo celular embrionario de la rana que hemos descrito anteriormente, no se produce transcripción génica. El control del ciclo celular depende exclusivamente de mecanismos postranscripcionales que suponen la regulación de las Cdk, de las ubiquitinas ligasa y de sus proteínas diana. Sin embargo, en los ciclos celulares más complejos de la mayoría de tipos celulares, el control transcripcional proporciona un nivel adicional de regulación. Por ejemplo, en la mayoría de células, los cambios en la transcripción génica de las ciclinas ayudan a regular los niveles de ciclina.

Podemos utilizar microchips de DNA (véase Capítulo 8) para analizar los cambios de la expresión génica de todos los genes del genoma a medida que la célula avanza a través del ciclo celular. Los resultados de estos estudios son sorprendentes. Por ejemplo, alrededor del 10% de los genes de la levadura de gemación codifican mRNA cuyos niveles oscilan durante el ciclo celular. Algunos de estos genes codifican proteínas con funciones conocidas en el ciclo celular; en cambio, las funciones de muchos otros se desconocen.

El sistema de control del ciclo celular funciona como una red de interruptores bioquímicos

La **Tabla 17-2** resume algunos de los componentes principales del sistema de control del ciclo celular. Estas proteínas están funcionalmente asociadas y forma una red robusta, que fun-

Tabla 17–2 Resumen de las principales proteínas reguladoras del ciclo celular

NOMBRE GENERAL	FUNCIONES Y COMENTARIOS
Proteínas quinasa y proteínas fosfatasa que modifican las Cdk	
quinasa activadora de Cdk (CAK)	fosforila un sitio activador de las Cdk
quinasa Wee1	fosforila sitios inhibidores de las Cdk; implicada sobre todo en la inhibición de la actividad de Cdk1 antes de la mitosis
fosfatasa Cdc25	elimina fosfatos inhibidores de las Cdk; tres miembros de la familia (Cdc25A, B, C) en mamíferos; implicada principalmente en la regulación de la actividad de Cdk1 al comienzo de la mitosis
Proteínas inhibidoras de Cdk (CKI)	
Sic1 (levadura de gemación)	inhibe la actividad de Cdk1 en G_1; la fosforilación por Cdk1 al final de G_1 provoca su degradación
p27 (mamíferos)	inhibe las actividades Cdk-G_1/S y Cdk-S en G_1; contribuye a que las células abandonen el ciclo celular cuando se diferencian terminalmente; la fosforilación por Cdk2 induce su ubiquitinización por el SCF
p21 (mamíferos)	inhibe las actividades Cdk-G_1/S y Cdk-S como respuesta al daño en el DNA
p16 (mamíferos)	inhibe la actividad Cdk-G_1 en G_1; a menudo inactivada en el cáncer
Ubiquitina ligasas y sus activadores	
APC/C	cataliza la ubiquitinización de proteínas reguladoras implicadas principalmente en la salida de la mitosis, incluyendo la segurina y las ciclinas M y S; regulado a través de la asociación con subunidades activadoras
Cdc20	subunidad activadora del APC/C en todas las células; desencadena la activación inicial del APC/C en la transición de la metafase a la anafase; estimulado por la actividad Cdk-M
Cdh1	subunidad activadora del APC/C que mantiene la actividad del APC/C después de la anafase y durante toda la fase G_1; inhibido por la actividad Cdk
SCF	cataliza la ubiquitinización de proteínas reguladoras implicadas en el control de G_1, incluyendo algunas CKI (Sic1 en la levadura de gemación, p27 en mamíferos); la fosforilación de las proteínas diana es con frecuencia necesaria para esta actividad

ciona esencialmente de forma autónoma activando una serie de interruptores bioquímicos, cada uno de los cuales desencadena un acontecimiento específico del ciclo celular.

Cuando las condiciones para la proliferación celular son las adecuadas, diversas señales externas e internas estimulan la activación del complejo Cdk-G_1, el cual induce sucesivamente la expresión de los genes que codifican las ciclinas G_1/S y S. La activación resultante de Cdk-G_1/S posibilita la progresión a través del punto de control del Inicio. Mediante mecanismos que se analizarán más adelante, Cdk-G_1/S desencadena una oleada de actividad Cdk-S, la cual inicia la duplicación de los cromosomas en la fase S y también contribuye en algunos de los acontecimientos iniciales de la mitosis. Después, la activación de Cdk-M desencadena la progresión a través del punto de control G_2/M y los acontecimientos de las primeras etapas de la mitosis, conduciendo a la alineación de las cromátidas hermanas en el ecuador del huso mitótico. Finalmente, el APC/C, junto a su activador Cdc20, induce la degradación de la segurina y de las ciclinas en la transición de la metafase a la anafase, desencadenando así la segregación de las cromátidas hermanas y la finalización de la mitosis (**Figura 17–21**). Cuando la mitosis finaliza, numerosos mecanismos colaboran para inhibir la actividad Cdk después de la mitosis, lo que resulta en un periodo G_1 estable, como trataremos más adelante. Tras esta exposición preliminar, ya podemos tratar estas etapas del ciclo celular con más detalle, empezando con la fase S.

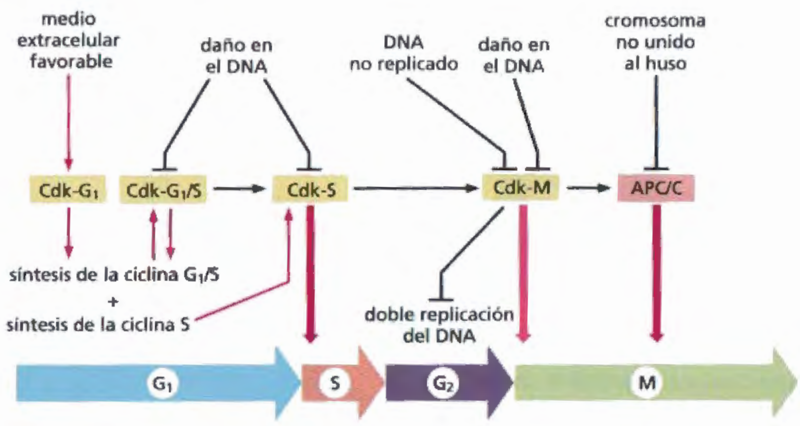


Figura 17–21 Visión de conjunto del sistema de control del ciclo celular. El núcleo del sistema de control del ciclo celular se compone de una serie de complejos Cdk-ciclina (*amarillo*). Como se describe con más detalle después, la actividad de cada complejo también está influida por varios mecanismos inhibidores, que proporcionan información sobre el medio extracelular, el daño celular y los acontecimientos del ciclo celular inacabados (*arriba*). Estos mecanismos no se hallan en todos los tipos celulares; por ejemplo, muchos de ellos no se encuentran en los primeros ciclos celulares embrionarios.

Resumen

El sistema de control del ciclo celular desencadena los acontecimientos del ciclo celular y asegura que estos procesos se produzcan en el momento adecuado y en el orden correcto. El sistema de control reacciona a varias señales intracelulares y extracelulares y detiene el ciclo si la célula no puede completar un proceso esencial del ciclo celular o se encuentra con condiciones ambientales o intracelulares desfavorables.

Los componentes clave del sistema de control del ciclo celular son las proteínas quinasa dependientes de ciclina (Cdk), las cuales dependen de las subunidades ciclina para su actividad. Las oscilaciones de la actividad de varios complejos Cdk-ciclina regulan diferentes acontecimientos del ciclo celular. Así, la activación de los complejos Cdk-ciclina de la fase S (Cdk-S) estimula el comienzo de la fase S, mientras que la activación de los complejos Cdk-ciclina de la fase M (Cdk-M) desencadena la mitosis. Los mecanismos que regulan las actividades de los complejos Cdk-ciclina incluyen la fosforilación de la subunidad Cdk, la unión de proteínas inhibidoras de Cdk (CKI), la proteolisis de las ciclinas y los cambios de la transcripción de genes que codifican reguladores de las Cdk. El sistema de control del ciclo celular también depende crucialmente de dos complejos enzimáticos adicionales, las ubiquitina ligasas APC/C y SCF, las cuales catalizan la ubiquitinización y consiguiente degradación de proteínas reguladoras específicas que controlan procesos críticos del ciclo.

FASE S

Los cromosomas lineales de las células eucariotas son ensamblajes inmensos y dinámicos de DNA y proteína; la duplicación es un proceso complejo que ocupa la mayor parte del ciclo celular. No sólo tienen que duplicarse con exactitud las largas moléculas de DNA de cada cromosoma –una hazaña extraordinaria en sí misma– sino que también tiene que reproducirse la cubierta proteica que rodea cada región del DNA, asegurando que las células hijas hereden todas las características de la estructura cromosómica.

El principal acontecimiento de la duplicación de los cromosomas es la replicación del DNA. Cada célula tiene que resolver dos problemas al iniciar y al finalizar la replicación del DNA. Primero, la replicación debe producirse con una precisión extrema, minimizando así el riesgo de mutaciones en la siguiente generación de células. Segundo, cada nucleótido del genoma debe copiarse una vez y sólo una, para evitar los efectos perjudiciales de una amplificación génica. En el Capítulo 5, hemos tratado la sofisticada maquinaria proteica que lleva a cabo la replicación del DNA con asombrosa velocidad y exactitud. En esta sección, se estudiarán los elegantes mecanismos mediante los que el sistema de control del ciclo celular inicia el proceso de la replicación y, a la vez, impide que ocurra más de una vez por ciclo.

Cdk-S inicia la replicación del DNA una vez en cada ciclo

La replicación del DNA comienza en los *orígenes de replicación*, distribuidos en numerosas localizaciones de cada cromosoma. Durante la fase S, la *iniciación* de la replicación del DNA sucede en estos orígenes cuando complejos proteicos especializados (a veces denominados *proteínas iniciadoras*) desenrollan la doble hélice en el origen y cargan las enzimas de replicación del DNA sobre las dos cadenas sencillas patrón. Este fenómeno conduce a la fase de *elongación* de la replicación, cuando la maquinaria de replicación se desplaza desde el origen en sentidos opuestos en dos *horquillas de replicación* (véase Capítulo 5).

Para asegurar que la duplicación de los cromosomas sucede sólo una vez por ciclo celular, la fase de iniciación de la replicación del DNA se divide en dos etapas distintas que se producen en diferentes momentos del ciclo celular. La primera etapa tiene lugar en las postrimerías de la mitosis y el comienzo de G_1, cuando un gran complejo de proteínas iniciadoras, denominado **complejo prerreplicativo**, o **pre-RC** (*pre-replicative complex*), se ensambla en los orígenes de replicación. En ocasiones, esta etapa recibe el nombre de *licencia* de los orígenes de replicación, ya que el inicio de la síntesis de DNA sólo se permite en los orígenes que contienen un pre-RC. La segunda etapa tiene lugar al comienzo de la fase S, cuando determinados componentes del pre-RC nuclean la formación de un complejo proteico mayor denominado **complejo de preiniciación**. Este complejo desenrolla la hélice de DNA y carga las DNA polimerasas y otras enzimas de replicación sobre las cadenas de DNA, iniciando así la síntesis del DNA, como se describió en el Capítulo 5. Una vez que el origen de replicación se ha activado de esta manera, el pre-RC se desensambla y ya no puede volver a ensamblarse en

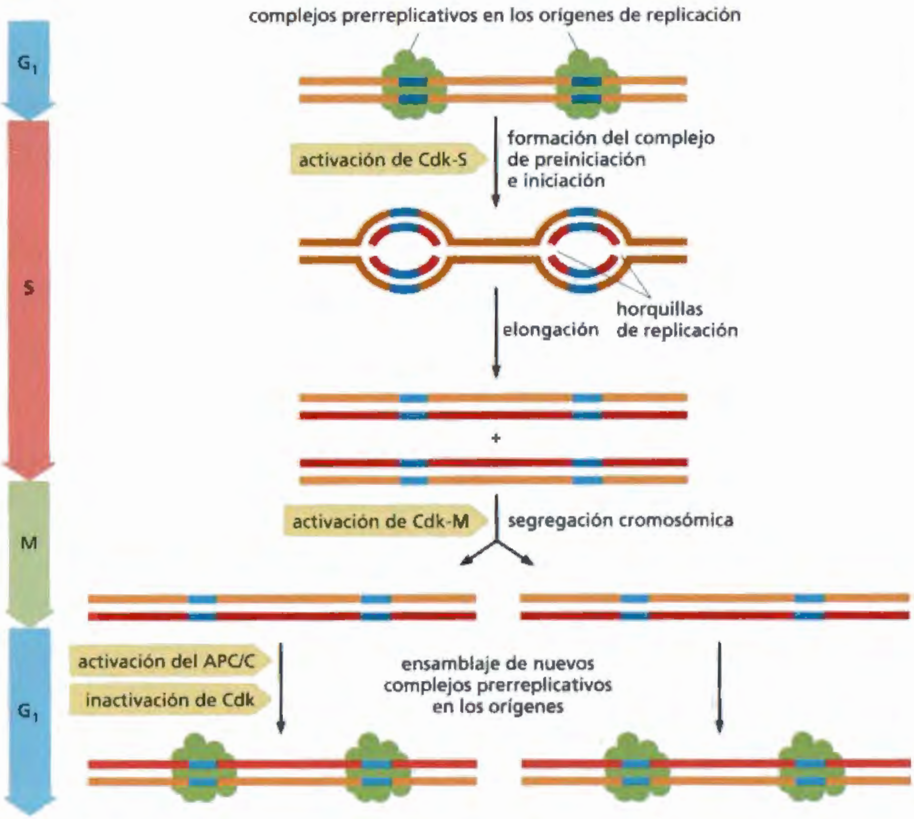


Figura 17–22 Control de la duplicación cromosómica. Los preparativos para la replicación del DNA empiezan en G_1 con el ensamblaje de los complejos prerreplicativos (pre-RC) en los orígenes de replicación. La activación de Cdk-S conduce a la formación de complejos multiproteicos de preiniciación que desenrollan el DNA en los orígenes y comienzan el proceso de replicación del DNA. De cada origen salen dos horquillas de replicación hasta que se duplica todo el cromosoma. Los cromosomas duplicados se segregan después en la fase M. La activación de los orígenes de replicación en la fase S también provoca el desensamblaje de los complejos prerreplicativos, los cuales no se reorganizan en los orígenes hasta la siguiente fase G_1; este mecanismo asegura que cada origen sólo se activa una vez en cada ciclo celular.

el origen hasta la siguiente fase G_1. Por consiguiente, los orígenes sólo se pueden activar una vez por ciclo celular.

El sistema de control del ciclo celular regula tanto el ensamblaje del pre-RC como el ensamblaje del complejo de preiniciación (**Figura 17–22**). El ensamblaje del pre-RC es inhibido por la actividad Cdk y, en la mayoría de células, es activado por el APC/C. Por lo tanto, el ensamblaje del pre-RC sucede sólo en las postrimerías de la mitosis y el comienzo de G_1, cuando la actividad Cdk es baja y la actividad del APC/C es alta. Al comienzo de la fase S, la activación de Cdk-S desencadena la formación del complejo de preiniciación, el cual induce la síntesis del DNA. Además, el pre-RC se desensambla parcialmente. Dado que las actividades de Cdk-S y Cdk-M se mantienen altas (y la actividad del APC/C se mantiene baja) hasta el final de la mitosis, no se pueden ensamblar nuevos complejos pre-RC en los orígenes activados hasta que el ciclo celular haya finalizado.

La **Figura 17–23** muestra alguna de las proteínas que participan en la iniciación de la replicación del DNA. Un elemento clave es un complejo multiproteico de gran tamaño llamado **complejo de reconocimiento del origen** (**ORC**: ***origin recognition complex***), que se une a los orígenes de replicación durante todo el ciclo celular. En las postrimerías de la mitosis y el comienzo de G_1, las proteínas **Cdc6** y **Cdt1** se unen al ORC en los orígenes y colaboran en la carga de un grupo de seis proteínas homólogas denominadas **proteínas Mcm**. El gran complejo resultante es el pre-RC; ahora el origen está licenciado para la replicación.

Las seis proteínas Mcm del pre-RC forman un anillo alrededor del DNA que al parecer actúa como la principal DNA helicasa que desenrolla el DNA en el origen cuando comienza la síntesis del DNA y cuando las horquillas de replicación se desplazan en sentidos opuestos desde el origen. Así, el principal propósito del pre-RC es cargar la helicasa que desempeñará un papel fundamental en el siguiente proceso de replicación del DNA.

Una vez que el pre-RC se ha ensamblado en G_1, el origen de replicación puede activarse. La activación de Cdk-S al final de G_1 induce el ensamblaje de varios complejos proteicos adicionales en el origen, conduciendo a la formación de un complejo de preiniciación gigante que desenrolla la hélice y comienza la síntesis del DNA.

A la vez que inicia la replicación del DNA, Cdk-S induce el desensamblaje de algunos componentes del pre-RC en el origen. Las Cdk fosforilan tanto el ORC como Cdc6, provocando su inhibición mediante diferentes mecanismos. Además, la inactivación del APC/C al final de G_1 también ayuda a impedir el ensamblaje del pre-RC. Al final de la mitosis y al co-

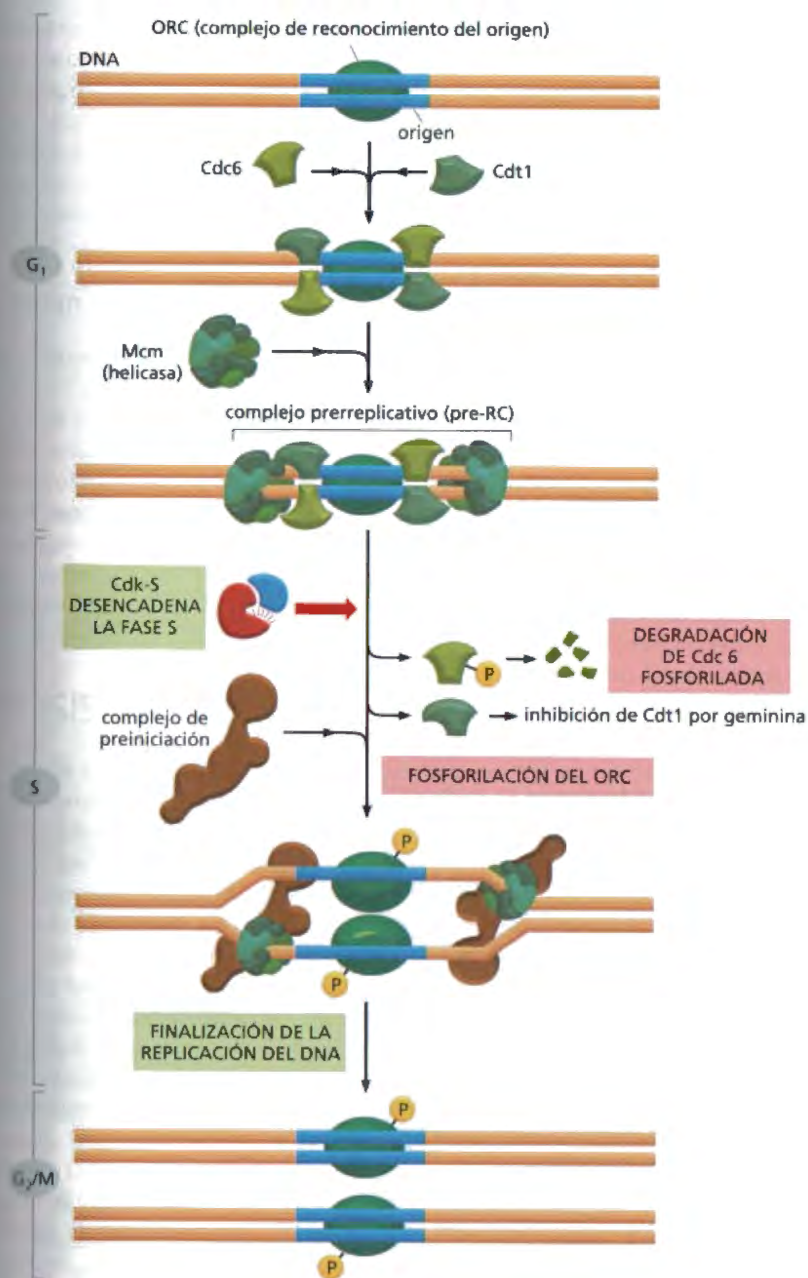


Figura 17-23 Control de la iniciación de la replicación del DNA. El ORC permanece asociado a un origen de replicación durante todo el ciclo celular. Al principio de G_1, Cdc6 y Cdt1 se asocian con el ORC. A continuación, el complejo proteico resultante se ensambla. Mcm forma complejos anulares en el DNA adyacente y da lugar a la formación del complejo prerreplicativo (pre-RC). Entonces, Cdk-S (con la colaboración de otra proteína quinasa que no se muestra) estimula el ensamblaje de varias proteínas adicionales en el origen formando el complejo de preiniciación. La DNA polimerasa y otras proteínas de replicación son reclutadas en el origen, los complejos anulares de proteínas Mcm se activan como DNA helicasas y el desenrollamiento del DNA permite que empiece la replicación del DNA. Cdk-S también bloquea la doble replicación al inducir la degradación de Cdc6 y la inactivación del ORC. La proteína geminina inactiva Cdt1. La geminina es una diana del APC/C por lo que sus niveles aumentan durante las fases S y M, cuando el APC/C está inactivo. Así, los componentes del pre-RC (Cdc6, Cdt1, Mcm) no pueden formar un nuevo pre-RC en los orígenes hasta que Cdk-M se haya inactivado y el APC/C se haya activado al final de la mitosis (véase el texto).

comienzo de G_1, el APC/C induce la degradación de una proteína, la **geminina**, que se une e inhibe Cdt1, un componente del pre-RC. De este modo, cuando el APC/C se inactiva al final de G_1, la geminina se acumula e inhibe Cdt1. Así pues, a través de diferentes vías, tanto las actividades de Cdk-S y Cdk-M, como la baja actividad del APC/C, bloquean la formación del pre-RC durante la fase S y posteriormente. ¿Cómo se recompone después el sistema de control del ciclo celular permitiendo que en el siguiente ciclo celular se lleve a cabo la replicación? La respuesta es sencilla. Al final de la mitosis, la activación del APC/C induce la inactivación de las Cdk y la degradación de la geminina. Los componentes del pre-RC son desfosforilados y Cdt1 se activa, permitiendo el ensamblaje del pre-RC que prepara a la célula para la siguiente fase S.

La duplicación de los cromosomas requiere la duplicación de la estructura de la cromatina

El DNA de los cromosomas está muy empaquetado en una variedad de componentes proteicos, incluidas las histonas y varias proteínas reguladoras implicadas en el control de la ex-

presión génica (véase Capítulo 4). La duplicación de un cromosoma no es sólo cuestión de replicar el DNA, sino que también supone la duplicación de estas proteínas de la cromatina y de su ensamblaje apropiado en el DNA.

La síntesis de las proteínas de la cromatina aumenta durante la fase S proporcionando las materias primas necesarias para empaquetar el DNA recién sintetizado. Fundamentalmente, los complejos Cdk-S inducen un gran aumento de la síntesis de las cuatro subunidades de las histonas que forman los octámeros de histonas del núcleo de cada nucleosoma. Estas subunidades se ensamblan en nucleosomas en el DNA mediante factores de ensamblaje de los nucleosomas, los cuales típicamente se asocian con la horquilla de replicación y distribuyen a los nucleosomas en ambas cadenas del DNA a medida que emergen de la maquinaria de síntesis del DNA.

El empaquetamiento de la cromatina facilita la regulación de la la expresión génica. En algunas partes del cromosoma, la cromatina está muy condensada y se denomina *heterocromatina*, mientras que en otras regiones tiene una estructura más abierta y se denomina *eucromatina*. Estas diferencias en la estructura de la cromatina dependen de varios mecanismos, incluidas la modificación de las colas de las histonas y la presencia de proteínas no histonas (véase Capítulo 4). Dado que estas diferencias son importantes en la regulación génica, es crucial que la estructura de la cromatina, como la del DNA que contiene, se reproduzca con precisión durante la fase S. Sin embargo, no se conoce bien cómo se duplica la estructura de la cromatina. Durante la síntesis del DNA, es probable que unas enzimas modificadoras de histonas y varias proteínas no histonas se depositen en las dos nuevas cadenas de DNA a medida que emergen de la horquilla de replicación; se cree que estas proteínas ayudan a reproducir la estructura local de la cromatina del cromosoma parental.

Las cohesinas ayudan a mantener a las cromátidas hermanas juntas

Al final de la fase S, cada cromosoma replicado consta de un par de cromátidas hermanas idénticas unidas entre sí a lo largo de toda su longitud. Esta cohesión de las cromátidas hermanas genera las condiciones adecuadas para una mitosis con éxito, ya que facilita en gran medida la unión de las dos cromátidas hermanas a los polos opuestos del huso mitótico. Será muy difícil lograr esta unión bipolar si las cromátidas hermanas se separaran después de la fase S. En efecto, defectos en la cohesión de las cromátidas hermanas –por ejemplo, en levaduras mutantes– conducen de forma inevitable a graves errores en la segregación de los cromosomas.

La cohesión de las cromátidas hermanas depende de un gran complejo proteico denominado **cohesina**, el cual se deposita en muchas ubicaciones a lo largo de cada cromátida hermana a medida que el DNA se replica durante la fase S. Dos de las subunidades de la cohesina son miembros de una gran familia de proteínas denominada *proteínas SMC* (*Structural Maintenance of Chromosomes*; mantenimiento estructural de los cromosomas). La cohesina forma estructuras anulares gigantes y parece que estas estructuras podrían formar los anillos que rodean a las dos cromátidas hermanas (**Figura 17–24**).

La cohesión de las cromátidas hermanas también resulta, al menos en parte, de la *concatenación del DNA*, el enrollamiento de las moléculas hermanas de DNA que se produce cuando dos horquillas de replicación se encuentran durante la síntesis del DNA. Entre la fase S

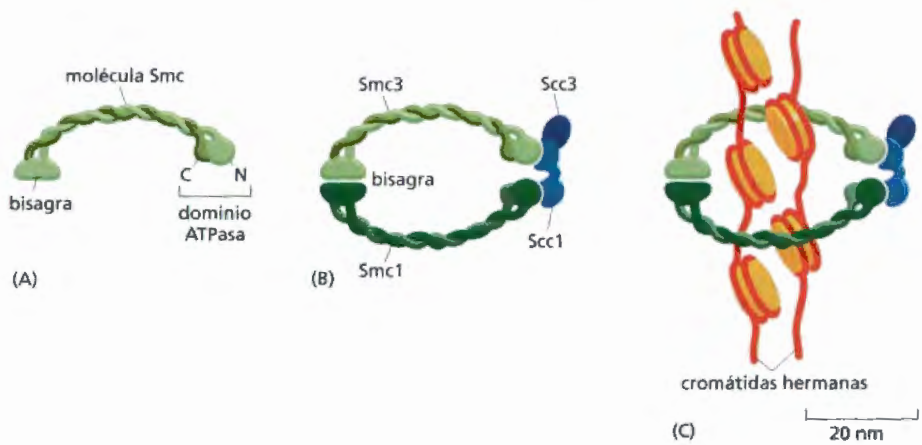


Figura 17–24 Cohesina. La cohesina es un complejo proteico formado por cuatro subunidades. Dos de estas subunidades, Smc1 y Smc3, son proteínas sobreenrolladas con un dominio ATPasa en un extremo; juntas, forman una gran estructura en forma de V como la que se muestra. Las otras dos subunidades, Scc1 y Scc3, conectan los dominios ATPasa de la cabeza formando una estructura anular que puede rodear las cromátidas hermanas, como se muestra en la figura.

Al comienzo de la mitosis, la enzima topoisomerasa II desenrolla de forma gradual los DNA hermanos concatenados, cortando una molécula de DNA, pasando la otra a través de la rotura y después volviendo a unir el DNA cortado (véase Figura 5–23). Cuando la concatenación se elimina, la cohesión de las cromátidas hermanas depende sobre todo de los complejos de cohesinas. Por lo tanto, la pérdida de la cohesión de las cromátidas hermanas en la transición de la metafase a la anafase depende fundamentalmente de la degradación de estos complejos, como describiremos más adelante.

Resumen

La duplicación de los cromosomas durante la fase S supone la replicación exacta de toda la molécula de DNA de cada cromosoma, así como la duplicación de las proteínas de la cromatina que se asocian con el DNA y regulan varios aspectos de la función de los cromosomas. La duplicación de los cromosomas se desencadena mediante la activación del complejo Cdk-S, el cual activa proteínas que desenrollan el DNA e inician su replicación en lugares del DNA denominados orígenes de replicación. Cuando un origen de replicación se ha activado durante la fase S, Cdk-S también inhibe proteínas necesarias para permitir que el origen inicie la replicación del DNA otra vez. Así, cada origen se activa una vez y sólo una vez en cada fase S y no se puede volver a utilizar hasta el siguiente ciclo celular.

MITOSIS

Después de terminar la fase S y de producirse la transición a través de G_2, la célula experimenta los espectaculares procesos de la fase M. Esta fase empieza con la mitosis, en la que las cromátidas hermanas se separan y se distribuyen (*segregan*) en un par de núcleos hijos idénticos, cada uno de ellos con su propia copia del genoma. La mitosis se divide tradicionalmente en cinco etapas –*profase, prometafase, metafase, anafase* y *telofase*– definidas principalmente en función del comportamiento de los cromosomas tal como se observan al microscopio. <TACT> <TCAA> Cuando la mitosis termina, el segundo acontecimiento principal de la fase M –la citocinesis– divide a la célula en dos mitades, cada una de ellas con un núcleo idéntico. El **Panel 17–1** resume los principales acontecimientos de la fase M.

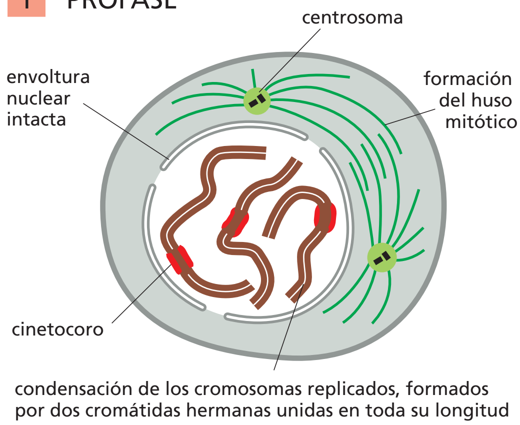
Desde el punto de vista de la regulación, la mitosis se puede dividir en dos partes principales, cada una de ellas regulada por diferentes componentes del sistema de control del ciclo celular. Primero, un aumento súbito de la actividad Cdk-M en el punto de control G_2/M desencadena los acontecimientos de las primeras etapas de la mitosis (profase, prometafase y metafase). Durante este periodo, Cdk-M y varias proteínas quinasa mitóticas fosforilan diversas proteínas, provocando el ensamblaje del huso mitótico y su unión a las cromátidas hermanas. La segunda parte principal de la mitosis empieza en la transición de la metafase a la anafase, cuando el APC/C induce la degradación de la segurina al liberar la proteasa que escinde la cohesina, iniciándose así la separación de las cromátidas hermanas. El APC/C también desencadena la degradación de las ciclinas, lo que provoca la inactivación de la Cdk y la desfosforilación de las dianas de la Cdk, lo cual es necesario para que se produzcan todos los acontecimientos del final de la fase M, incluidos la finalización de la anafase, el desensamblaje del huso mitótico y la división de la célula mediante la citocinesis.

En esta sección, describiremos los acontecimientos mecánicos clave de la mitosis y cómo son regulados por Cdk-M y el APC/C.

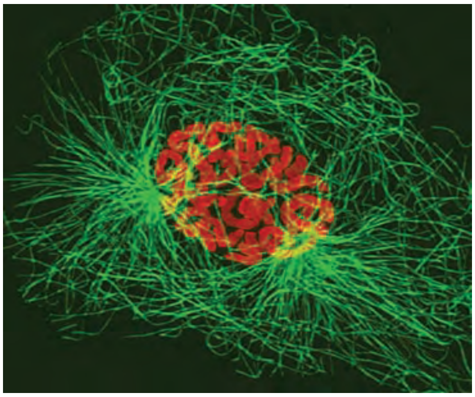
Cdk-M desencadena la entrada en la mitosis

Una de las características más extraordinarias del control del ciclo celular es que una sola proteína quinasa, Cdk-M, desencadena la gran diversidad y complejidad de reorganizaciones celulares que se producen en las primeras etapas de la mitosis. Por lo menos, Cdk-M tiene que inducir el ensamblaje del huso mitótico y asegurar que cada cromátida hermana de una pareja esté unida al polo opuesto del huso. Cdk-M también induce la *condensación de los cromosomas*, la reorganización a gran escala de las cromátidas hermanas en estructuras compactas semejantes a un bastón. En las células animales, Cdk-M también estimula la disgregación de la envoltura nuclear y la reorganización del citoesqueleto de actina y del complejo de Golgi. Se cree que estos procesos se producen cuando Cdk-M fosforila proteínas

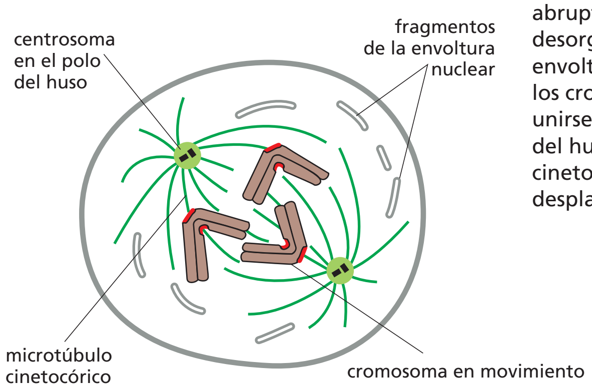
1 PROFASE



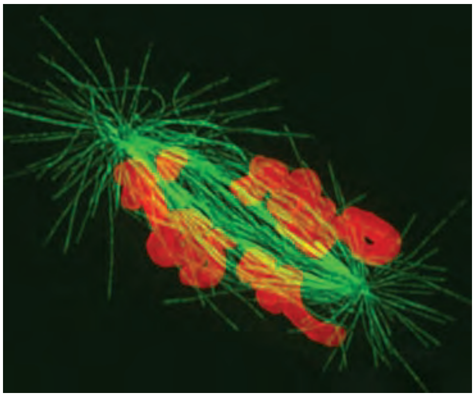
En la profase, los cromosomas replicados, cada uno de ellos formado por dos cromátidas hermanas estrechamente asociadas, se condensan. Fuera del núcleo, el huso mitótico se ensambla entre los dos centrosomas, que se han replicado y separado. Para simplificar, sólo se representan tres cromosomas. Las células diploides presentarían dos copias de cada cromosoma. En la micrografía de fluorescencia, los cromosomas están teñidos de naranja y los microtúbulos de verde.



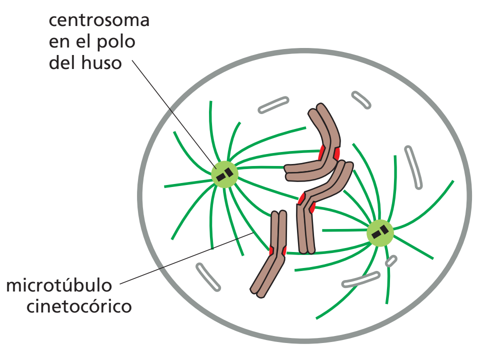
2 PROMETAFASE



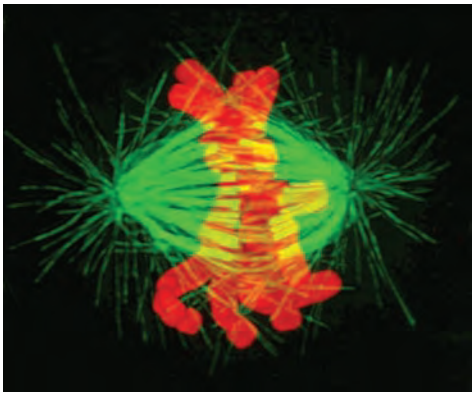
La prometafase empieza abruptamente con la desorganización de la envoltura nuclear. Ahora, los cromosomas pueden unirse a los microtúbulos del huso mediante sus cinetocoros y empezar a desplazarse activamente.



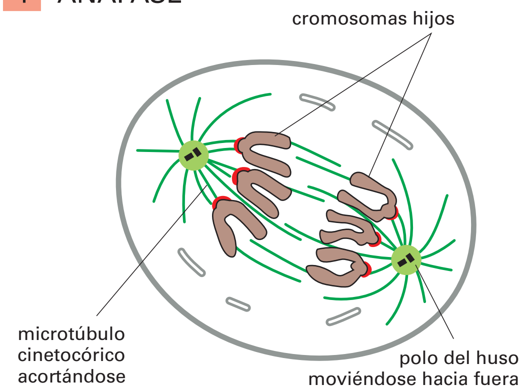
3 METAFASE



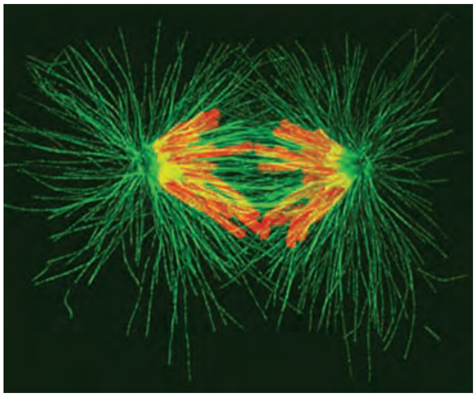
En la metafase, los cromosomas se alinean en el ecuador del huso, a mitad de camino entre los polos del huso. Los microtúbulos cinetocóricos unen las cromátidas hermanas a los polos opuestos del huso.



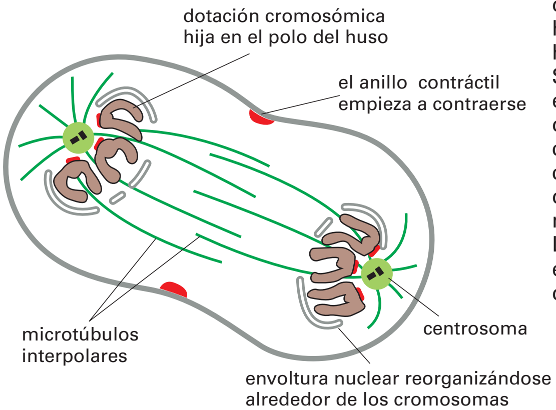
4 ANAFASE



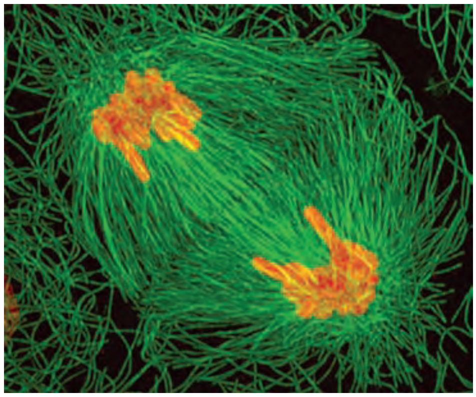
En la anafase, las cromátidas hermanas se separan de forma sincrónica formando los dos cromosomas hijos; cada uno de ellos es arrastrado lentamente hacia el polo del huso al que está adherido. Los microtúbulos cinetocóricos se acortan y los polos del huso también se separan; ambos procesos contribuyen a la segregación de los cromosomas.



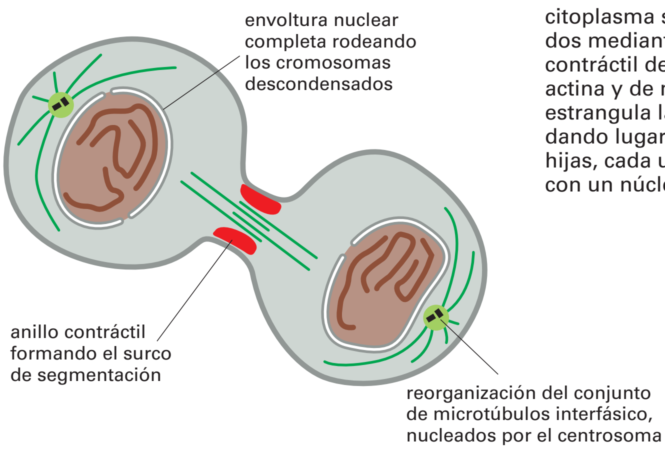
5 TELOFASE



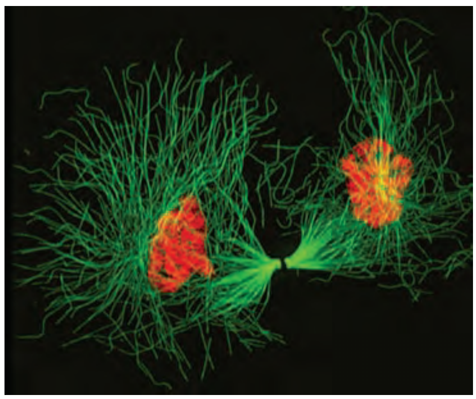
Durante la telofase, las dos dotaciones de cromosomas hijos llegan a los polos del huso y se descondensan. Se reorganiza una nueva envoltura nuclear alrededor de cada dotación cromosómica, lo que completa la formación de los dos núcleos y marca el final de la mitosis. La división del citoplasma empieza con la contracción del anillo contráctil.



6 CITOCINESIS



Durante la citocinesis, el citoplasma se divide en dos mediante un anillo contráctil de filamentos de actina y de miosina, el cual estrangula la célula en dos, dando lugar a dos células hijas, cada una de ellas con un núcleo.



(Micrografías cortesía de Julie Canman y Ted Salmon.)

específicas que están implicadas en el proceso, aunque la mayoría de estas proteínas no han sido identificadas.

Cdk-M no es la única quinasa que fosforila proteínas clave implicadas en el comienzo de la mitosis. Dos familias adicionales de proteínas quinasa, las *quinasas semejantes a Polo* y las *Aurora quinasas*, también contribuyen a la regulación de los acontecimientos mitóticos iniciales. Por ejemplo, la quinasa semejante a Polo Plk, es necesaria para el ensamblaje de un huso mitótico bipolar, en parte porque fosforila proteínas implicadas en la separación de los polos del huso al principio de la mitosis. La Aurora quinasa Aurora-A también colabora en la regulación de las proteínas que regulan el ensamblaje y la estabilidad del huso, mientras que Aurora-B controla la unión de las cromátidas hermanas al huso, como describiremos más adelante. La activación de las quinasas semejantes a Polo y de las Aurora quinasas depende de la actividad Cdk-M, pero se desconocen los mecanismos de activación precisos.

La defosforilación activa Cdk-M al principio de la mitosis

La activación de Cdk–M comienza con la acumulación de la ciclina M (ciclina B en vertebrados, véase Tabla 17–1). En los ciclos celulares de embriones, su síntesis es constante en todo el ciclo y su acumulación es consecuencia de la gran estabilidad de la proteína en la interfase. Sin embargo, en la mayoría de los tipos celulares, su síntesis aumenta en G_2 y M, debido sobre todo a un aumento de la transcripción del gen de la *ciclina M*. Este aumento de la masa proteica de la ciclina M conduce a la correspondiente acumulación de Cdk-M (el complejo formado por Cdk1 y ciclina M) a medida que la célula se aproxima a la mitosis. Aunque la Cdk de estos complejos es fosforilada en un lugar activador por la quinasa activadora de Cdk (CAK), como se indicó antes, la proteína quinasa Wee1 la mantiene inactiva mediante fosforilaciones inhibidoras en dos sitios contiguos (véase Figura 17–18). Así, para cuando haya alcanzado el final de G_2, la célula contiene abundantes reservas de complejos Cdk-M preparados para actuar pero que están inhibidos por fosfatos que bloquean el sitio activo de la quinasa.

¿Qué es lo que provoca la activación de las reservas de Cdk-M? El acontecimiento decisivo es la activación de la proteína fosfatasa Cdc25, la cual elimina los fosfatos inhibidores que inactivan Cdk-M (**Figura 17–25**). Al mismo tiempo, la actividad inhibidora de la quinasa Wee1 también está inhibida, asegurando aún más que la actividad Cdk-M aumente. Se desconocen los mecanismos que activan Cdc25 (e inhiben Wee1) al comienzo de la mitosis. Una posibilidad es que los complejos Cdk-S que están activos en G_2 y en el comienzo de la profase activen Cdc25.

Resulta interesante que Cdc25 también puede activarse, al menos en parte, por su diana, Cdk-M. Cdk-M también puede inhibir la quinasa inhibidora Wee1. La capacidad de Cdk-M para activar su propio activador (Cdc25) e inhibir su propio inhibidor (Wee1) indica que la activación de Cdk-M en la mitosis supone bucles de retroalimentación positiva (véase Figura 17–25). Según este atractivo modelo, la activación parcial de Cdc25 (tal vez por Cdk-S) activa en parte una subpoblación de complejos Cdk-M, los cuales fosforilarán después más moléculas Cdc25 y Wee1. Este hecho conduce a una mayor activación de Cdk-M y así sucesivamente. Un mecanismo como éste enseguida activaría por completo todos los

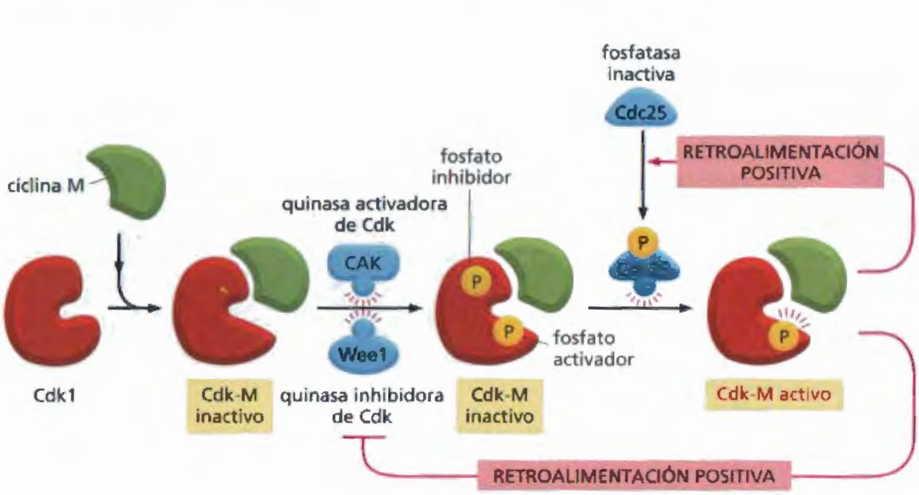


Figura 17–25 Activación de Cdk-M. Cdk1 se asocia con la ciclina M a medida que los niveles de ciclina M aumentan gradualmente. El complejo Cdk-M resultante es fosforilado en un sitio activador por la quinasa activadora de Cdk (CAK) y en dos sitios inhibidores por la quinasa Wee1. El complejo Cdk-M inactivo que resulta de este proceso es activado por la fosfatasa Cdc25 al final de G_2. Además, Cdc25 también es activada por el complejo Cdk-M activo, originando una retroalimentación positiva. Esta retroalimentación se ve intensificada por la capacidad de Cdk-M para inhibir Wee1.

complejos Cdk-M de la célula. Como se ha mencionado existen interruptores moleculares semejantes a éste que actúan en varios puntos del ciclo celular provocando la súbita y completa transición desde una etapa del ciclo celular a la siguiente.

La condensina ayuda a configurar los cromosomas duplicados para la separación

Al final de la fase S, las en extremo largas moléculas de DNA de las cromátidas hermanas están enredadas en una masa de proteínas y de DNA parcialmente concatenado. En este estado, cualquier intento de separar las cromátidas hermanas sin duda provocaría roturas en los cromosomas. Para evitar este desastre, la célula dedica mucha energía al comienzo de la mitosis, a reorganizar de forma gradual las cromátidas hermanas en estructuras cortas y definidas que se puedan separar con más facilidad en la anafase. Estos cambios cromosómicos suponen dos procesos: la *condensación de los cromosomas*, en la que las cromátidas se empaquetan, y la *resolución de las cromátidas hermanas*, a través de la cual las dos cromátidas hermanas se resuelven en unidades diferentes y separables (**Figura 17–26**). La resolución es el resultado de la separación de los DNA hermanos, junto a la eliminación parcial de las moléculas de cohesina a lo largo de los brazos de los cromosomas. Por consiguiente, cuando la célula alcanza la metafase, las cromátidas hermanas se observan en el microscopio como estructuras compactas semejantes a un bastón que están unidas con fuerza en sus regiones centroméricas pero débilmente unidas a lo largo de sus brazos.

La condensación y la resolución de las cromátidas hermanas depende, al menos en parte, de un complejo proteico compuesto por cinco subunidades denominado **condensina**. La estructura de la condensina es homóloga a la del complejo de cohesinas que mantiene juntas las cromátidas hermanas (véase Figura 17–24). Contiene dos subunidades SMC como las de la cohesina, más tres subunidades no SMC (**Figura 17–27**). La condensina puede formar una estructura parecida a un anillo que de algún modo utiliza la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP para inducir la compactación y la resolución de las cromátidas hermanas. En un tubo de ensayo, la condensina puede modificar el enrollamiento de moléculas de DNA y parece que esta actividad es importante para que se produzca la condensación de los cromosomas en la mitosis. Es interesante que la fosforilación de subunidades de la condensina por Cdk-M estimule esta actividad enrrolladora y proporcione un mecanismo mediante el cual Cdk-M estimula la reestructuración de los cromosomas al comienzo de la mitosis.



Figura 17–26 Cromosoma mitótico. Electromicrografía de barrido de un cromosoma mitótico humano que está formado por dos cromátidas hermanas unidas a lo largo de toda su longitud. Las regiones constreñidas son los centrómeros. (Cortesía de Terry D. Allen.)

El huso mitótico es una máquina basada en microtúbulos

En todos los eucariotas, el acontecimiento fundamental de la mitosis –la segregación de los cromosomas– depende de una compleja y magnífica máquina denominada **huso mitótico**. El huso es un conjunto bipolar de microtúbulos, que separa las cromátidas hermanas en la anafase, segregando así los dos complementos cromosómicos en extremos opuestos de la célula, donde se empaquetan en núcleos hijos. Cdk-M desencadena el ensamblaje del huso al comienzo de la mitosis, en paralelo a la reestructuración cromosómica que acabamos de describir. Antes de considerar cómo se ensambla el huso y cómo se unen sus microtúbulos a las cromátidas hermanas, repasaremos brevemente las características básicas de la estructura del huso mitótico.

Como hemos tratado en el Capítulo 16, el huso mitótico es un conjunto bipolar de microtúbulos, cuyos extremos menos se orientan hacia los dos polos del huso, mientras que los extremos más irradian hacia fuera desde los polos (**Figura 17–28**). <GTCT> Los extremos más de algunos microtúbulos –denominados **microtúbulos interpolares**– interactúan con los extremos más de microtúbulos del otro polo, dando lugar a un conjunto antiparalelo en la zona media del huso. Los extremos más de otros microtúbulos –los **microtúbulos cinetocóricos**– están unidos a parejas de cromátidas hermanas en grandes estructuras proteicas denominadas *cinetocoros*, los cuales se localizan en el *centrómero* de cada cromátida hermana. Por último, muchos husos mitóticos también contienen **microtúbulos astrales** que irradian hacia fuera desde los polos y contactan con el córtex celular, ayudando a posicionar el huso en la célula.

En la mayoría de células somáticas animales, cada polo del huso está orientado hacia un orgánulo proteico denominado **centrosoma** (descrito en el Capítulo 16). Cada centroso-

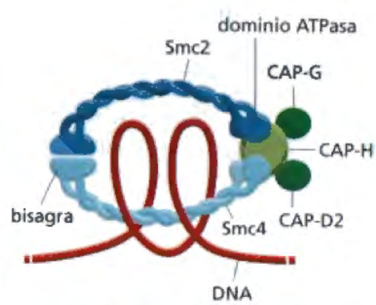


Figura 17–27 Condensina. La condensina es un complejo proteico formado por cinco subunidades que se parece a la cohesina (véase Figura 17–24). Los dominios de la cabeza de sus dos subunidades principales, Smc2 y Smc4, se mantienen juntos mediante tres subunidades adicionales. Se desconoce de qué forma la condensina cataliza la reestructuración y compactación del DNA cromosómico, pero puede formar una estructura anular que rodea bucles de DNA como se muestra en la figura; puede hidrolizar ATP y enrollar moléculas de DNA en un tubo de ensayo.

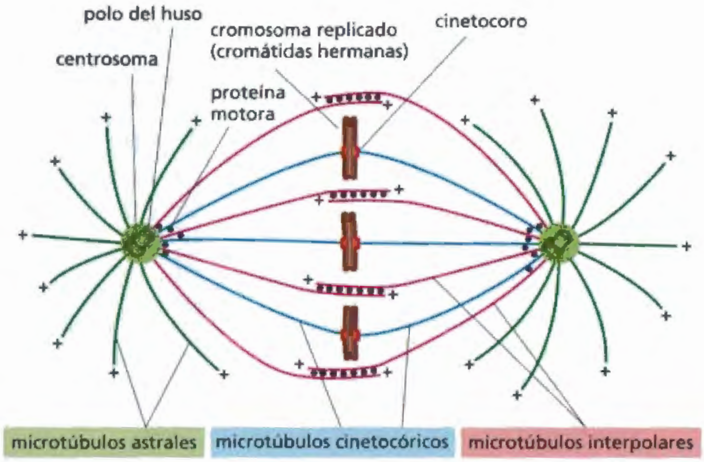


Figura 17-28 Tres clases de microtúbulos del huso mitótico en una célula animal. Los extremos más de los microtúbulos se proyectan desde los centrosomas, mientras que los extremos menos están anclados en los polos del huso, que en este ejemplo están organizados por los centrosomas. Los microtúbulos cinetocóricos conectan los polos del huso con los cinetocoros de las cromátidas hermanas, mientras que los microtúbulos interpolares de los dos polos se interdigitan en el ecuador del huso. Los microtúbulos astrales se extienden desde los polos por el citoplasma y por lo general interaccionan con el córtex celular, colaborando en el posicionamiento del huso en la célula.

ma está formado por una nube de material amorfo (denominado *matriz pericentriolar*) que rodea un par de *centríolos* (**Figura 17-29**). La matriz pericentriolar nuclea a un conjunto radial de microtúbulos, con sus extremos más de crecimiento rápido proyectándose hacia fuera y sus extremos menos asociados al centrosoma. La matriz contiene una gran variedad de proteínas, incluyendo las proteínas motoras dependientes de microtúbulos, las proteínas sobreenrolladas que unen los motores al centrosoma, las proteínas estructurales y los componentes del sistema de control del ciclo celular. Todavía es más importante que la matriz contiene el *complejo en anillo de γ-tubulina*, principal responsable de la nucleación de los microtúbulos (descrito en el Capítulo 16).

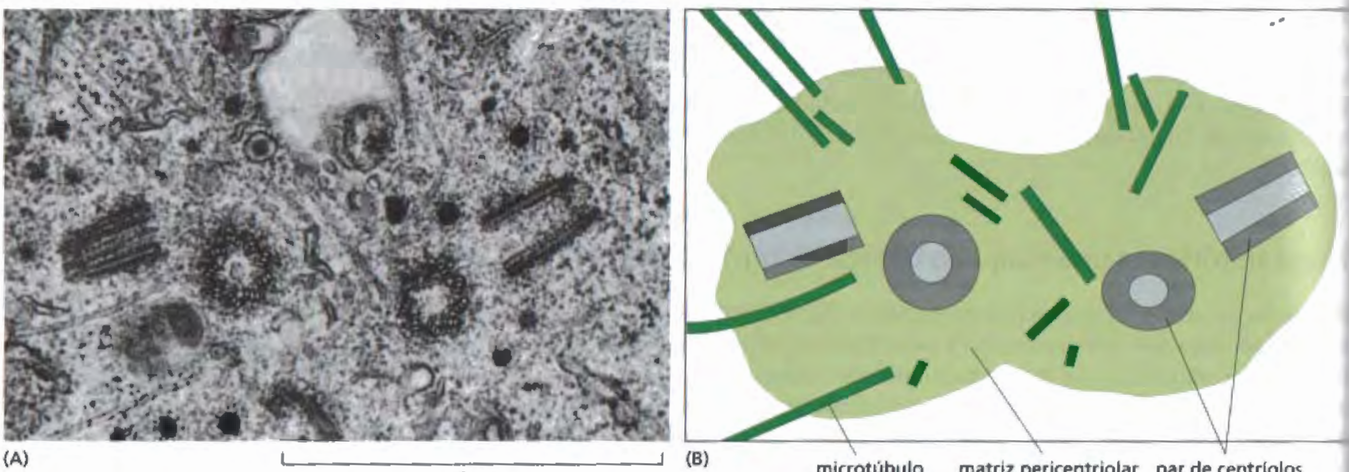




Figura 17-29 Centrosoma. (A) Electromicrografía de una célula de mamífero en cultivo en fase S en la que se observa un centrosoma duplicado. Cada centrosoma contiene un par de centríolos; aunque los centríolos se han duplicado, permanecen juntos formando un solo complejo, como se muestra en el dibujo (B) realizado sobre la micrografía de (A). Un centríolo de cada par de centríolos se ha seccionado de forma transversal, y el otro, longitudinalmente, lo que indica que los dos miembros de cada par están dispuestos en ángulo recto uno respecto del otro. Cuando la célula entre en la fase M, las dos mitades del centrosoma replicado, cada una de las cuales está formada por un par de centríolos rodeados por la matriz pericentriolar, se separarán y migrarán, iniciando la formación de los dos polos del huso mitótico. (C) Electromicrografía de un par de centríolos que se han aislado de una célula. Los dos centríolos se han separado parcialmente durante el proceso de aislamiento, pero permanecen conectados entre sí por unas fibras delgadas que los mantienen juntos hasta el momento que deban separarse. Ambos centríolos están seccionados longitudinalmente, lo que permite observar que sus estructuras son diferentes: el centríolo madre es mayor y más complejo que el centríolo hijo, y sólo el centríolo madre se asocia con la matriz pericentriolar que nuclea los microtúbulos. Cada centríolo hijo madurará durante el siguiente ciclo celular, cuando se replicará dando lugar a su propio centríolo hijo. (A, de M. McGill, D.P. Highfield, T.M. Monahan y B.R. Brinkley, *J. Ultrastruct. Res.* 57:43-53, 1976. Con la autorización de Academic Press; C, de M. Paintrand et al., *J. Struct. Biol.* 108:107-128, 1992. Con la autorización de Elsevier.)

Algunas células –fundamentalmente las células de las plantas superiores y los oocitos de muchos vertebrados– no tienen centrosomas, y las proteínas motoras dependientes de microtúbulos y otras proteínas asociadas a los extremos menos de los microtúbulos organizan y orientan los polos del huso mitótico.

Las proteínas motoras dependientes de microtúbulos regulan el ensamblaje y la función del huso

El ensamblaje y la función del huso mitótico dependen de numerosas proteínas motoras dependientes de microtúbulos. Como se describió en el Capítulo 16, estas proteínas pertenecen a dos familias: las proteínas relacionadas con la quinesina, que por lo general se desplazan hacia el extremo más de los microtúbulos, y las dineínas, que se dirigen hacia el extremo menos. En el huso mitótico, estas proteínas motoras generalmente actúan en o cerca de los extremos de los microtúbulos. Cuatro tipos principales de proteínas motoras –*quinesina-5, quinesina-14, quinesinas-4 y 10*, y *dineína*– son en especial importantes en el ensamblaje y la función del huso (**Figura 17–30**).

La quinesina-5 tiene dos dominios motores que interaccionan con los extremos más de los microtúbulos antiparalelos en la zona media del huso. Dado que los dos dominios motores se desplazan hacia los extremos más de los microtúbulos, deslizan a los dos microtúbulos antiparalelos en sentidos opuestos hacia los polos del huso y separan los polos. Por el contrario, la quinesina-14 es una proteína motora que se dirige hacia el extremo menos con un único dominio motor y otros dominios que pueden interaccionar con otro microtúbulo. Puede entrecruzar microtúbulos interpolares antiparalelos en la zona media del huso y tiende a juntar los polos. La quinesina-4 y la quinesina-10, también denominadas *cromoquinesinas*, son motores dirigidos hacia el extremo más que se asocian con los brazos de los cromosomas y alejan el cromosoma al que se han unido del polo (o alejan el polo del cromosoma). Por último, las dineínas son motores dirigidos hacia el extremo menos que, junto con proteínas asociadas, organizan a los microtúbulos en varias ubicaciones celulares. Por ejemplo, las dineínas unen los extremos más de los microtúbulos astrales a componentes del citoesqueleto de actina en el córtex celular, y desplazándose hacia el extremo menos de los microtúbulos, los motores de dineína empujan los polos del huso hacia el córtex celular y los separan.

Dos mecanismos colaboran en el ensamblaje de un huso mitótico bipolar

El huso mitótico tiene que tener dos polos para arrastrar las dos dotaciones de cromátidas hermanas a extremos opuestos de la célula en la anafase. En las células animales, el principal objetivo de este capítulo, dos mecanismos colaboran asegurando la bipolaridad del huso. Uno de los mecanismos depende de la capacidad de los cromosomas mitóticos para nuclear y estabilizar a los microtúbulos y de la capacidad de varias de las proteínas motoras recién descritas para organizar a los microtúbulos en un conjunto bipolar, con los extremos menos dirigidos hacia los dos polos del huso y los extremos más interactuando entre ellos en la zona media del huso. El otro mecanismo depende de la capacidad de los centrosomas para ayudar a formar los polos del huso. Una célula animal típica inicia la mitosis con un par de cen-

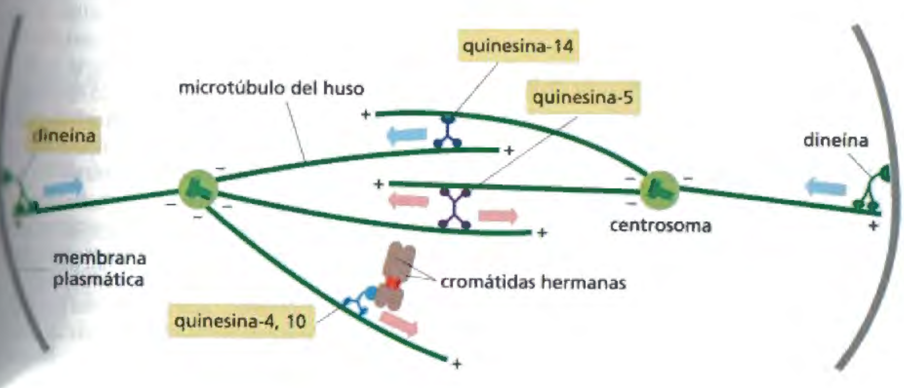


Figura 17–30 Principales proteínas motoras del huso. Cuatro clases principales de proteínas motoras dependientes de los microtúbulos (recuadros *amarillos*) contribuyen al ensamblaje y la función del huso (véase el texto). Las flechas indican el sentido del movimiento de las proteínas motoras a lo largo de un microtúbulo (*azul* hacia el extremo menos y *rojo* hacia el extremo más).

trosomas, cada uno de los cuales nuclea un conjunto radial de microtúbulos. Los dos centrosomas facilitan el ensamblaje del huso bipolar al proporcionar un par de polos del huso mitótico prefabricados. Sin embargo, los centrosomas no son esenciales para el ensamblaje de un huso bipolar, ya que en células que normalmente carecen de centrosomas y en células en cultivo, en las que el centrosoma ha sido destruido con un rayo láser, también se forma un huso funcional.

A continuación se describirán las etapas del ensamblaje del huso, empezando con el ensamblaje dependiente del centrosoma al comienzo de la mitosis. Luego consideraremos el mecanismo de autoorganización que no requiere centrosomas y que es en especial importante después de la desorganización de la envoltura nuclear.

La duplicación del centrosoma se produce al principio del ciclo celular

La mayoría de células animales tienen un único centrosoma que nuclea la mayoría de los microtúbulos citoplasmáticos. El centrosoma se duplica cuando la célula entra en el ciclo celular, de modo que para cuando la célula alcanza la mitosis tiene dos centrosomas. La duplicación del centrosoma comienza a la vez que la célula entra en la fase S. El complejo Cdk-G_1/S (formado por Cdk2 y ciclina E en las células animales; véase Tabla 17–1) que desencadena la entrada en el ciclo celular también inicia la duplicación del centrosoma. Los dos centríolos del centrosoma se separan y cada uno de ellos nuclea la formación de un nuevo centríolo; el resultado son dos pares de centríolos ubicados en una matriz pericentriolar agrandada (**Figura 17–31**). Este par de centrosomas permanecen juntos en un lado del núcleo hasta que la célula entra en la mitosis.

Existen interesantes analogías entre la duplicación de los centrosomas y la duplicación de los cromosomas. Ambos utilizan un mecanismo semiconservativo de duplicación, en el cual las dos mitades se separan y actúan de moldes para construir una nueva mitad. Los centrosomas, como los cromosomas, tiene que replicarse una vez y sólo una cada ciclo celular para asegurar que la célula entre en la mitosis con sólo dos copias: un número incorrecto de centrosomas podría provocar defectos en el ensamblaje del huso y, como consecuencia, errores en la segregación de los cromosomas.

Los mecanismos que limitan la duplicación de los centrosomas a una vez por ciclo celular son inciertos. En muchos tipos celulares, la inhibición experimental de la síntesis del DNA bloquea la duplicación de los centrosomas y proporciona un mecanismo mediante el cual se controla el número de centrosomas. En cambio otros tipos celulares, incluidos los de los embriones en desarrollo de moscas, erizos de mar y ranas, no presentan dicho mecanismo y la duplicación de los centrosomas continúa aunque se haya bloqueado la duplicación de los cromosomas. Se desconoce cómo estas células limitan la duplicación de los centrosomas a una vez por ciclo celular.

Cdk-M inicia el ensamblaje del huso en la profase

Al comienzo de la mitosis, el aumento repentino de la actividad de Cdk-M induce el ensamblaje del huso. En las células animales, los dos centrosomas se desplazan alrededor de la

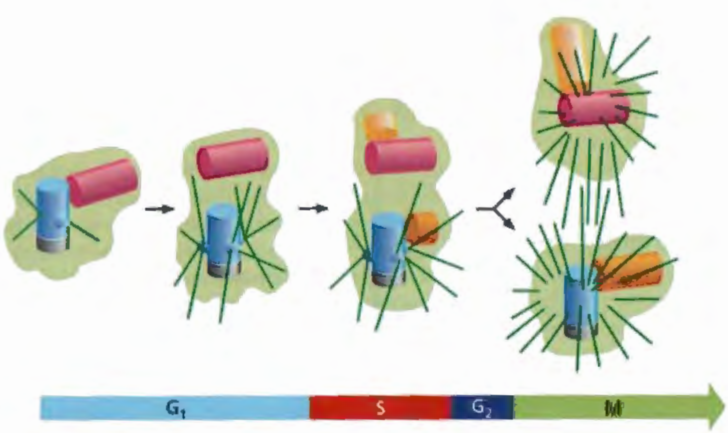


Figura 17–31 Replicación centriolar. El centrosoma está formado por un par de centríolos y la matriz pericentriolar asociada *(verde)*. En un determinado momento de G_1 los dos centríolos se separan algunas micras. Durante la fase S, cerca de la base de cada centríolo madre y en ángulo recto respecto a él, empieza a formarse un centríolo hijo. Por lo general, la elongación del centríolo hijo finaliza en la fase G_2. Los dos pares de centríolos permanecen juntos en un solo complejo centrosomal hasta el comienzo de la fase M, cuando el complejo se escinde en dos y las dos mitades empiezan a separarse. En este momento, cada centrosoma nuclea su propio conjunto de microtúbulos radiales que constituyen el áster.

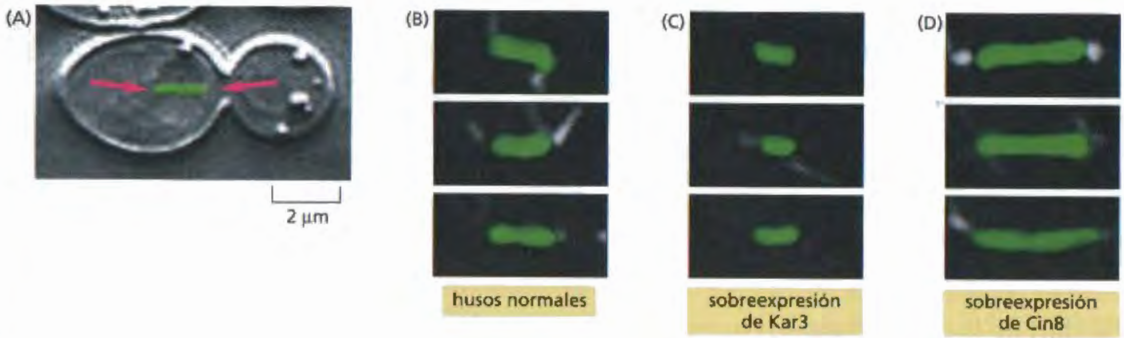


Figura 17–32 Influencia de las proteínas motoras opuestas sobre la longitud del huso de la levadura de gemación. (A) Micrografía de contraste interferencial de una célula de levadura en mitosis. El huso está marcado en *verde* y la posición de los polos del huso se indica con *flechas rojas*. En las levaduras, la envoltura nuclear no se desorganiza durante la mitosis y el huso se forma dentro del núcleo. En (B-D), los husos mitóticos se han teñido con anticuerpos fluorescentes contra la tubulina. (B) Células normales de levadura. (C) La sobreexpresión de la proteína motora dirigida hacia el extremo menos Kar3 (una quinesina-14) causa que los husos sean más cortos de lo normal. (D) La sobreexpresión de la proteína motora dirigida hacia el extremo más Cin8 (una quinesina-5) provoca que los husos sean más largos de lo normal. Parece, pues, que en estas células el equilibrio entre proteínas motoras opuestas determina la longitud del huso. (A, cortesía de Kerry Bloom; B-D de W. Saunders, V. Lengyel y M.A. Hoyt, *Mol. Biol. Cell* 8:1025-1033, 1997. Con la autorización de la American Society for Cell Biology.)

envoltura nuclear y los extremos más de los microtúbulos que hay entre ellos se interdigitan formando los microtúbulos interpolares del huso en desarrollo. Al mismo tiempo, la cantidad de complejos en anillo de γ-tubulina de cada centrosoma aumenta mucho e incrementa la capacidad de los nucleosomas para nuclear nuevos microtúbulos, un proceso que se denomina *maduración de los centrosomas*.

Numerosas proteínas motoras dirigen la separación de los centrosomas al comienzo de la mitosis. En la profase, unos motores de dineína dirigidos hacia el extremo menos que se localizan en los extremos más de los microtúbulos astrales proporcionan la fuerza principal. Estos motores se encuentran anclados en el córtex celular o en la envoltura nuclear y su desplazamiento hacia el extremo menos de los microtúbulos separa los centrosomas (véase Figura 17–30). Después de la desorganización de la envoltura nuclear al final de la profase, las interacciones entre los microtúbulos centrosomales y el córtex celular permite que los haces de actina-miosina del córtex también separen los centrosomas. Finalmente, unos motores de quinesina-5 entrecruzan los extremos antiparalelos y solapados de los microtúbulos interpolares y separan los polos (véase Figura 17–30).

El balance de las fuerzas opuestas generadas por diferentes tipos de proteínas motoras determina la longitud final del huso. Por lo general, los motores de dineína y quinesina-5 promueven la separación de los centrosomas y aumentan la longitud del huso. La quinesina-14 hace lo contrario: se trata de un motor dirigido hacia el extremo menos que interactúa con un microtúbulo de un polo mientras viaja hacia el extremo menos de un microtúbulo antiparalelo del otro polo; por consiguiente, tiende a juntar los polos. Se desconoce cómo regula la célula el balance de las fuerzas opuestas para generar la longitud apropiada del huso (Figura 17–32).

Cdk-M y otras proteínas quinasa mitóticas son necesarias para la separación y la maduración de los centrosomas. Cdk-M y Aurora-A fosforilan la quinesina-5 y la activan a que induzca la separación de los centrosomas. Aurora-A y Plk también fosforilan componentes del centrosoma y así inducen su maduración.

En las células animales, la finalización del ensamblaje del huso requiere que la envoltura nuclear se desorganice

Los centrosomas y los microtúbulos de las células animales se localizan en el citoplasma, separados de los cromosomas por la barrera de la doble membrana de la envoltura nuclear (véase Capítulo 12). La unión de las cromátidas hermanas al huso requiere la eliminación previa de esta barrera. Además, muchas de las proteínas motoras y reguladoras de los microtúbulos que favorecen el ensamblaje del huso están asociadas con los cromosomas dentro del núcleo. La desorganización de la envoltura nuclear permite que estas proteínas lleven a cabo sus importantes funciones en el ensamblaje del huso.

La desorganización de la envoltura nuclear es un proceso complejo de muchas etapas que se cree que comienza cuando Cdk-M fosforila varias subunidades de los complejos de poro nuclear de la envoltura nuclear. Este hecho inicia el desensamblaje de los complejos de poro nuclear y su disociación de la envoltura. Cdk-M también fosforila componentes de la lámina nuclear, el soporte estructural situado debajo de la envoltura. La fosforilación de estos componentes de la lámina y de varias proteínas de la envoltura nuclear interna induce el desensamblaje de la lámina nuclear y la desorganización de las membranas de la envoltura en pequeñas vesículas.

La inestabilidad de los microtúbulos aumenta mucho en la mitosis

En la interfase, la mayoría de células animales presentan un conjunto citoplasmático de microtúbulos que irradian hacia fuera desde el único centrosoma. Como se ha descrito en el Capítulo 16, los microtúbulos de este conjunto interfásico se encuentran en estado de *inestabilidad dinámica*, en el que cada microtúbulo está creciendo o acortándose, oscilando estocásticamente entre los dos estados. La oscilación del crecimiento al acortamiento se llama *catástrofe* y la oscilación del acortamiento al crecimiento, *rescate* (véase Figura 16–16). Continuamente se van formando nuevos microtúbulos que compensan la pérdida de los que desaparecen por despolimerización.

La entrada en la mitosis determina un cambio repentino en los microtúbulos de la célula. El conjunto interfásico de escasos microtúbulos largos se convierte en numerosos microtúbulos mucho más cortos y dinámicos que rodean cada centrosoma. Durante la profase, y especialmente en la prometafase y metafase (véase Panel 17–1), la vida media de los microtúbulos disminuye de forma espectacular. Este aumento de la inestabilidad de los microtúbulos, junto con la mayor capacidad de los centrosomas para nuclear microtúbulos, como ya se ha mencionado, da lugar a conjuntos de microtúbulos del huso muy densos y dinámicos que son idóneos para capturar a las cromátidas hermanas.

Cdk-M inicia estos cambios en el comportamiento de los microtúbulos, al menos en parte, fosforilando dos clases de proteínas que regulan la dinámica de los microtúbulos (véase el Capítulo 16). Se trata de las proteínas motoras dependientes de microtúbulos y de las **proteínas asociadas a microtúbulos** (**MAP**: ***microtubule-associated proteins***). Experimentos realizados con extractos de oocitos de *Xenopus* libres de células, los cuales reproducen muchos de los cambios que ocurren en células intactas durante el ciclo celular, han revelado la función de estos reguladores en el control de la dinámica de los microtúbulos. Si a estos extractos se les añaden centrosomas y tubulina fluorescente, aparecen microtúbulos fluorescentes que se nuclean desde los centrosomas y es posible observar la dinámica de los microtúbulos mediante videomicroscopía de fluorescencia con toma a intervalos. Los microtúbulos de los extractos mitóticos difieren sobre todo de los microtúbulos de los extractos interfásicos en el aumento de la frecuencia de catástrofes, en las que los microtúbulos oscilan repentinamente de un crecimiento lento a un acortamiento rápido.

Dos clases de proteínas regulan la dinámica de los microtúbulos durante la mitosis. Las proteínas denominadas **factores de catástrofe** desestabilizan los conjuntos de microtúbulos al aumentar la frecuencia de catástrofes (véase Figura 16–16). Entre ellas, existe una proteína relacionada con la quinesina que no actúa como una proteína motora. Por el contrario, las MAP tienen el efecto contrario y estabilizan los microtúbulos de varias formas: pueden aumentar la frecuencia de los rescates, en los que los microtúbulos oscilan del acortamiento al crecimiento, o pueden tanto aumentar la velocidad de crecimiento como reducir la velocidad de acortamiento de los microtúbulos. Así, en principio, los cambios en los factores de catástrofe y en las MAP pueden dar lugar a microtúbulos mucho más dinámicos en la fase M, aumentando la velocidad total de despolimerización de los microtúbulos, reduciendo la velocidad total de despolimerización de los microtúbulos o ambas cosas a la vez.

En extractos de oocitos de *Xenopus*, el equilibrio entre un tipo de factor de catástrofe y un tipo de MAP determina la frecuencia de catástrofes y la duración del estado estacionario de los microtúbulos (**Figura 17–33**). Este equilibrio, a su vez, regula el ensamblaje del huso mitótico, ya que los microtúbulos que son demasiado largos o demasiado cortos no pueden formar un huso normal. Una forma mediante la que Cdk-M puede regular la longitud de los microtúbulos es fosforilando esta MAP y reduciendo su capacidad para estabilizar los microtúbulos. Aunque la actividad del factor de catástrofe se mantenga constante durante todo el ciclo celular, el equilibrio entre las dos actividades contrarias de la MAP y del factor de catástrofe cambiaría y aumentaría la inestabilidad dinámica de los microtúbulos.

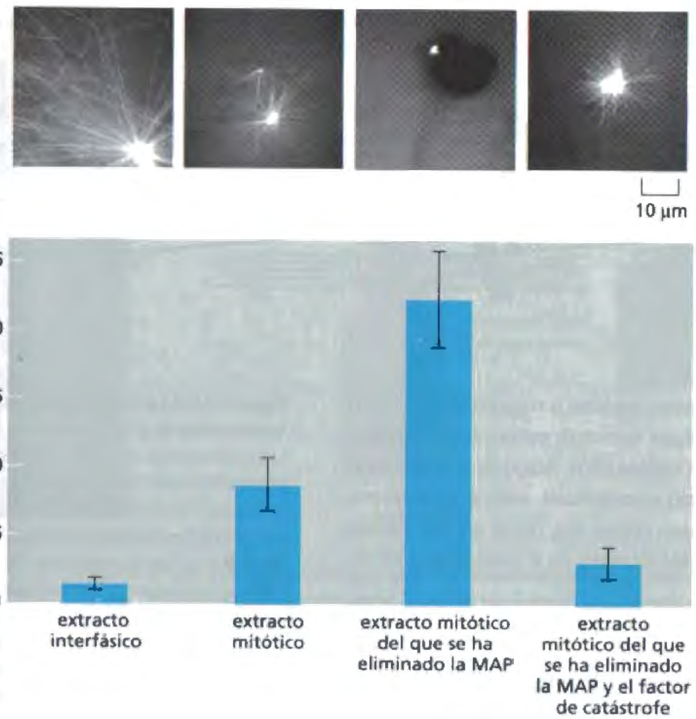


Figura 17-33 Evidencia experimental de que el equilibrio entre los factores de catástrofe y las MAP influye en la frecuencia de catástrofes de los microtúbulos y en la longitud de los microtúbulos. Se incubaron extractos de oocitos de *Xenopus* en interfase o en mitosis con centrosomas y tubulina fluorescente y se observó cómo se comportaban los microtúbulos nucleados a partir de los centrosomas mediante videomicroscopía de fluorescencia. Como se esperaba, la velocidad de aparición de catástrofes es mayor en los extractos en mitosis que en los extractos en interfase. La eliminación de una MAP específica (denominada Xmap215) de los extractos mitóticos aumenta la velocidad de aparición de las catástrofes, lo cual indica que esta MAP inhibe las catástrofes en los extractos mitóticos. La inhibición de un factor específico de catástrofe (la proteína relacionada con quinesinas Mcak) reduce mucho la velocidad de aparición de catástrofes en los extractos mitóticos carentes de la MAP, lo cual indica que este factor es responsable de estimular las catástrofes en los extractos mitóticos. Por lo tanto, la velocidad de aparición de las catástrofes depende del equilibrio entre la MAP y el factor de catástrofe. Las micrografías de fluorescencia de los ásteres formados en las diferentes condiciones experimentales se muestran en los paneles superiores; cabe destacar que cuanto mayor es la velocidad de aparición de las catástrofes, más cortos son los microtúbulos. (De R. Tournebize et al., *Nat. Cell Biol.* 2:13-19, 2000. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

Los cromosomas mitóticos promueven el ensamblaje bipolar del huso

Los cromosomas no son simples pasajeros pasivos en el proceso de ensamblaje del huso. Participan activamente en la formación del huso al generar un ambiente que favorece tanto la nucleación como la estabilización de los microtúbulos. La influencia de los cromosomas se puede demostrar desplazándolos mediante una fina aguja de cristal después de que el huso se haya formado. Para algunas células en metafase, si un solo cromosoma se aparta de la alineación, aparece con rapidez una masa de nuevos microtúbulos del huso alrededor del cromosoma recién posicionado, mientras que los microtúbulos del huso de la posición anterior del cromosoma se despolimerizan. Parece que esta propiedad de los cromosomas depende, al menos en parte, de un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF: *guanine-nucleotide exchange factor*) que está unido a la cromatina; el GEF activa una pequeña GTPasa citosólica denominada *Ran*, induciéndola a unir GTP en lugar de GDP. La Ran-GTP activada, que también participa en el transporte nuclear (véase el Capítulo 12), libera proteínas estabilizadoras de microtúbulos a partir de complejos proteicos del citosol, estimulando así la nucleación local y la estabilización de microtúbulos alrededor de los cromosomas.

Es esta capacidad de los cromosomas de estabilizar y organizar los microtúbulos la que permite a la célula formar husos bipolares en ausencia de centrosomas, como hemos indicado. Se cree que el ensamblaje de un huso acentrosómico comienza con la nucleación y la estabilización de los microtúbulos alrededor de los cromosomas. Después, proteínas motoras, sobre todo miembros de la familia de la quinesina-5 (véase Figura 17-30), entrecruzan los microtúbulos en una orientación antiparalela y separan sus extremos menos. Las quinesinas-4 y 10 sobre los brazos de los cromosomas también ayudan a separar los extremos menos de los cromosomas. Entonces, la dineína, la quinesina-14 y varias proteínas de unión al extremo menos entrecruzan y orientan los extremos menos de los microtúbulos formando los dos polos del huso (**Figura 17-34**).

Las células que normalmente carecen de centrosomas, como las células de las plantas superiores y muchos oocitos de animales, utilizan este proceso de autoorganización basado en los cromosomas para formar husos. Así también se ensamblan los husos en algunos embriones de insectos a los que se ha inducido el desarrollo a partir de óvulos no fecundados, es decir, de forma *partenogenética*. En estos embriones partenogenéticos, el huso mitótico se forma sin centrosomas (**Figura 17-35**), ya que por lo general es el espermatozoide el que aporta el centrosoma cuando fecunda al óvulo (véase el Capítulo 21). Incluso en las células

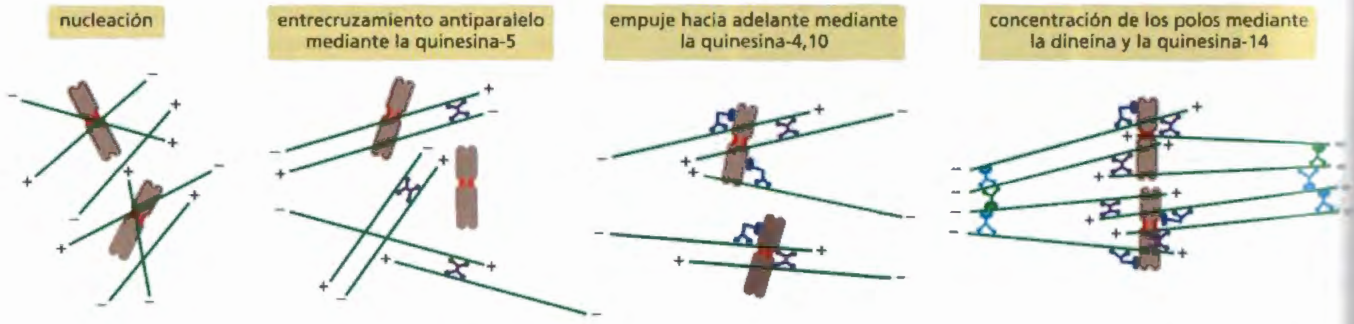


Figura 17-34 La autoorganización del huso mediante proteínas motoras. Los cromosomas mitóticos estimulan la producción local de RanGTP (no se muestra), la cual activa proteínas que nuclean e inducen la formación de microtúbulos en la vecindad de los cromosomas. Las proteínas motoras quinesina-5 (véase Figura 17-30) organizan estos microtúbulos en haces antiparalelos, mientras que las quinesinas-4 y 10 dirigidas hacia el extremo más conectan los microtúbulos a los brazos de los cromosomas y alejan los extremos menos de los cromosomas. Las proteínas motoras dineína y quinesina-14, junto con muchas otras proteínas, concentran estos extremos menos en un par de polos del huso.

que normalmente contienen centrosomas, los cromosomas ayudan a organizar los microtúbulos del huso y, con la colaboración de varias proteínas motoras, estimulan el ensamblaje de un huso mitótico bipolar si los centrosomas son eliminados. Aunque el huso acentrosómico resultante puede segregar los cromosomas con normalidad, carece de microtúbulos astrales, que son los responsables del posicionamiento del huso en las células animales; por consiguiente, con frecuencia el huso no está situado en la posición correcta, dando lugar a anomalías durante la citocinesis.

Los cinetocoros unen las cromátidas hermanas al huso

Tras el ensamblaje de un conjunto de microtúbulos bipolares, la segunda etapa principal de la formación del huso es la unión de los microtúbulos a los cromosomas. Los microtúbulos del huso se unen a cada cromátida hermana en el *cinetocoro*, una estructura proteica gigante de muchas capas construida en la heterocromatina que se forma en la región centromérica del cromosoma (**Figura 17-36**). Los extremos más de los microtúbulos cinetocóricos están insertados frontalmente en sitios especializados de unión a los microtúbulos del cinetocoro. Los cinetocoros de las células animales tienen de 10 a 40 de estos sitios de unión, mientras que los cinetocoros de las levaduras tan sólo tienen uno. Cada sitio de unión contiene un collar proteico que rodea al microtúbulo cerca de su extremo, el cual une con fuerza el microtúbulo al cinetocoro mientras que todavía se pueden añadir o eliminar subunidades de tubulina en este extremo (**Figura 17-37**). La regulación de la polimerización y de la despolimerización del extremo más en el cinetocoro es crítica para controlar el desplazamiento de los cromosomas en el huso, como se explicará más adelante.

Las células que tienen centrosomas utilizan un mecanismo de "busca y captura" para unir sus cromosomas mitóticos al huso. Los dinámicos extremos más de los microtúbulos irradian hacia fuera desde los centrosomas y finalmente capturan el cinetocoro de una cromátida hermana. En las células de pulmón de tritón, en las que podemos observar el proceso inicial de captura en un microscopio, primero se observa que el cinetocoro se adhiere al costado del microtúbulo y entonces se desliza a lo largo de él hacia el centrosoma. La adhesión lateral al cromosoma se convierte con rapidez en una unión frontal. Al mismo tiempo, los microtúbulos que crecen del polo opuesto del huso se unen al cinetocoro del lado opuesto del cromosoma y forman una unión bipolar (**Figura 17-38**).

¿Cómo se produce la unión de los cromosomas en ausencia de centrosomas? Una posibilidad es que algunos microtúbulos cortos, localizados cerca de los cromosomas, interactúen con los cinetocoros y se inserten en los collares de unión al extremo más del cinetocoro. La polimerización en estos extremos más daría lugar al crecimiento de los microtúbulos lejos del cinetocoro. Por último, los extremos menos de estos microtúbulos cinetocóricos, como

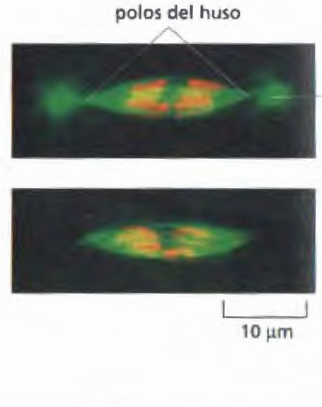


Figura 17-35 Ensamblaje de un huso bipolar sin centrosomas en un embrión partenogenético del insecto *Sciara* (o fungus gnat). Los microtúbulos están teñidos de *verde* y los cromosomas de *rojo*. La micrografía de fluorescencia de la *parte superior* muestra un huso normal formado con centrosomas en un embrión de *Sciara* fecundado normalmente. La micrografía de la *parte inferior* muestra un huso formado sin centrosomas en un embrión que ha iniciado el desarrollo sin fecundación. Se puede observar que el huso con centrosomas tiene un áster en cada polo del huso, mientras que el huso formado sin centrosomas no lo tiene. Ambos tipos de huso pueden segregar los cromosomas replicados. (De B. de Saint Phalle y W. Sullivan, *J. Cell Biol.* 141: 1383-1391, 1998. Con la autorización de The Rockefeller University Press.)

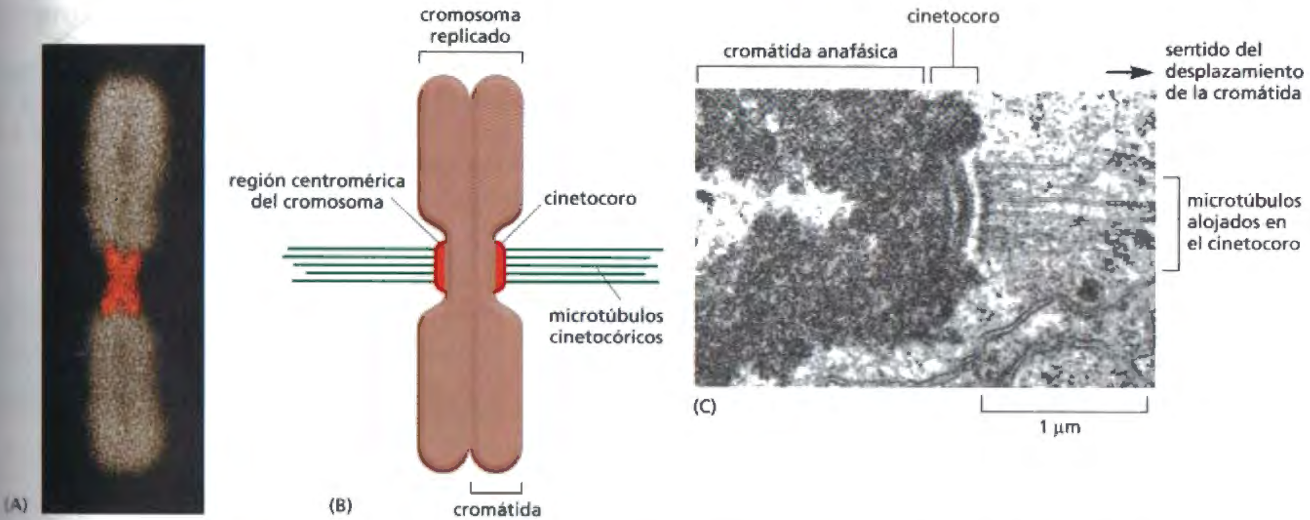


Figura 17–36 Cinetocoro. (A) Micrografía de fluorescencia de un cromosoma metafásico teñido con un colorante fluorescente que se une al DNA y con un autoanticuerpo humano que reconoce proteínas cinetocóricas específicas. Los dos cinetocoros, cada uno de ellos asociado a una cromátida, están teñidos de *rojo*. (B) Esquema de un cromosoma metafásico en el que se muestran sus dos cromátidas hermanas unidas a los extremos más de los microtúbulos cinetocóricos. Cada cinetocoro forma una placa sobre la superficie del centrómero. El número de microtúbulos unidos a un cinetocoro metafásico varía entre 1 en la levadura de gemación hasta 40 en algunas células de mamífero. (C) Electromicrografía de una cromátida anafásica con los microtúbulos unidos a su cinetocoro. Mientras que la mayoría de cinetocoros tienen una estructura trilaminar, la que se ve en la figura (procedente de un alga verde) tiene una estructura compleja, poco común, con láminas adicionales. (A, cortesía de B.R. Brinkley; C, de J.D. Pickett-Heaps y L.C. Fowke, *Aust. J. Biol. Sci.* 23:71-92, 1970. Con la autorización de CSIRO.)

otros extremos menos de husos mitóticos sin centrosomas, se entrecruzarían con otros extremos menos y se orientarían mediante proteínas motoras en el polo del huso (véase figura 17–34).

La biorientación se consigue mediante ensayo y error

El éxito de la mitosis requiere que las cromátidas hermanas se unan a los polos opuestos del huso mitótico, para que así se transporten a extremos opuestos de la célula cuando se separan en la anafase. ¿Cómo se consigue este modo de unión, denominado **biorientación**? ¿Qué impide la unión de ambos cinetocoros al mismo polo del huso o la unión de un cinetocoro a ambos polos del huso? Parte de la respuesta es que los cinetocoros hermanos están construidos en una orientación opuesta que disminuye la probabilidad de que ambos cinetocoros puedan orientarse hacia el mismo polo del huso. No obstante, se producen uniones anómalas y se han desarrollado elegantes mecanismos reguladores para corregirlas.

Las uniones incorrectas se corrigen mediante un sistema de ensayo y error que se basa en un principio sencillo: las uniones incorrectas son muy inestables y no duran, mientras que las uniones correctas se mantienen. Pero, ¿cómo detecta el cinetocoro una unión correcta? La respuesta parece ser la tensión. Cuando un par de cromátidas hermanas están biorientadas de forma adecuada en el huso, los dos cinetocoros son arrastrados en sentidos opuestos mediante fuertes fuerzas dirigidas hacia los polos. La cohesión de las cromátidas

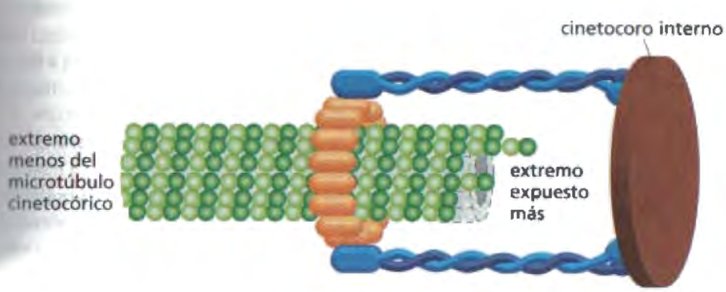


Figura 17–37 Lugar de unión de un microtúbulo a un cinetocoro. Parece que cada lugar contiene una estructura semejante a un collar (*amarillo*) que rodea el extremo más del microtúbulo, permitiendo que la polimerización y la despolimerización tengan lugar en el extremo expuesto más mientras que el microtúbulo permanece unido al cinetocoro.

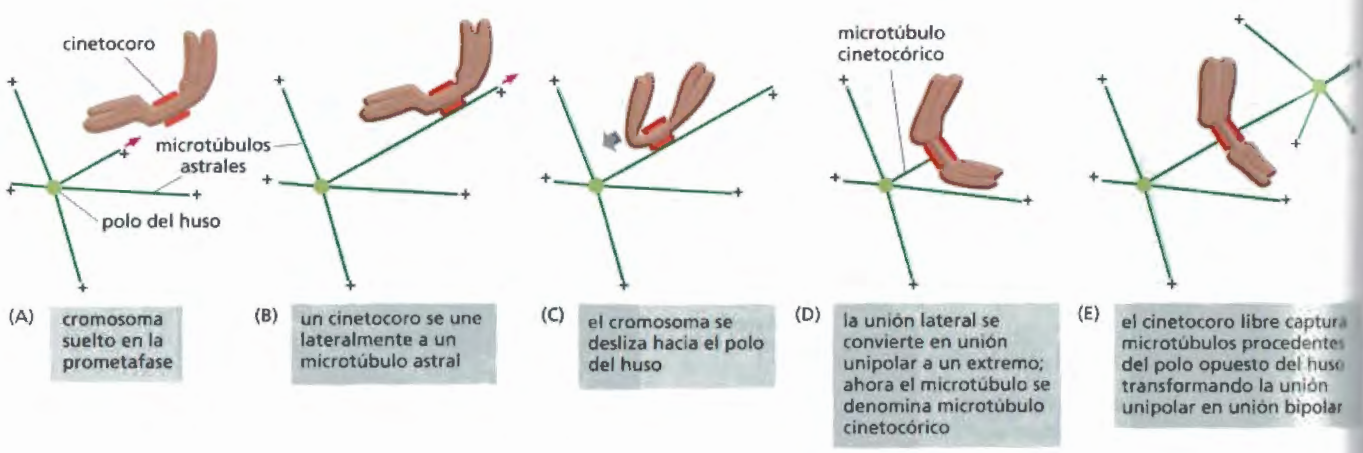


Figura 17-38 Captura de los microtúbulos del centrosoma por los cinetocoros. La *flecha roja* en (A) indica el sentido del crecimiento del microtúbulo, mientras que la *flecha gris* en (C) indica el sentido del deslizamiento del cromosoma.

hermanas resiste estas fuerzas y genera mucha tensión en los cinetocoros. Cuando los cromosomas están unidos incorrectamente -por ejemplo, cuando ambas cromátidas hermanas están unidas al mismo polo del huso- la tensión es baja y el cinetocoro envía una señal inhibidora que afloja el agarre de su sitio de unión al microtúbulo, permitiendo que se separe. Cuando se produce la biorientación, la gran tensión en el cinetocoro interrumpe la señal inhibidora y refuerza la unión del microtúbulo (**Figura 17-39**). En las células animales, la tensión no sólo aumenta la afinidad del sitio de unión sino que también da lugar a la unión de microtúbulos adicionales al cinetocoro. Este fenómeno conduce a la formación de una gruesa *fibra cinetocórica* compuesta de múltiples microtúbulos.

El mecanismo sensor de la tensión depende de la proteína quinasa Aurora-B, la cual se asocia con el cinetocoro. Se cree que Aurora-B genera la señal inhibidora que reduce la fuerza de la unión de los microtúbulos en ausencia de tensión. Aurora-B fosforila varios componentes del sitio de unión de los microtúbulos y disminuye la afinidad de estos sitios de unión por los extremos más de los microtúbulos. Cuando se produce la biorientación, Aurora-B se inactiva, reduciéndose así la fosforilación de los cinetocoros y aumentando la afinidad del sitio de unión.

Tras unirse a los dos polos del huso, los cromosomas son arrastrados hacia atrás y hacia adelante, alcanzando finalmente una posición equidistante entre los dos polos del huso, denominada **placa metafásica**. En las células de los vertebrados, los cromosomas oscilan suavemente en la placa metafásica, esperando la señal para que las cromátidas hermanas se separen. La señal se produce, con un previsible retraso de tiempo, después de la unión bipolar del último de los cromosomas, como describiremos más adelante.

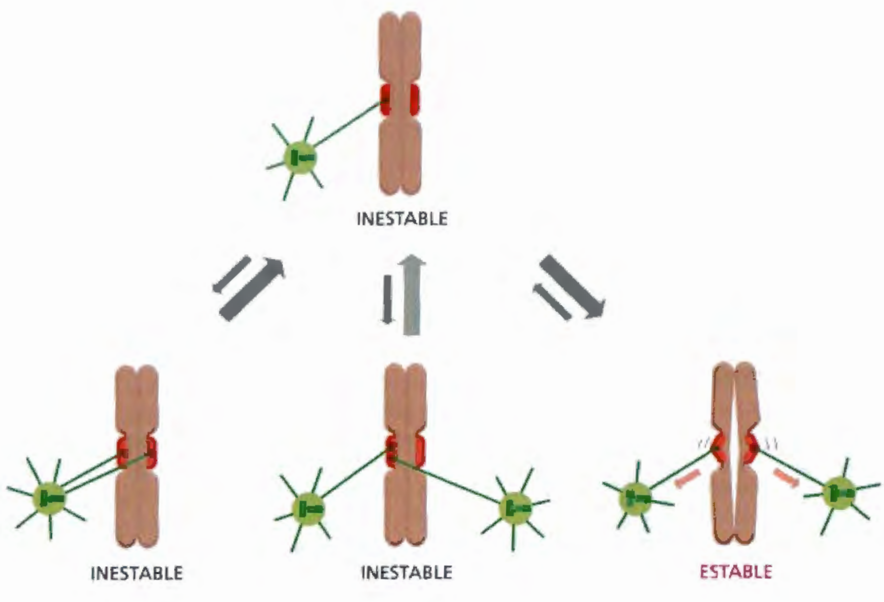


Figura 17-39 Formas alternativas de unión de los cromosomas. Inicialmente, un solo microtúbulo procedente de un polo del huso se une a un cinetocoro de un par de cromátidas hermanas. Después, se pueden unir microtúbulos adicionales al cromosoma de diferentes formas. Un microtúbulo procedente del mismo polo del huso que el microtúbulo anterior se puede unir al otro cinetocoro hermano; también puede ocurrir que dos microtúbulos procedentes de los dos polos del huso se unan a un mismo cinetocoro. Sin embargo, estas uniones incorrectas son inestables, de modo que uno de los dos microtúbulos tenderá a disociarse. Parece que cuando un segundo microtúbulo procedente del polo opuesto se une al segundo cinetocoro, los cinetocoros hermanos detectan la tensión a través de su lugar de unión a los microtúbulos, lo cual provoca un aumento de la afinidad de la unión de los microtúbulos. De este modo, se asegura una unión correcta.

Numerosas fuerzas desplazan los cromosomas en el huso

Las proteínas motoras y otros mecanismos generan las fuerzas que desplazan los cromosomas en los microtúbulos del huso mitótico. Se cree que son particularmente importantes tres fuerzas principales.

La primera fuerza principal estira del cinetocoro y de su cromosoma asociado a través del microtúbulo cinetocórico hacia el polo del huso. Esta fuerza está producida por proteínas del propio cinetocoro. Mediante un mecanismo incierto, la despolimerización en el extremo más del microtúbulo de algún modo genera una fuerza que tira del cinetocoro hacia los polos (**Figura 17–40**). Esta fuerza tira de los cromosomas durante la prometafase y la metafase y es sobre todo importante para trasladar las cromátidas hermanas hacia los polos después de que se hayan separado en la anafase, como se indicará más adelante. Cabe destacar que esta fuerza hacia los polos generada en el cinetocoro no requiere ATP. En principio, esta circunstancia puede parecer inverosímil, pero se ha observado que al colocar cinetocoros purificados en un tubo de ensayo en ausencia de ATP, éstos pueden permanecer unidos a los microtúbulos en despolimerización y de ese modo desplazarse. La energía que impulsa este desplazamiento está almacenada en el microtúbulo y se libera cuando el microtúbulo se despolimeriza; en última instancia procede de la hidrólisis del GTP que se produce después de que una subunidad de tubulina sea añadida al extremo de un microtúbulo (véase Capítulo 16).

Una segunda fuerza dirigida hacia los polos está proporcionada en algunos tipos celulares por el **flujo de microtúbulos**, mediante el cual los propios microtúbulos se desplazan hacia los polos del huso y se despolimerizan en sus extremos menos. Hasta el inicio de la anafase, la adición de nuevas subunidades de tubulina en el extremo más de un microtúbulo compensa la pérdida de subunidades de tubulina en el extremo menos, de modo que la longitud del microtúbulo se mantiene constante a pesar del desplazamiento de los microtúbulos hacia el polo del huso. El flujo de microtúbulos en los husos metafásicos se puede observar mediante un método ingenioso en el cual se inyectan cantidades muy pequeñas de tubulina fluorescente en células vivas (**Figura 17–41**). El resultado es la aparición de diminutas manchas fluorescentes que viajan hacia los polos en el cinetocoro y en los microtúbulos interpolares. Cualquier cinetocoro que se encuentre unido a un microtúbulo que experimente este flujo sufre una fuerza dirigida hacia los polos que contribuye a la generación de tensión en el cinetocoro y al desplazamiento de las cromátidas hermanas hacia los polos, después de que se hayan separado en la anafase.

Una tercera fuerza que actúa sobre los cromosomas es la *fuerza polar de expulsión*. Las proteínas motoras dirigidas hacia el extremo más, quinesina-4 y 10, de los brazos de los cromosomas, interactúan con los microtúbulos interpolares y transportan los cromosomas lejos de los polos del huso. Esta fuerza es en particular importante en la prometafase y en la metafase, cuando favorece la alineación de las cromátidas hermanas biorientadas en la placa metafásica (**Figura 17–42**).

Uno de los aspectos más llamativos de la mitosis en las células de los vertebrados es el continuo desplazamiento oscilatorio de los cromosomas en la prometafase y la metafase. Estos desplazamientos se han estudiado con videomicroscopía en células pulmonares de tritón, observándose una oscilación entre dos estados: un estado de aproximación al polo (P, *poleward*), cuando los cromosomas son arrastrados hacia el polo, y un estado de aleja-

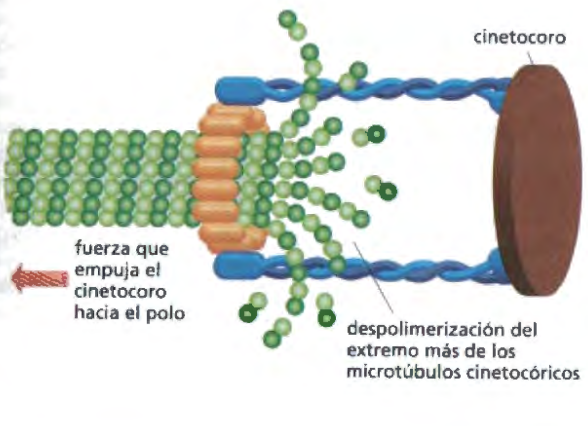


Figura 17–40 De qué forma la despolimerización puede empujar el cinetocoro hacia el polo del huso. Cuando se produce la despolimerización, los protofilamentos del microtúbulo se curvan hacia fuera (véase Figura 16–16) y empujan contra la estructura en forma de collar que rodea el extremo más del microtúbulo. En principio, esta fuerza desplazará el cinetocoro hacia el extremo menos del microtúbulo en el polo del huso.

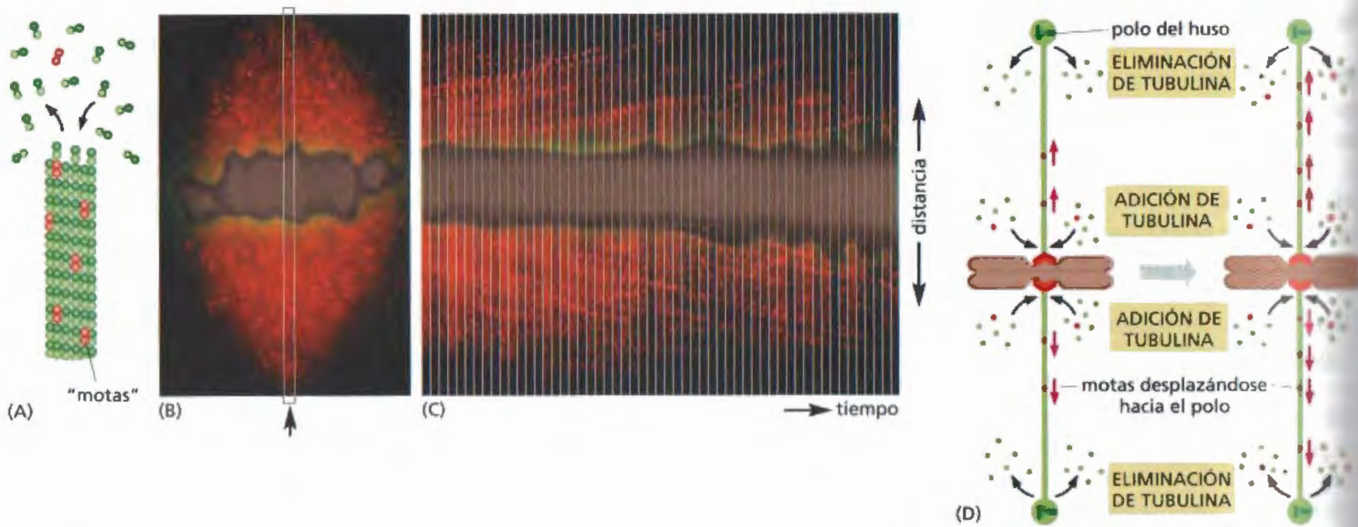


Figura 17–41 Flujo de microtúbulos en el huso metafásico. (A) Para observar el flujo de microtúbulos, se inyecta una cantidad muy pequeña de tubulina fluorescente en células vivas, de manera que los microtúbulos se forman con una proporción muy pequeña de tubulina fluorescente. Cuando estos microtúbulos se observan con un microscopio de fluorescencia tienen un aspecto moteado. (B) Micrografías de fluorescencia de un huso mitótico de una célula epitelial viva de pulmón de tritón. Los cromosomas están teñidos de *marrón* y las motas de tubulina de *rojo*. (C) Se puede seguir el desplazamiento de determinadas motas de tubulina mediante videomicroscopía con toma a intervalos. Las imágenes de la región rectangular, larga y estrecha (*flecha*) en (B) se tomaron a intervalos de tiempo consecutivos y se pegaron una al lado de la otra para hacer un montaje de la región durante toda la secuencia. Se puede ver cómo las motas se desplazan hacia los polos a una velocidad aproximada de 0,75 μm/min, lo que indica que los microtúbulos se están desplazando hacia los polos. (D) La longitud de los microtúbulos del huso metafásico no cambia significativamente, ya que se añaden nuevas subunidades de tubulina al extremo más de los microtúbulos a la misma velocidad a la que se eliminan las subunidades de tubulina del extremo menos. (B y C, de T.J. Mitchison y E.D. Salmon, *Nat. Cell Biol.* 3:E17-21, 2001. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

miento del polo (AP: ***away-from-the-pole***), o estado neutral, cuando las fuerzas dirigidas hacia los polos se inactivan y la fuerza polar de expulsión aleja los cromosomas del polo. La oscilación entre los dos estados puede depender del grado de tensión en el cinetocoro. Por ejemplo, se ha propuesto que a medida que los cromosomas se desplazan hacia el polo del huso, una fuerza polar de expulsión creciente genera tensión en el cinetocoro más cercano al polo, induciendo el cambio hacia el estado de alejamiento del polo y produciendo de forma gradual la acumulación de cromosomas en el ecuador del huso.

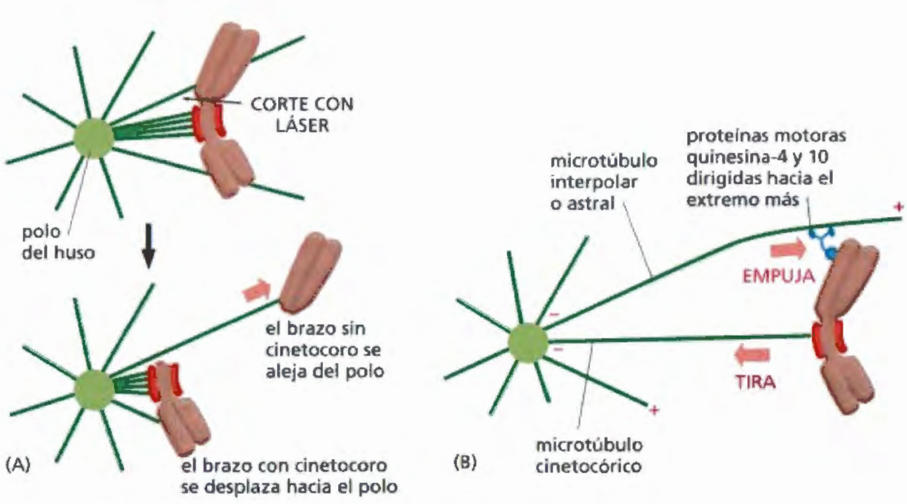


Figura 17–42 De qué forma fuerzas opuestas pueden dirigir a los cromosomas hacia la placa metafásica. (A) Evidencia de una fuerza de expulsión polar que aleja los cromosomas de los polos del huso hacia el ecuador del huso. En este experimento, un rayo láser ha cortado un cromosoma prometafásico que está unido a uno de los polos mediante microtúbulos cinetocóricos. El fragmento del cromosoma seccionado carente de cinetocoros se aleja rápidamente del polo, mientras que el fragmento que contiene el cinetocoro se desplaza hacia el polo, mostrando una repulsión decreciente. (B) Modelo del mecanismo mediante el cual dos fuerzas opuestas pueden colaborar dirigiendo los cromosomas hacia la placa metafásica. Parece que proteínas motoras dirigidas hacia el extremo más (quinesina-4 y quinesina-10) situadas en los brazos de los cromosomas interactúan con los microtúbulos generando la fuerza de expulsión polar, la cual empuja a los cromosomas hacia el ecuador del huso (véase Figura 17–30). Parece que las fuerzas dirigidas hacia los polos generadas por la despolimerización en el cinetocoro, junto con el flujo de microtúbulos, empujan a los cromosomas hacia el polo.

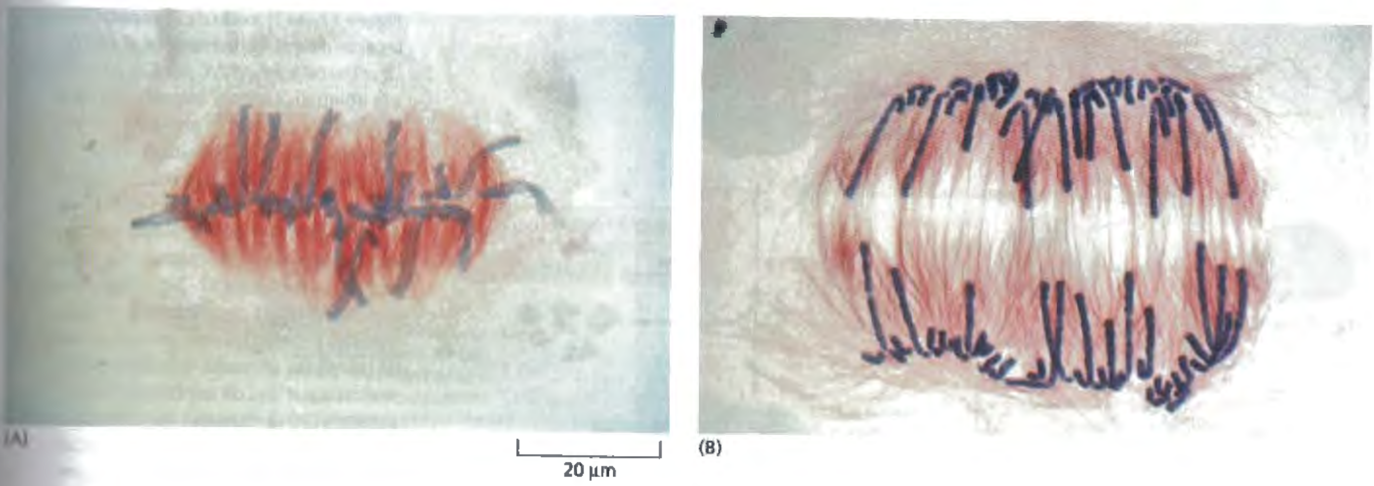


Figura 17–43 Separación de las cromátidas hermanas en la anafase. En la transición de la metafase (A) a la anafase (B), las cromátidas hermanas se separan de forma súbita y se desplazan hacia los polos opuestos del huso mitótico –como se observa en estas micrografías de las células del endospermo de *Haemanthus* (lirio) que fueron teñidas con anticuerpos contra tubulina marcados con oro. (Cortesía de Andrew Bajer.)

El APC/C desencadena la separación de las cromátidas hermanas y la finalización de la mitosis

Cuando Cdk-M ha inducido las reorganizaciones del comienzo de la mitosis, el ciclo celular alcanza su punto culminante con la separación de las cromátidas hermanas en la transición de la metafase a la anafase (**Figura 17–43**). Aunque la actividad de Cdk-M determina la etapa en la que esto sucede, el complejo promotor de la anafase (APC/C: *anaphase-promoting complex/cyclosome*) mencionado antes conecta el interruptor que inicia la separación de las cromátidas hermanas, mediante la ubiquitinización de varias proteínas mitóticas reguladoras, e induce así su degradación (véase Figura 17–20A).

Durante la metafase, las cohesinas mantienen las cromátidas hermanas juntas al resistir las fuerzas dirigidas hacia los polos que separan a las cromátidas hermanas. La anafase comienza con la súbita ruptura de la cohesión entre las cromátidas hermanas, lo cual les permite separarse y dirigirse hacia los polos opuestos del huso mitótico. El APC/C inicia el proceso al inducir la degradación de la proteína inhibidora **segurina**. Antes de la anafase, la segurina se une e inhibe la proteasa llamada **separasa**. La degradación de la segurina al final de la metafase libera la separasa, la cual ahora puede escindir una de las subunidades de la cohesina. Las cohesinas se desprenden y las cromátidas hermanas se separan de forma súbita y sincronizada (**Figura 17–44**).

Además de la segurina, el APC/C también promueve la degradación de las ciclinas S y M, provocando la pérdida de la mayoría de la actividad Cdk en la anafase. La inhibición de la actividad Cdk permite que las fosfatasas defosforilen la mayoría de sustratos diana de las Cdk de la célula, como se requiere para finalizar la mitosis y la citocinesis (se describe más adelante).

Si el APC/C desencadena la anafase, ¿qué es lo que lo activa? La respuesta se conoce sólo en parte. Como se ha señalado antes, la activación del APC/C es dependiente de la proteína Cdc20, la cual se une y activa el APC/C durante la mitosis (véase Figura 17–20A). Al menos dos procesos regulan Cdc20 y su asociación con el APC/C. Primero, la síntesis de Cdc20 aumenta a medida que la célula se aproxima a la mitosis, debido a un aumento de la transcripción de su gen. Segundo, la fosforilación del APC/C ayuda a que Cdc20 se una al APC/C, contribuyendo así a la creación de un complejo activo. Entre las quinasas que fosforilan y así activan el APC/C se encuentra Cdk-M. Por lo tanto, Cdk-M no sólo desencadena los acontecimientos mitóticos iniciales que conducen a la metafase, sino que también prepara la etapa para la progresión a la anafase. La capacidad de Cdk-M de activar el APC/C-Cdc20 genera un bucle de retroalimentación negativo: Cdk-M pone en funcionamiento un proceso regulador que conduce a la degradación de la ciclina y a su propia inactivación.

Los cromosomas sueltos bloquean la separación de las cromátidas hermanas: el punto de control del ensamblaje del huso

Las células pasan cerca de la mitad de la mitosis en la metafase, con los cromosomas alineados en la placa metafásica, dándose "empujones", a la espera de la señal del APC/C que

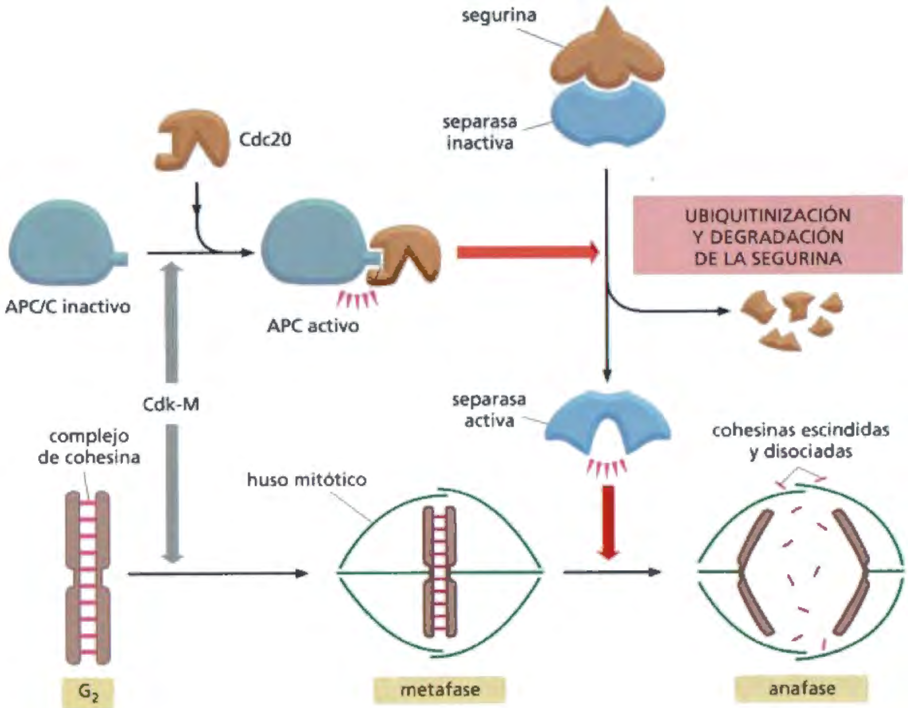


Figura 17–44 El inicio de la separación de las cromátidas hermanas por el APC/C. La activación del APC/C por Cdc20 conduce a la ubiquitinización y degradación de la segurina, la cual por lo general mantiene la separasa en un estado inactivo. La degradación de la segurina permite que la separasa escinda Scc1, una de las subunidades del complejo de cohesinas que mantiene a las cromátidas hermanas unidas (véase Figura 17–24). A continuación, fuerzas opuestas generadas por el huso mitótico separan las cromátidas hermanas. En las células animales, la fosforilación realizada por las Cdk también inhibe la separasa (no se muestra). Así, la inactivación de la Cdk en la anafase (como consecuencia de la degradación de la ciclina) también induce la activación de la separasa al permitir su defosforilación.

induzca la separación de las cromátidas hermanas. Los fármacos que desestabilizan los microtúbulos, como la colchicina o la vinblastina (véase Capítulo 16), detienen las células en la mitosis durante horas o incluso días. Esta observación conduce a la identificación de un mecanismo de **punto de control del ensamblaje del huso** que se activa mediante el tratamiento con los fármacos y bloquea la progresión a través de la transición de la metafase a la anafase. Este mecanismo de punto de control asegura que las células no entren en la anafase hasta que todos los cromosomas estén correctamente biorientados en el huso mitótico.

El punto de control del ensamblaje del huso depende de un mecanismo sensor que comprueba la fuerza de la unión de los microtúbulos y, posiblemente, la tensión en el cinetocoro. Cualquier cinetocoro que no esté correctamente unido al huso emite una señal inhibidora que impide la activación del APC/C-Cdc20, bloqueando así la transición de la metafase a la anafase. Sólo se levanta este bloqueo cuando el último cinetocoro está unido de forma correcta permitiendo que se produzca la separación de las cromátidas hermanas.

Parece que los cinetocoros unidos de forma incorrecta generan de algún modo una señal difusible que inhibe la actividad del APC/C-Cdc20. Aunque se desconocen las bases moleculares de esta señal, existen pruebas de que estos cinetocoros reclutan varias proteínas, incluida *Mad2*, que son necesarias para que el punto de control del ensamblaje del huso sea funcional (**Figura 17–45**). Una posibilidad atractiva, basada sobre todo en detallados análisis estructurales de Mad2, es que los cinetocoros sueltos actúen como una enzima que cataliza un cambio en la conformación de Mad2, de manera que Mad2 pueda unirse e inhibir el APC/C-Cdc20.

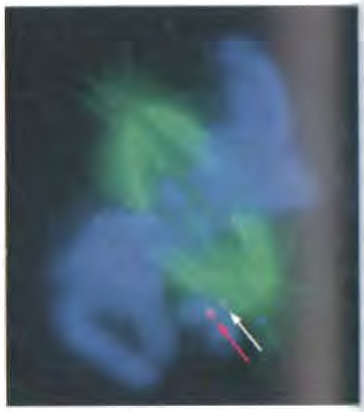


Figura 17–45 La proteína Mad2 en los cinetocoros no unidos al huso. Esta micrografía de fluorescencia muestra una célula de mamífero en la prometafase, con el huso mitótico en *verde* y las cromátidas hermanas en *azul*. Un par de cromátidas hermanas se han unido a un solo polo del huso. El marcaje con anticuerpos anti-Mad2 indica que Mad2 se encuentra en el cinetocoro de la cromátida hermana no unida al huso mitótico (*punto rojo*, indicado por una *flecha roja*). Una pequeña cantidad de Mad2 está asociada con el cinetocoro de la cromátida hermana que está unida al polo del huso (*punto pálido*, indicado por una *flecha blanca*). (De J.C. Waters et al., *J. Cell Biol.* 141:1181-1191, 1998. Con la autorización de The Rockefeller University Press.)

En las células somáticas de los mamíferos, el punto de control del ensamblaje del huso determina el ritmo normal de la anafase. La degradación de la segurina en estas células empieza instantes después de que el último par de cromátidas hermanas se haya biorientado en el huso y la anafase comienza unos 20 minutos después. La inhibición experimental de este mecanismo de punto de control provoca la separación prematura de las cromátidas hermanas y el inicio de la anafase. Sorprendentemente, en algunas células como las levaduras y las células de embriones en desarrollo de rana y mosca, el momento adecuado de inicio de la anafase no depende del punto de control del ensamblaje del huso. En estas células tiene que existir algún otro mecanismo, hasta ahora desconocido, que determina el ritmo de la anafase.

Los cromosomas se segregan en la anafase A y B

La perdida súbita de la cohesión de las cromátidas hermanas, al comienzo de la anafase, da lugar a la separación de las cromátidas hermanas y permite que las fuerzas del huso mitóti-

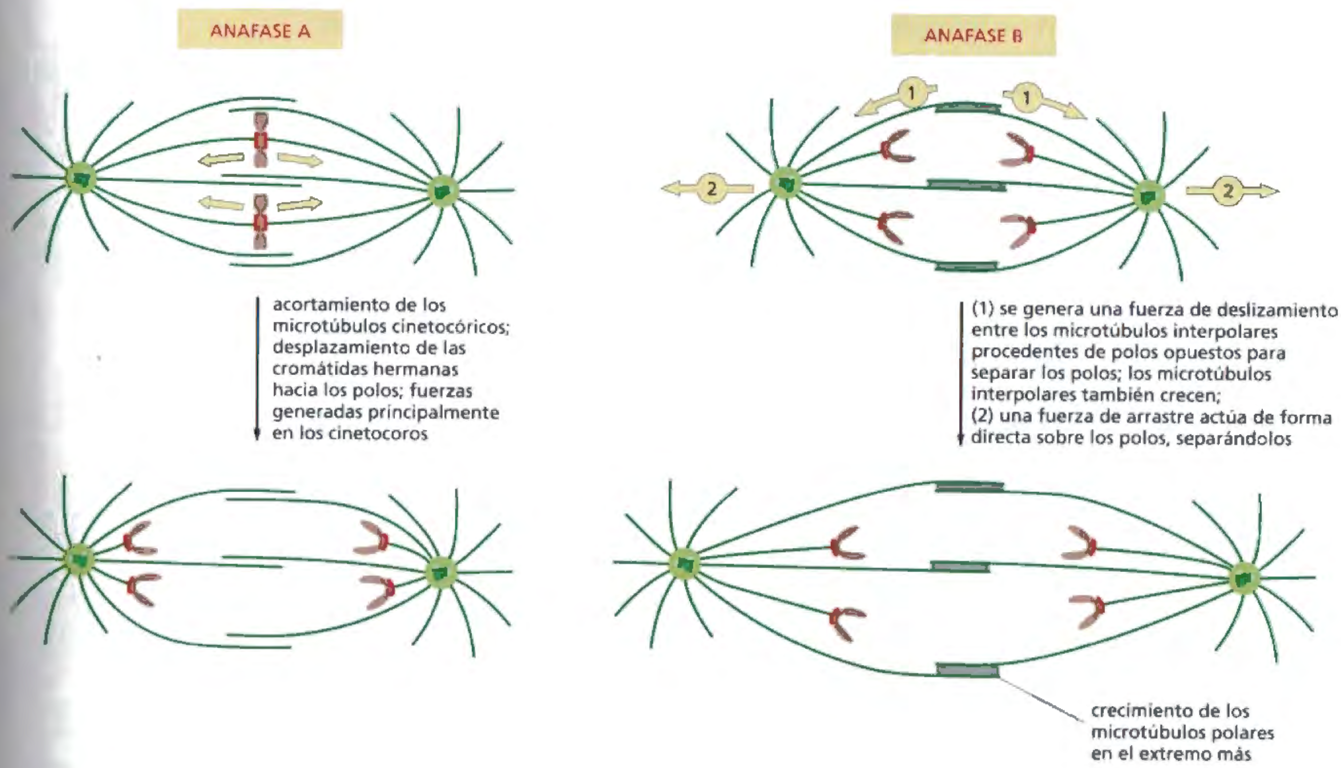


Figura 17–46 Principales fuerzas que separan las cromátidas hermanas durante la anafase en las células de los mamíferos. El desplazamiento de los cromosomas hacia los polos durante la anafase A depende de la despolimerización de los microtúbulos cinetocóricos y del flujo hacia los polos de los microtúbulos. En la anafase B, los dos polos del huso se separan. Parece que las responsables de la anafase B son dos fuerzas distintas: por un lado, la elongación y el deslizamiento de los microtúbulos interpolares en el huso central provoca la separación de los dos polos y, por otro, unas proteínas motoras unidas a la membrana plasmática cerca de cada polo del huso actúan sobre los microtúbulos astrales separando los polos hacia la superficie celular.

co arrastren a las cromátidas hermanas a polos opuestos de la célula; este proceso se denomina *segregación cromosómica*. Los cromosomas se desplazan mediante dos procesos independientes y solapados. El primero, llamado **anafase A**, es el desplazamiento inicial de los cromosomas hacia los polos, el cual se acompaña de un acortamiento de los microtúbulos cinetocóricos. El segundo, llamado **anafase B**, consiste en la separación de los polos del huso entre sí, que empieza después de que las cromátidas hermanas se hayan separado y los cromosomas hijos se distancien un poco (**Figura 17–46**).

El desplazamiento de los cromosomas durante la anafase A depende de la combinación de las dos fuerzas principales dirigidas hacia los polos que hemos descrito. La primera de ellas es la fuerza generada por la despolimerización de los microtúbulos en el cinetocoro, que da lugar a la pérdida de subunidades de tubulina en el extremo más a medida que el cinetocoro se desplaza hacia el polo. La segunda fuerza procede del flujo de microtúbulos, que es el desplazamiento de los microtúbulos hacia el polo del huso, donde se produce la despolimerización del extremo menos. La importancia relativa de estas dos fuerzas durante la anafase depende del tipo celular: por ejemplo, en células embrionarias, el desplazamiento de los cromosomas depende principalmente del flujo de microtúbulos, mientras que en levaduras y células somáticas de los vertebrados el desplazamiento resulta sobre todo de fuerzas generadas en el cinetocoro.

La separación de los polos del huso durante la anafase B depende de mecanismos impulsados por proteínas motoras semejantes a los mecanismos que separan a los dos centrosomas al inicio de la mitosis (véase Figura 17–30). Los motores de quinesina-5 dirigidos hacia el extremo más, que entrecruzan los extremos solapados más de los microtúbulos interpolares, separan los polos. Además, los motores de dineína que anclan los extremos más de los microtúbulos astrales al córtex celular separan los polos.

Aunque la separación de las cromátidas hermanas inicia los desplazamientos de los cromosomas de la anafase A, otros mecanismos también aseguran que se efectúen los desplazamientos correctos de los cromosomas en la anafase A y el alargamiento del huso en la anafase B. Una cuestión más importante todavía, la finalización de la anafase depende de la desfosforilación de los sustratos de la Cdk; en la mayoría de células, este último proceso es consecuencia de la degradación de las ciclinas dependiente del APC/C. Por lo general, si se impide la degradación de la ciclina M –por ejemplo, a partir de la síntesis de una forma mutante que no sea reconocida por el APC/C– se produce la separación de las cromátidas hermanas, pero el desplazamiento de los cromosomas y el comportamiento de los microtúbulos de la anafase son anormales.

Las contribuciones relativas de la anafase A y la anafase B en la segregación de los cromosomas varía mucho, dependiendo del tipo celular. En células de mamífero, la anafase B empieza poco después que la anafase A y finaliza cuando el huso tiene aproximadamente el doble de longitud que en la metafase; por el contrario, en las levaduras y en algunos protozoos, es en la anafase B cuando se separan los cromosomas y los husos alcanzan una longitud hasta quince veces mayor que en la metafase.

Los cromosomas segregados se empaquetan en núcleos hijos en la telofase

Al final de la anafase, los cromosomas hijos se han segregado en dos grupos iguales en extremos opuestos de la célula. En la **telofase**, la etapa final de la mitosis, las dos dotaciones cromosómicas se empaquetan en un par de núcleos hijos. El primer gran acontecimiento de la telofase es el desensamblaje del huso mitótico, seguido de la reorganización de la envoltura nuclear. Al principio, los fragmentos de la membrana nuclear se asocian con la superficie de los cromosomas. Estos fragmentos de membrana se fusionan encerrando parcialmente grupos de cromosomas y después uniéndose entre ellos hasta recomponer la envoltura nuclear completa. Los complejos de los poros nucleares se incorporan a la envoltura nuclear, la lámina nuclear se vuelve a formar y la envoltura nuclear vuelve otra vez a ser continua con el retículo endoplasmático. Cuando la envoltura nuclear se ha reconstituido, los complejos de los poros bombean las proteínas nucleares hacia el interior, el núcleo se expande y los cromosomas mitóticos se descondensan recuperando su estado interfásico, lo que permite que la transcripción génica se reanude. Se ha generado un nuevo núcleo y la mitosis ha finalizado. Lo único que falta es que la célula se divida en dos.

La fosforilación de varias proteínas por Cdk-M al inicio de la mitosis estimula el ensamblaje del huso, la condensación de los cromosomas y la desorganización de la envoltura nuclear. Por lo tanto, no es sorprendente que para que tenga lugar el desensamblaje del huso y la formación de los núcleos hijos en la telofase se requiera la defosforilación de estas mismas proteínas. En principio, estas defosforilaciones y la finalización de la mitosis podrían producirse mediante la inactivación de las Cdk, la activación de fosfatasas o por ambos procesos. Aunque en la mayoría de células la inactivación de las Cdk –sobre todo como consecuencia de la degradación de las ciclinas– es la responsable principal, algunas células también dependen de la activación de fosfatasas. En la levadura de gemación, por ejemplo, la finalización de la mitosis depende de la activación de una fosfatasa denominada *Cdc14*, la cual defosforila un subconjunto de sustratos de la Cdk implicados en la anafase y en la telofase.

La meiosis es una forma especial de división nuclear implicada en la reproducción sexual

La mayoría de los organismos eucariotas se reproducen de forma sexual: los genomas del padre y de la madre se mezclan generando descendientes que son genéticamente diferentes de cada progenitor (véase Capítulo 21). Por lo general, las células de estos organismos son *diploides*: es decir, contienen dos copias ligeramente diferentes, u *homólogos*, de cada cromosoma, uno del padre y otro de la madre. La reproducción sexual depende de un proceso de división nuclear especializado denominado *meiosis*, en el que se producen células *haploides* portadoras de una única copia de cada cromosoma. En muchos organismos, las células haploides se diferencian en células reproductoras especializadas denominadas *gametos* –óvulos y espermatozoides en la mayoría de especies. En estas especies, el ciclo reproductor termina cuando un espermatozoide y un óvulo se fusionan formando un zigoto diploide con el potencial de formar un nuevo individuo. A continuación se considerarán los mecanismos básicos y la regulación de la meiosis y se pondrán de manifiesto las diferencias con los de la mitosis. La meiosis se describe con más detalle en el Capítulo 21.

La meiosis comienza con una ronda de duplicación cromosómica, denominada *fase S meiótica*, seguida de dos rondas de segregación cromosómica, denominadas *meiosis I* y *II*. En la meiosis I, se segregan los homólogos (cada uno compuesto por un par de cromátidas hermanas fuertemente unidas). En la meiosis II, como en la mitosis convencional, se segregan las cromátidas hermanas de cada homólogo (**Figura 17–47**).

La primera división meiótica resuelve el problema fundamental de la meiosis: cómo segregar los cromosomas homólogos. Como en el caso de la segregación de las cromátidas her-

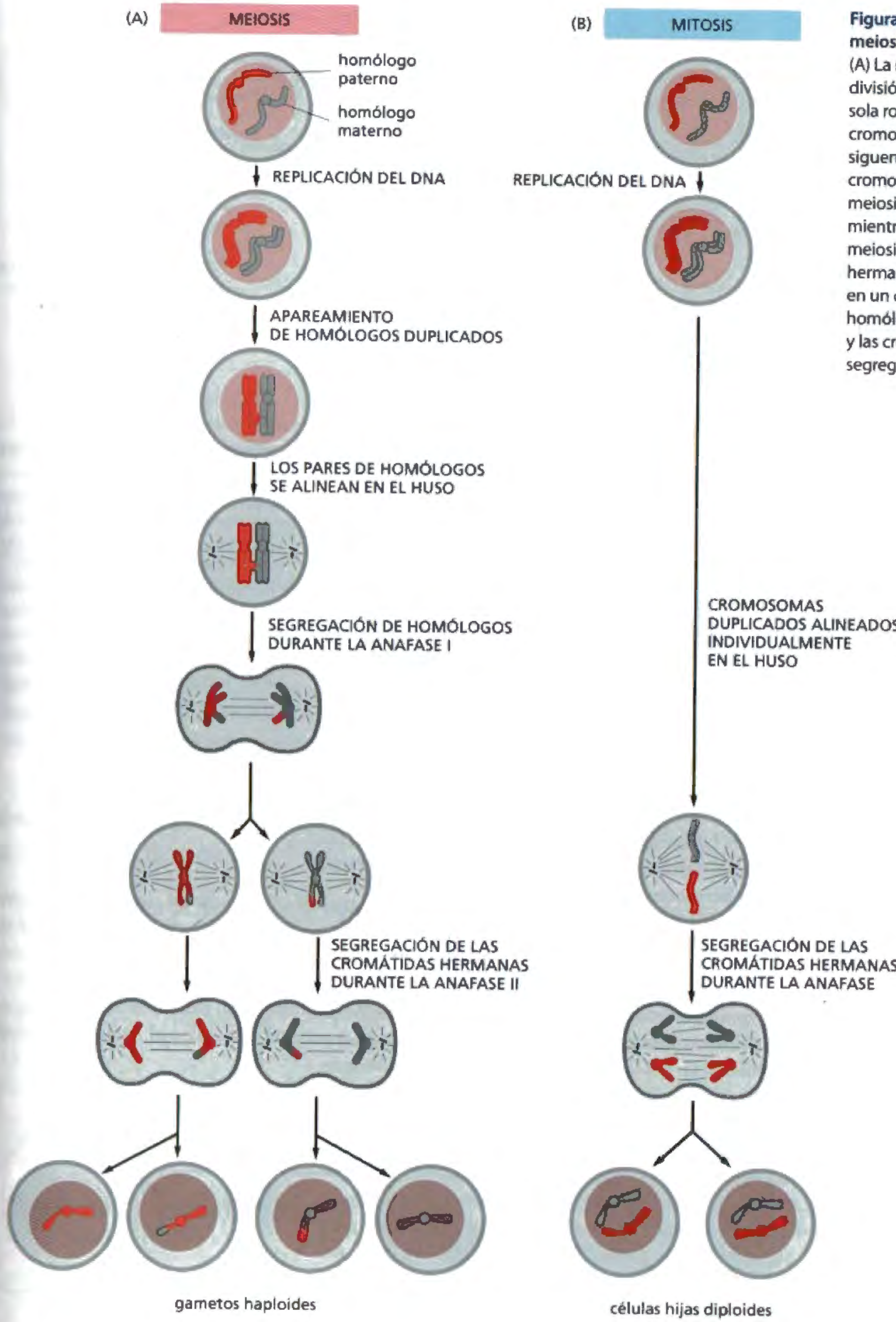


Figura 17–47 Comparación entre la meiosis y el ciclo celular mitótico. (A) La meiosis es una forma de división nuclear en la que a una sola ronda de duplicación cromosómica (fase S meiótica) le siguen dos rondas de segregación cromosómica. La primera ronda, meiosis I, segrega los homólogos, mientras que la segunda ronda, meiosis II, segrega las cromátidas hermanas. (B) Por el contrario, en un ciclo celular mitótico, los homólogos no se emparejan y las cromátidas hermanas se segregan en una sola división.

…as en la mitosis, la segregación de los cromosomas homólogos en la meiosis I depende de …formación de puentes entre los cromosomas homólogos. Estos puentes permiten que las …jas de homólogos se biorienten en el primer huso meiótico, con los homólogos unidos a …los opuestos. Los puentes entre los homólogos se eliminan al comienzo de la anafase I; es… hecho posibilita que el huso arrastre a los homólogos a extremos opuestos de la célula.

Los puentes se forman entre los homólogos mediante un proceso extraordinariamente …go y complejo que sucede después de la fase S meiótica, en un periodo denominado *pro… meiótica* o *profase I*. Este proceso comienza con el *apareamiento* de los homólogos, en el … éstos empiezan a desplazarse juntos en el núcleo, sobre todo como consecuencia de in-

teracciones entre secuencias de DNA complementarias de los dos homólogos. Los puentes entre los homólogos se aseguran mediante recombinación homóloga entre cromátidas no hermanas de cada par de homólogos: se producen roturas de la doble cadena de DNA en varios lugares de cada cromátida hermana, produciéndose muchos episodios de recombinación de DNA entre los homólogos. Algunos de estos episodios dan lugar a intercambios recíprocos de DNA denominados *entrecruzamientos*, en los que el DNA de una cromátida se entrecruza haciéndose continuo con el DNA de una cromátida homóloga (**Figura 17–48**). En cada par de homólogos, se produce al menos uno de estos entrecruzamientos, lo que asegura que los homólogos de cada par estén físicamente conectados cuando la célula entra en la primera división meiótica.

Cuando los pares de homólogos están unidos al primer huso meiótico se tiene que solucionar otro problema meiótico característico. Cada homólogo contiene dos cromátidas hermanas estrechamente unidas, de modo que la unión de un homólogo a un polo del huso requiere que los dos cinetocoros hermanos de un homólogo se unan al mismo polo. Por lo general durante la mitosis se evita este tipo de unión (véase Figura 17–39). Sin embargo, en la meiosis I, los dos cinetocoros hermanos están de algún modo fusionados en una sola unidad de unión a microtúbulos que se conecta a un solo polo (véase Figura 21–12A). Estos mecanismos se invierten después de la meiosis I, de modo que en la meiosis II los pares de cromátidas hermanas pueden biorientarse en el huso igual que en la mitosis.

Los entrecruzamientos mantienen los pares de homólogos juntos sólo porque los brazos de las cromátidas hermanas están conectados mediante la cohesión de las cromátidas hermanas (véase Figura 17–48). Por lo tanto, la pérdida de cohesión de los brazos de las cromátidas hermanas desencadena la separación de los homólogos al comienzo de la anafase I. En la mayoría de las especies, la pérdida de cohesión de los brazos en la meiosis I depende de la activación del APC/C, el cual induce la degradación de la segurina, la activación de la separasa y la escisión de las cohesinas a lo largo de los brazos (véase Figura 17–44). Sin embargo, a diferencia de la mitosis, los complejos de cohesinas más cercanos a los centrómeros permanecen intactos en la meiosis I porque la cohesina de esta región está protegida de la separasa (véase Capítulo 21). Por consiguiente, los pares de cromátidas hermanas se mantienen unidas en sus centrómeros durante toda la meiosis I, permitiendo su biorientación correcta en el huso en la meiosis II. Los mecanismos que impiden la degradación de las cohesinas en el centrómero durante la meiosis I desaparecen en la meiosis II. Por lo tanto, al inicio de la anafase II, la activación del APC/C desencadena la escisión de la cohesión centromérica y la separación de las cromátidas hermanas, tal como sucede en la mitosis.

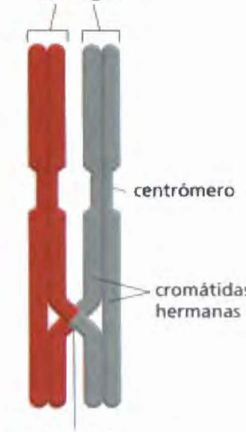


Figura 17–48 Entrecruzamiento entre homólogos. Como en la mitosis, las cromátidas hermanas de cada homólogo están fuertemente unidas a lo largo de toda su longitud. En este ejemplo, se ha producido un solo entrecruzamiento entre dos cromátidas no hermanas, pero cualquiera de las dos cromátidas de un homólogo puede formar un entrecruzamiento con cualquier cromátida del otro homólogo; es un hecho habitual que se formen numerosos entrecruzamientos.

Resumen

Cdk-M desencadena los acontecimientos del comienzo de la mitosis, incluyendo la condensación de los cromosomas, el ensamblaje del huso mitótico y la unión bipolar de las cromátidas hermanas a los microtúbulos del huso. La formación del huso en las células animales depende en gran medida de la capacidad de los cromosomas mitóticos de estimular la nucleación y la estabilidad local de los microtúbulos, así como de la capacidad de las proteínas motoras para organizar a los microtúbulos en un conjunto bipolar. Muchas células también utilizan centrosomas para facilitar el ensamblaje del huso. El APC/C desencadena la anafase al estimular la degradación de las proteínas que mantienen unidas las cromátidas. El APC/C también induce la degradación de la ciclina y de esta manera la inactivación de Cdk-M. La defosforilación resultante de las dianas de la Cdk es necesaria para que se produzcan los acontecimientos que completan la mitosis, incluyendo el desensamblaje del huso y la reorganización de la envoltura nuclear. La meiosis es una forma especializada de división nuclear en la que una sola ronda de duplicación cromosómica es seguida de dos rondas de segregación cromosómica, dando como resultado la formación de núcleos haploides.

CITOCINESIS

La última etapa del ciclo celular es la **citocinesis**, la división del citoplasma. En una célula normal, la citocinesis acompaña a cada mitosis, aunque algunas células, como las de los embriones en desarrollo de *Drosophila* (se describe después), y algunos hepatocitos y células musculares cardíacas de mamíferos, experimentan mitosis sin citocinesis y de ese modo presentan varios núcleos. En la mayoría de células animales, la citocinesis empieza en la anafase y acaba poco después de que termine la mitosis, en la telofase.

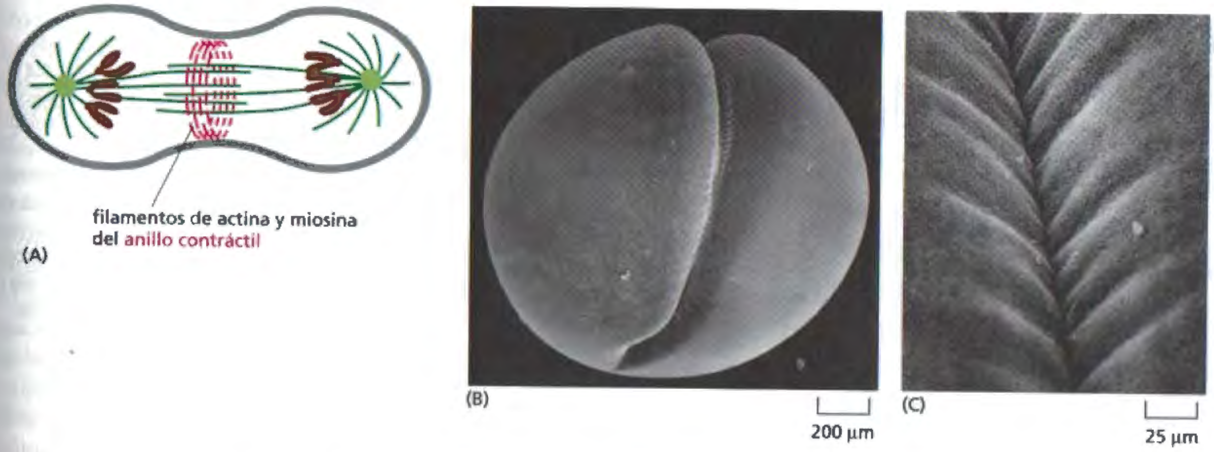


Figura 17–49 Citocinesis. (A) Los haces de actina-miosina del anillo contráctil se orientan como se muestra, de manera que su contracción arrastra la membrana hacia dentro. (B) En esta electromicrografía de barrido a pocos aumentos de un óvulo de rana en división, el surco de segmentación es muy evidente y está bien definido, ya que la célula es extraordinariamente grande. La aparición del surco en la membrana celular se debe a la actividad del anillo contráctil situado debajo de ella. (C) La superficie de un surco a más aumento. (B y C, de H.W. Beams y R.G. Kessel, *Am. Sci.* 64:279-290, 1976. Con la autorización de Sigma Xi.)

El primer cambio visible de la citocinesis en una célula animal es la aparición repentina de un fruncido, o *surco de segmentación*, en la superficie celular. El surco rápidamente se hace profundo y se extiende alrededor de la célula hasta que la divide por completo en dos. En las células animales y en muchos eucariotas unicelulares, la estructura esencial de este proceso es el *anillo contráctil*: un ensamblaje dinámico formado por filamentos de actina, filamentos de miosina II, y muchas proteínas estructurales y reguladoras. Durante la anafase, el anillo se ensambla justo por debajo de la membrana plasmática (**Figura 17–49**; véase también el Panel 17–1). El anillo se contrae poco a poco y, a la vez, se fusionan vesículas intracelulares con la membrana plasmática que insertan nueva membrana adyacente al anillo. Esta adición de membrana compensa el aumento de la superficie celular que acompaña a la división citoplasmática. Cuando la contracción del anillo se ha completado, la inserción y la fusión de membrana sella el hueco entre las células hijas. Así pues la citocinesis comprende cuatro etapas: iniciación, contracción, inserción de membrana y finalización.

La actina y la miosina II del anillo contráctil generan la fuerza necesaria para la citocinesis

En las células en interfase, los filamentos de actina y miosina forman una red cortical por debajo de la membrana plasmática. En algunas células, también forman grandes haces citoplasmáticos denominados *fibras de estrés* (véase Capítulo 16). Cuando las células entran en mitosis, estas formaciones de actina y miosina se desensamblan; la mayor parte de la actina se reorganiza y los filamentos de miosina II se liberan. Cuando las cromátidas hermanas se separan en la anafase, la actina y la miosina II se empiezan a acumular en el **anillo con-**

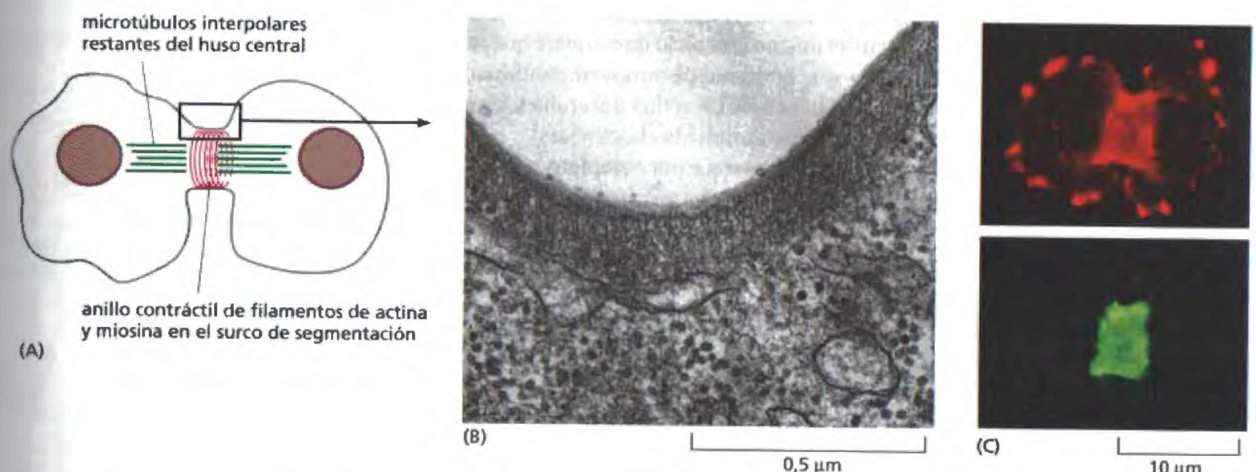


Figura 17–50 Anillo contráctil. (A) Esquema del surco de segmentación de una célula en división. (B) Electromicrografía del frente de crecimiento de un surco de segmentación de una célula animal en división. (C) Micrografías de fluorescencia del moho del fango en el que se ha teñido la actina (*rojo*) y la miosina II (*verde*). Mientras que toda la miosina II visible se ha redistribuido en el anillo contráctil, sólo una pequeña cantidad de actina ha hecho lo mismo; el resto permanece en el córtex de las células hijas nacientes. (B, de H.W. Beams y R.G. Kessel, *Am. Sci.* 64:279-290, 1976. Con la autorización de Sigma Xi; C, cortesía de Yoshio Fukui.)

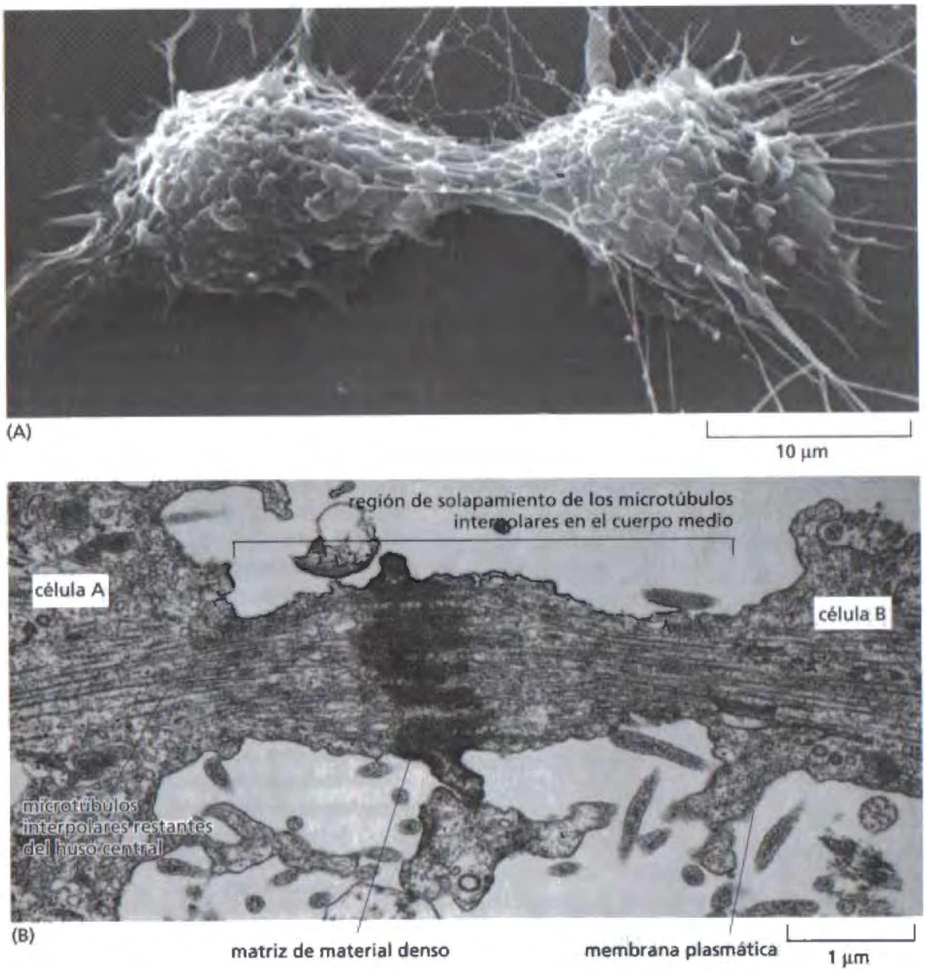


Figura 17–51 Cuerpo medio. (A) Electromicrografía de barrido de una célula animal en cultivo durante el proceso de división; el cuerpo medio todavía mantiene unidas las dos células hijas. (B) Electromicrografía convencional del cuerpo medio de una célula animal en división. La escisión es casi completa, pero las células hijas permanecen unidas por este estrecho puente de citoplasma que contiene los restos del huso central. (A, cortesía de Guenter Albrecht-Buehler; B, cortesía de J.M. Mullins.)

tráctil en formación (**Figura 17–50**), el cual también contiene otras proteínas que dan soporte estructural o colaboran en el ensamblaje del anillo. El ensamblaje del anillo contráctil es consecuencia, en parte, de la formación local de nuevos filamentos de actina, lo que depende de las *forminas* que nuclean el ensamblaje de conjuntos paralelos de filamentos de actina lineales y no ramificados (véase Capítulo 16). Después de la anafase, los conjuntos solapados de filamentos de actina y miosina II se contraen generando la fuerza que divide el citoplasma en dos. Cuando la contracción ha comenzado, el anillo ejerce una fuerza lo bastante grande como para doblar una aguja fina de vidrio introducida en su interior. Mientras el anillo se va estrechando, mantiene el mismo grosor, lo que sugiere que tanto su volumen total como el número de filamentos que contiene disminuyen continuamente. Además, a diferencia de la actina muscular, los filamentos de actina del anillo son muy dinámicos y su distribución cambia de forma constante durante la citocinesis.

Cuando termina la división, el anillo contráctil desaparece por completo, a medida que la membrana plasmática del surco de segmentación se estrecha formando el **cuerpo medio**. El cuerpo medio persiste como un puente entre las dos células hijas y contiene los restos del huso central, una gran estructura proteica derivada de los microtúbulos interpolares antiparalelos de la zona media del huso que están fuertemente empaquetados dentro de una matriz densa (**Figura 17–51**). Después de que las células hijas se hayan separado por completo, algunos de los componentes del cuerpo medio residual permanecen dentro de la membrana plasmática de cada célula, donde pueden actuar como una marca en el córtex que ayude a orientar el huso en la división celular siguiente.

La activación local de RhoA desencadena el ensamblaje y la contracción del anillo contráctil

RhoA, una pequeña GTPasa de la superfamilia Ras (véase Tabla 15–5), regula el ensamblaje y la función del anillo contráctil en el lugar de la división. RhoA se activa en el córtex celular en

el futuro lugar de la división, donde induce la formación de filamentos de actina, el ensamblaje de la miosina II y la contracción del anillo. Estimula la formación de filamentos de actina activando a las forminas e induce el ensamblaje de la miosina II y la contracción del anillo activando numerosas proteína quinasas, incluida la quinasa activada por Rho, Rock, (**Figura 17–52**). Estas quinasas fosforilan la cadena ligera reguladora de la miosina (RMLC: ***regulatory myosin light chain***), que es una de las subunidades de la miosina II. La fosforilación de la RMLC estimula la formación de filamentos bipolares de miosina II y la actividad motora, induciendo así el ensamblaje y la contracción del anillo de actina-miosina.

Como otras GTPasas, RhoA se inactiva cuando une GDP y se activa cuando une GTP (véase Capítulo 15). Parece que la activación local de RhoA en el surco de segmentación depende de un factor intercambiador de nucleótidos de guanina de Rho (RhoGEF: ***Rho guanine exchange factor***), el cual se encuentra en el córtex celular en el futuro lugar de división y estimula la liberación de GDP y la unión de GTP a RhoA. Se desconoce cómo el RhoGEF se localiza o se activa en el lugar de división, aunque, como se analizará después, parece que los microtúbulos del huso anafásico están implicados en este proceso.

Los microtúbulos del huso mitótico determinan el plano de división de las células animales

El problema fundamental de la citocinesis es cómo asegurar que la división se produzca en el momento y en el lugar adecuados. La citocinesis tiene que producirse sólo después de que las dos dotaciones cromosómicas se hayan segregado por completo una de otra y el lugar de la división se haya situado entre las dos dotaciones de cromosomas hijos, asegurando así que cada célula hija recibe una dotación completa. El momento y la posición correcta de la citocinesis en las células animales se consiguen mediante elegantes mecanismos que dependen del huso mitótico. Durante la anafase, el huso genera señales que estimulan la formación del surco de segmentación, en una posición a medio camino entre los polos del huso, para asegurar que la división se produzca entre los dos conjuntos de cromosomas separados. Dado que estas señales se originan en el huso anafásico, este mecanismo también contribuye a que la citocinesis tenga lugar en el momento adecuado al final de la mitosis. La citocinesis también tiene lugar en el momento adecuado porque la defosforilación de los

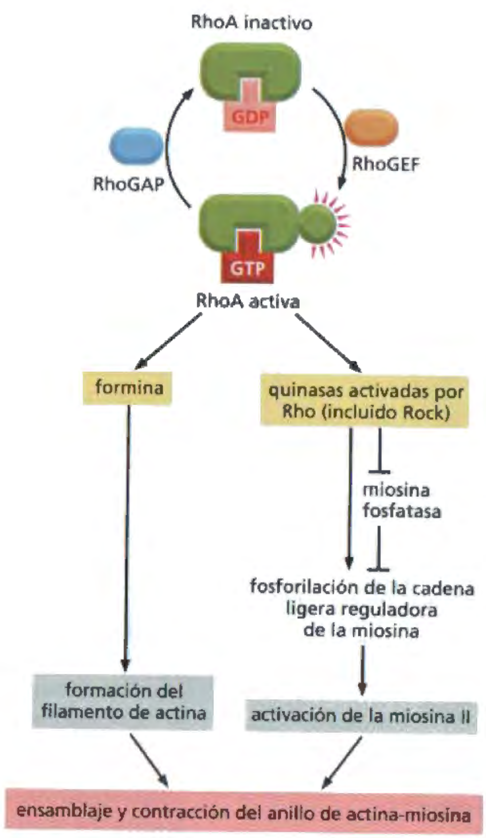


Figura 17–52 La regulación del anillo contráctil por la GTPasa RhoA. Como otras GTPasas de la familia Rho, RhoA se activa por una proteína RhoGEF y se inactiva por una proteína RhoGAP. La forma activa de RhoA unida a GTP se concentra en el futuro lugar de segmentación. Mediante la unión a las forminas, la forma activa de RhoA estimula el ensamblaje de los filamentos de actina en el anillo contráctil. Mediante la activación de proteínas quinasas activadas por Rho, tal como Rock, estimula la formación y la actividad de los filamentos de miosina II, induciendo así la contracción del anillo.

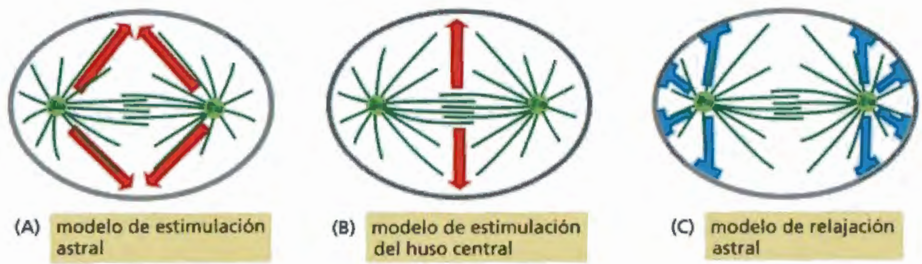


Figura 17–53 Tres modelos actuales sobre cómo los microtúbulos del huso anafásico generan señales que influyen en el posicionamiento del anillo contráctil. Ninguno de los modelos explica todas las observaciones y parece probable que el posicionamiento del surco esté determinado por una combinación de estos tres mecanismos, variando la importancia de los diferentes mecanismos en función del organismo.

sustratos de la Cdk, que depende de la degradación de la ciclina en la metafase y la anafase, inicia la citocinesis. Ahora, describiremos estos mecanismos reguladores con más detalle, haciendo énfasis en la citocinesis de las células animales.

Unos estudios realizados en óvulos fecundados de invertebrados marinos fueron los primeros que revelaron la importancia de los microtúbulos del huso en determinar el emplazamiento del anillo contráctil. Después de la fecundación, los embriones se dividen rápidamente sin que se intercalen periodos de crecimiento. De esta manera, el zigoto original se divide de forma progresiva en células cada vez más pequeñas. Dado que el citoplasma es transparente, el huso puede observarse a tiempo real con un microscopio. Si se aparta el huso a una nueva posición con una fina aguja de cristal al comienzo de la anafase, el incipiente surco de segmentación desaparece y se desarrolla uno nuevo de acuerdo con la nueva posición del huso; este hallazgo apoya la idea de que las señales generadas por el huso inducen la formación local del surco de segmentación.

¿Cómo determina el huso mitótico el lugar de la división? Se han propuesto tres mecanismos generales y parece que la mayoría de las células utiliza una combinación de ellos (**Figura 17–53**). El primero se denomina *modelo de estimulación astral*, el cual postula que los microtúbulos astrales transportan señales inductoras del surco hacia el córtex celular, donde de algún modo se concentran en un anillo a medio camino entre los dos polos. Evidencias a favor de este modelo proceden de ingeniosos experimentos realizados en grandes células embrionarias, los cuales demuestran que el surco de segmentación se forma a medio camino entre los dos ásteres, incluso en el caso de que los centrosomas que nuclean los ásteres no estén conectados entre sí por un huso mitótico (**Figura 17–54**).

Una segunda posibilidad, denominada *modelo de estimulación del huso central*, es que la zona media del huso, o huso central, genere una señal inductora del surco de segmentación que especifique el lugar de formación del surco en el córtex celular. Los microtúbulos interpolares solapados del huso central se asocian con proteínas de señalización, incluidas proteínas que estimulan a RhoA (**Figura 17–55**). Defectos en la función de estas proteínas (p. ej., en mutantes de *Drosophila*) provocan el fracaso de la citocinesis.

Un tercer modelo propone que, en algunos tipos celulares, los microtúbulos astrales inducen la relajación local de los haces de actina-miosina en el córtex celular. Según este *modelo de relajación astral*, la relajación cortical es mínima en el ecuador del huso y provoca la

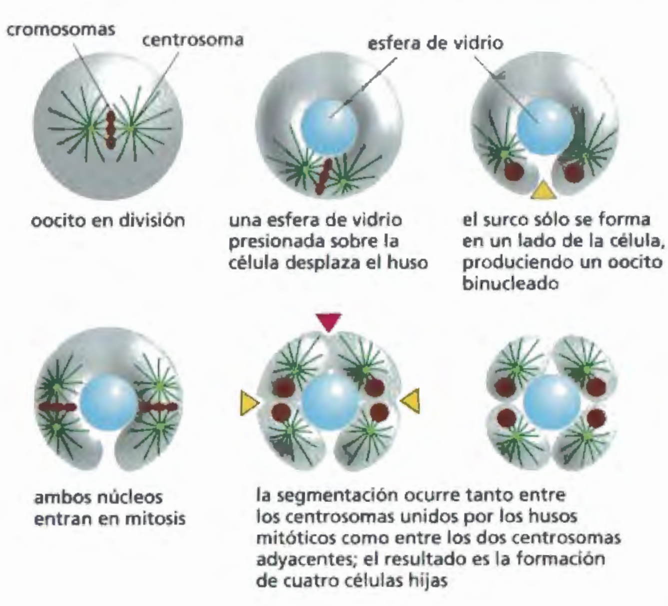


Figura 17–54 Experimento que demuestra la influencia de la posición de los ásteres de los microtúbulos sobre el plano de segmentación en un oocito de gran tamaño. Si se empuja mecánicamente el huso mitótico hacia un lado de la célula con una esfera de vidrio, el surco de segmentación que se desarrolla es incompleto, ya que no se formará en el lado opuesto de la célula. Las segmentaciones posteriores no sólo se producirán en la zona media de cada uno de los dos husos mitóticos posteriores (*puntas de flecha amarillas*), sino también entre los dos ásteres adyacentes que no están unidos por el huso mitótico, pero que en esta célula anormal comparten el mismo citoplasma (*punta de flecha roja*). Al parecer, el anillo contráctil que produce el surco de segmentación en estas células siempre se forma en la región a medio camino entre los dos ásteres, lo que sugiere que los ásteres modifican de alguna manera la región adyacente del córtex celular induciendo la formación del surco entre ellos.

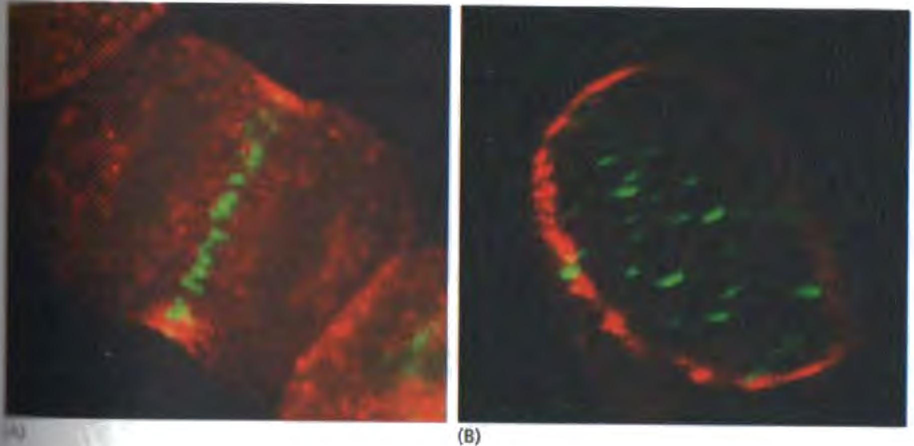


Figura 17–55 Localización de reguladores de la citocinesis en el huso central de una célula humana. (A) Micrografía de fluorescencia de una célula humana en cultivo al comienzo de la citocinesis que revela las localizaciones de la GTPasa RhoA (*rojo*) y de una proteína denominada Cyk4 (*verde*), la cual es una de las varias proteínas reguladoras que forman complejos en los extremos solapados más de los microtúbulos interpolares. Parece que estas proteínas generan señales que intervienen en la regulación de la actividad de RhoA en el córtex celular (véase Figuras 17–52 y 17–53B). (B) Cuando se secciona transversalmente la célula en el plano del anillo contráctil como se muestra aquí, RhoA (*rojo*) forma un anillo debajo de la superficie celular, mientras que la proteína del huso central Cyk4 (*verde*) está asociada con haces de microtúbulos dispersos por todo el plano ecuatorial de la célula. (Cortesía de Alisa Piekny y Michael Glotzer.)

contracción cortical en este lugar. En los embriones en desarrollo de *C. elegans*, por ejemplo, los tratamientos que provocan la pérdida de los microtúbulos astrales conducen a un aumento de la actividad contráctil por todo el córtex celular, en conformidad con este modelo.

En algunos tipos celulares, el lugar en el que se ensambla el anillo contráctil se escoge antes de la mitosis. En las levaduras de gemación, por ejemplo, se ensambla un anillo de proteínas denominadas *septinas* al final de G_1 en el futuro lugar de división. Parece que las septinas forman un armazón sobre el que se ensamblan otros componentes del anillo contráctil, incluida la miosina II. En las células vegetales, se ensambla una banda organizada de microtúbulos y filamentos de actina, denominada **banda preprofásica**, instantes antes de que empiece la mitosis. La banda preprofásica determina el lugar en el que se ensamblará la pared celular y la célula se dividirá en dos, como se describirá todo seguido.

El fragmoplasto guía la citocinesis en las plantas superiores

En la mayoría de células animales, el movimiento hacia dentro del surco de segmentación depende de un aumento del área de la superficie de la membrana plasmática. Se añade nueva membrana en el frente interior del surco de segmentación, que es aportada por pequeñas vesículas de membrana transportadas por microtúbulos desde el complejo de Golgi hacia el surco.

La deposición de membrana es particularmente importante para la citocinesis en las células de las plantas superiores. Estas células están rodeadas por una *pared celular* semirrígida. En lugar de que un anillo contráctil divida el citoplasma desde fuera hacia dentro, el citoplasma de la célula vegetal es dividido desde dentro hacia fuera mediante la construcción de una nueva pared celular, denominada **placa celular**, entre los dos núcleos hijos (**Figura 17–56**). El ensamblaje de la placa celular comienza al final de la anafase y está diri-

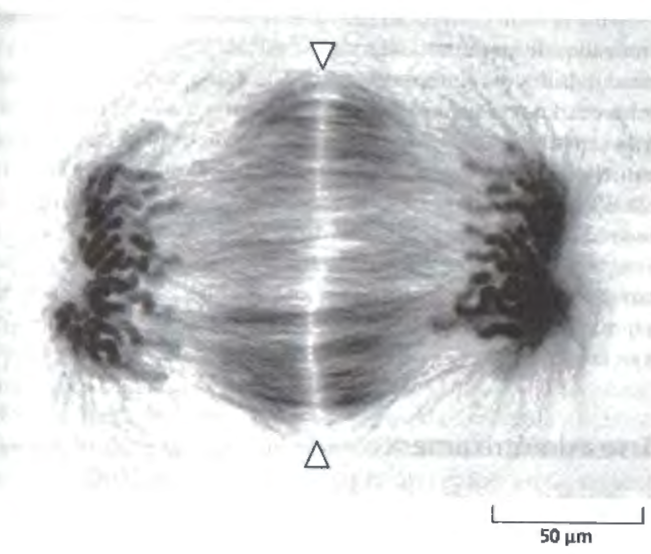
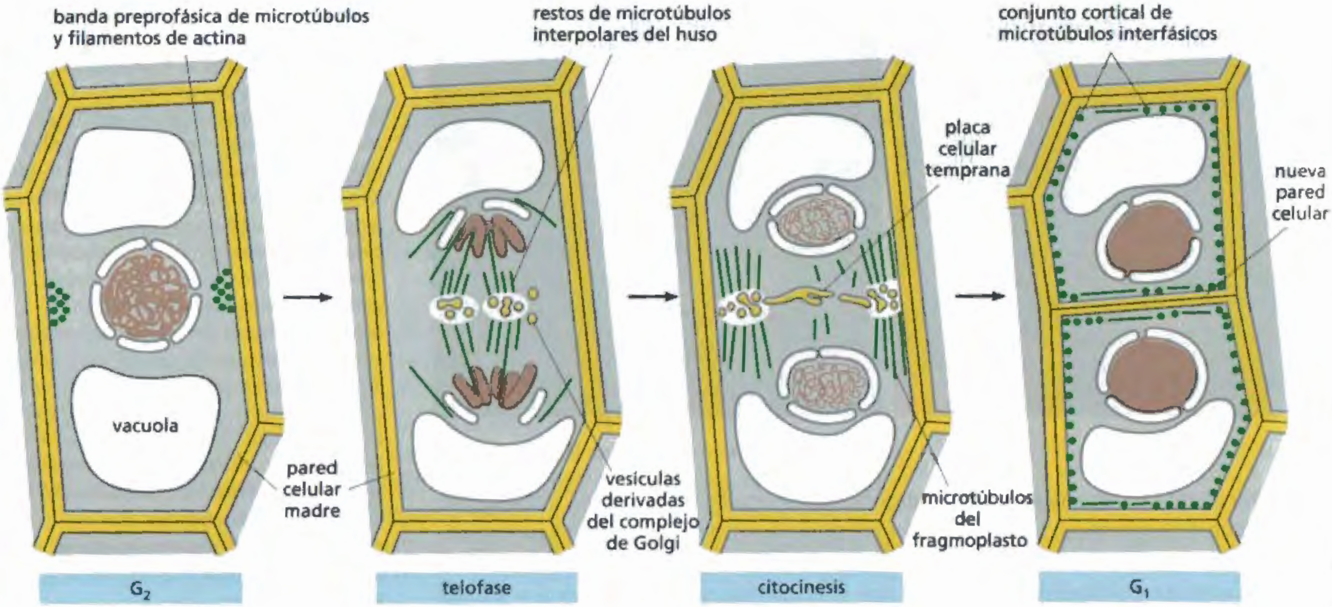


Figura 17–56 Citocinesis de una célula vegetal en telofase. En esta microfotografía, la placa celular temprana (entre las dos *puntas de flecha)* se ha formado en un plano perpendicular al plano de la página del libro. Los microtúbulos del huso están teñidos con anticuerpos marcados con oro dirigidos contra la tubulina, mientras que el DNA de las dos dotaciones de cromosomas hijos está teñido con un colorante fluorescente. Obsérvese que no hay microtúbulos astrales, debido a que las células de las plantas superiores carecen de centrosomas. (Cortesía de Andrew Bajer.)



gido por una estructura denominada **fragmoplasto**, que contiene microtúbulos procedentes del huso mitótico. Unas proteínas motoras transportan pequeñas vesículas a lo largo de estos microtúbulos desde el complejo de Golgi hasta el centro de la célula. Estas vesículas, que contienen los polisacáridos y las glucoproteínas necesarios para la síntesis de la nueva pared, se fusionan formando una estructura discoidal rodeada por membrana denominada *placa celular precoz*. La placa se extiende hacia fuera mediante la fusión de más vesículas hasta que alcanza la membrana plasmática y la pared celular original dividiendo la célula en dos. Después, se depositan microfibrillas de celulosa en la matriz de la placa celular, completándose la construcción de la nueva pared celular (**Figura 17–57**).

Figura 17–57 Características particulares de la citocinesis en una célula de una planta superior. El plano de división se establece antes de la fase M mediante una banda de microtúbulos y de filamentos de actina (la banda preprofásica) en el córtex celular. Al comienzo de la telofase, después de que los cromosomas se hayan segregado, se empieza a formar una nueva pared-celular dentro de la célula, en el ecuador del antiguo huso. Los microtúbulos interpolares del huso mitótico que se mantienen durante la telofase forman el fragmoplasto. Aunque los extremos más de estos microtúbulos ya no se solapan, acaban en el ecuador de la célula. Las vesículas derivadas del complejo de Golgi, llenas de materiales de la pared celular, son transportadas a lo largo de estos microtúbulos y se fusionan entre sí formando la nueva pared celular, la cual crece desde el centro hacia fuera hasta alcanzar la membrana plasmática y la pared celular originales. La membrana plasmática y la membrana que rodea la nueva pared celular se fusionan y separan por completo a las dos célula hijas.

Los orgánulos rodeados de membrana tienen que distribuirse entre las células hijas durante la citocinesis

El proceso de la mitosis asegura que cada célula hija reciba un juego completo de cromosomas. Sin embargo, cuando una célula eucariota se divide, cada célula hija también debe heredar todos los demás componentes celulares esenciales, incluidos los orgánulos rodeados de membrana. Como se describe en el Capítulo 12, los orgánulos como las mitocondrias y los cloroplastos no se pueden ensamblar *de novo* a partir de sus componentes individuales; sólo pueden surgir a partir del crecimiento y la división de orgánulos preexistentes. Asimismo, las células no pueden construir un nuevo retículo endoplasmático (ER: *endoplasmic reticulum*) si no es a partir de algún fragmento ya existente.

¿Cómo se segregan, entonces, los diferentes orgánulos rodeados de membrana cuando la célula se divide? Por lo general, los orgánulos como las mitocondrias y los cloroplastos se encuentran en un número lo bastante grande como para ser heredados con seguridad si, en promedio, se duplican una vez cada ciclo celular. En las células en interfase, el ER es continuo con la membrana nuclear y está organizado por el citoesqueleto de microtúbulos. Al entrar en la fase M, la reorganización de los microtúbulos y la disgregación de la envoltura nuclear libera el ER. En la mayoría de células, el ER se mantiene en gran parte intacto y se divide en dos durante la citocinesis. El complejo de Golgi se reorganiza y se fragmenta durante la mitosis. Los fragmentos del complejo de Golgi se asocian con los polos del huso y así se distribuyen a los extremos opuestos del huso, asegurando que cada célula hija herede los materiales necesarios para reconstruir el complejo de Golgi en la telofase.

Algunas células reubican su huso para dividirse asimétricamente

La mayoría de células animales se dividen de forma simétrica: el anillo contráctil se forma alrededor del ecuador de la célula parental, produciendo dos células hijas de igual tamaño y

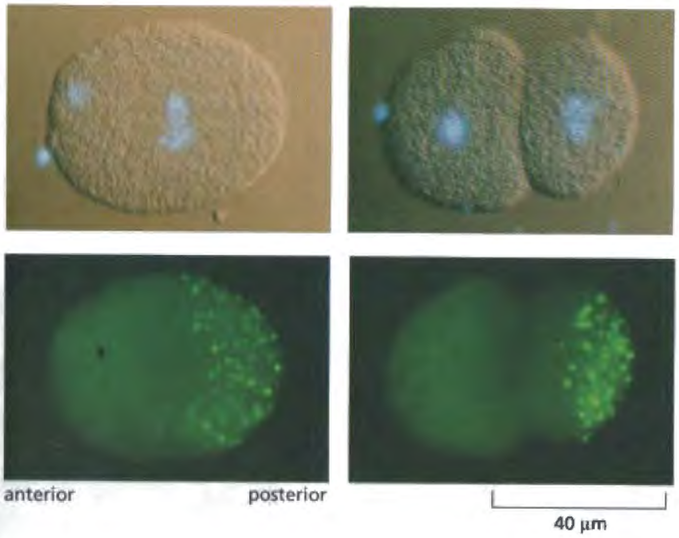


Figura 17–58 División celular asimétrica en la que se segregan componentes citoplasmáticos a una sola célula hija. Estas micrografías ilustran la segregación asimétrica controlada de componentes citoplasmáticos específicos a una sola célula hija durante la primera división de un óvulo fecundado del nemátodo *C. elegans*. Las células de *arriba* se han teñido con un fluorocromo *azul* específico para el DNA que pone de manifiesto el núcleo (y los corpúsculos polares); la observación se ha realizado mediante microscopía de contraste interferencial y microscopía de fluorescencia. Las células de *abajo* son las mismas células teñidas ahora con un anticuerpo contra los gránulos P y observadas con microscopía de fluorescencia. Estos pequeños gránulos están formados por RNA y proteínas, y determinan qué células se convertirán en gametos. Se distribuyen al azar por todo el citoplasma del óvulo no fecundado (no se muestra) pero se segregan hacia el polo posterior del óvulo fecundado, como se muestra, en la imagen de la *izquierda*. El plano de segmentación está orientado de manera que asegura que cuando el óvulo se divida, sólo la célula hija posterior recibirá los gránulos P, como se muestra en la imagen de la *derecha*. El mismo proceso de segregación se repite en varias divisiones celulares posteriores, de manera que los gránulos P sólo se encuentran en las células precursoras de oocitos y espermatozoides. (Cortesía de Susan Strome.)

con los mismos componentes. Esta simetría es el resultado del emplazamiento del huso mitótico, el cual, en la mayoría de las ocasiones, tiende a centrarse en el citoplasma. Los microtúbulos astrales y las proteínas motoras, que empujan o estiran de estos microtúbulos, contribuyen al proceso de centrado.

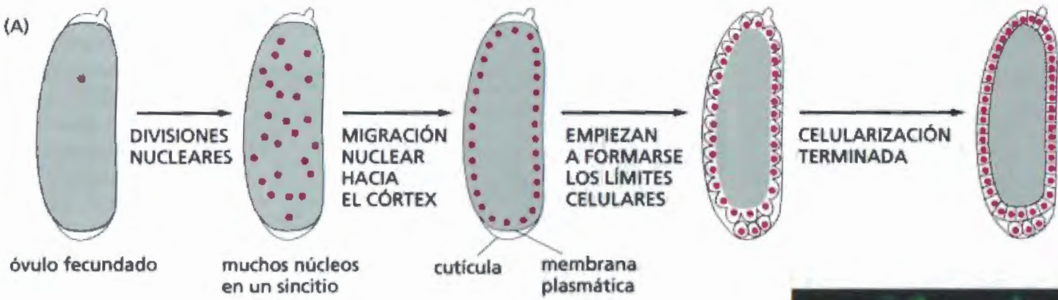
Sin embargo, existen muchos ejemplos durante el desarrollo en los que las células se dividen asimétricamente produciendo dos células que difieren en su tamaño, en los componentes que heredan o en ambos aspectos. Normalmente, las dos células hijas distintas están destinadas a desarrollarse por caminos diferentes. Para dar lugar de esta manera a células hijas con diferentes destinos, la célula madre en primer lugar tiene que segregar determinados componentes (denominados *determinantes del destino celular*) a un lado de la célula y entonces posicionar el plano de división de manera que la célula hija apropiada herede estos componentes (**Figura 17–58**). Para posicionar el plano de división asimétricamente, el huso tiene que desplazarse de forma controlada en el interior de la célula en división. Parece probable que estos desplazamientos del huso estén dirigidos por cambios en determinadas regiones del córtex celular y que las proteínas motoras localizadas allí estiren de uno de los polos del huso, a través de sus microtúbulos astrales, hacia la región apropiada. Los análisis genéticos realizados en *C. elegans* y *Drosophila* han identificado algunas de las proteínas necesarias para estas divisiones asimétricas (se describe en el Capítulo 22) y parece que algunas de estas proteínas tienen una función similar en vertebrados.

La mitosis se puede producir sin citocinesis

Aunque a la división nuclear le suele seguir la división citoplasmática, existen excepciones. Algunas células experimentan numerosas rondas de división nuclear sin que se produzca la división citoplasmática. En el embrión en desarrollo de *Drosophila*, por ejemplo, las 13 primeras divisiones nucleares se producen sin divisiones citoplasmáticas, formándose una sola célula de gran tamaño que contiene varios miles de núcleos, organizados en una monocapa cerca de la superficie celular. Una célula en la que muchos núcleos comparten el mismo citoplasma recibe el nombre de **sincitio**. Esta distribución acelera enormemente las primeras etapas del desarrollo, ya que las células no pierden tiempo en pasar a través de todas las etapas de la citocinesis en cada división celular. Después de estas rápidas divisiones nucleares, se forman las membranas alrededor de cada núcleo en una ronda de citocinesis coordinadas denominada *celularización*. La membrana plasmática se expande hacia el interior y, con la colaboración del anillo de actina-miosina, se estrangula de forma que rodea cada núcleo (**Figura 17–59**). <TTCT>

En algunos tipos celulares de mamíferos, también se producen divisiones nucleares sin citocinesis. De este modo los megacariocitos, que producen las plaquetas sanguíneas, y algunos hepatocitos y células del músculo cardíaco, se convierten en células multinucleadas.

Después de la citocinesis, la mayoría de las células entran en G_1, en las que la mayoría de las Cdk están inactivadas. Para finalizar esta sección se explicará cómo se alcanza esta etapa al final de la fase M.



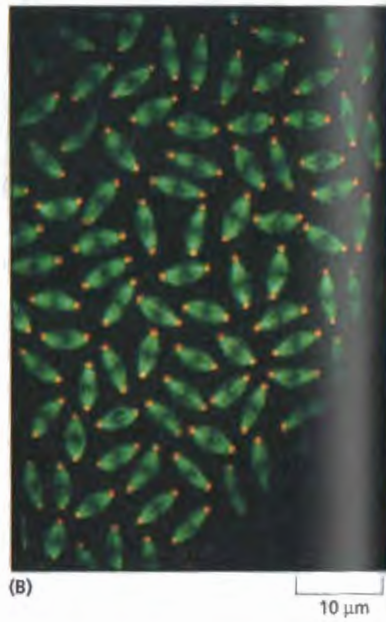


Figura 17–59 Mitosis sin citocinesis en el embrión en desarrollo de *Drosophila*. (A) Las primeras 13 divisiones nucleares ocurren de forma sincrónica y sin divisiones citoplasmáticas generando un gran sincitio. A continuación, la mayoría de los núcleos migran hacia el córtex, y la membrana plasmática se extiende hacia el interior y se estrecha alrededor de cada núcleo formando células individualizadas, en un proceso denominado celularización. (B) Micrografía de fluorescencia de numerosos husos mitóticos de un embrión de *Drosophila* antes de la celularización. Los microtúbulos están teñidos de *verde* y los centrosomas de *rojo*. Se puede observar que todos los núcleos están sincronizados; en este caso todos están en metafase. (B, cortesía de Kristina Yu y William Sullivan.)

La fase G_1 es un estado estable de inactividad Cdk

Un acontecimiento regulador clave del final de la fase M es la inactivación de las Cdk, que se produce como consecuencia de la degradación dependiente del APC/C de la ciclina. Como se ha descrito en este capítulo, la inactivación de las Cdk al final de la fase M tiene muchas funciones: desencadena los acontecimientos del final de la mitosis, induce la citocinesis y hace posible la síntesis de los complejos prerreplicativos en los orígenes de replicación. Además, proporciona un mecanismo que permite recomponer el sistema de control del ciclo celular a un estado de inactividad Cdk en el que la célula se prepara para entrar en un nuevo ciclo celular. En la mayoría de células, este estado de inactividad Cdk genera una fase G_1, durante la que la célula crece y comprueba su entorno antes de quedar determinada para una nueva división.

En los embriones animales en desarrollo, la inactivación de Cdk-M en las postrimerías de la mitosis es debida casi totalmente a la actividad del APC/C-Cdc20, como se describió anteriormente. Recordemos, no obstante, que Cdk-M estimula la actividad del APC/C-Cdc20. Así, en una célula embrionaria, la degradación de la ciclina M en las etapas finales de la mitosis conduce rápidamente a la inactivación de toda la actividad del APC/C. Esta inactivación del APC/C justo después de la mitosis es sobre todo útil en los rápidos ciclos celulares embrionarios, ya que permite que la célula comience a acumular sin demora nueva ciclina M para el ciclo siguiente (**Figura 17–60**A).

Sin embargo, la rápida acumulación de ciclina inmediatamente después de la mitosis no es útil para las células con ciclos celulares que tengan una fase G_1. Estas células utilizan varios mecanismos que impiden la reactivación de Cdk después de la mitosis. Uno de estos mecanismos utiliza otra proteína activadora del APC/C llamada Cdh1, homóloga a Cdc20. Aunque tanto Cdh1 como Cdc20 se unen y activan el APC/C, difieren en un aspecto importante. Mientras que Cdk-M activa el complejo APC/C-Cdc20, inhibe el complejo APC/C-Cdh1 mediante la fosforilación directa de Cdh1. Como consecuencia de esta interacción, la actividad del APC/C-Cdh1 aumenta al final de la mitosis una vez que el complejo APC/C-Cdc20 ha iniciado la degradación de la ciclina M. Por lo tanto, la degradación de la ciclina M

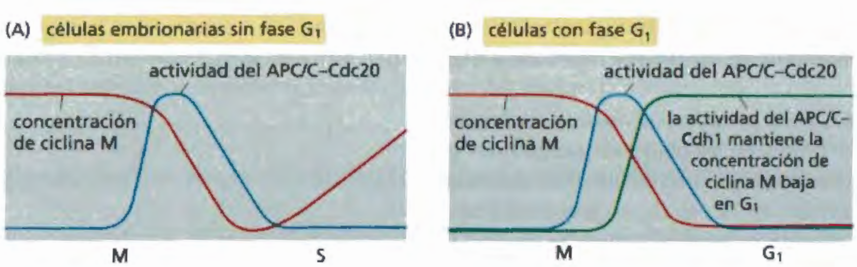


Figura 17–60 Generación de una fase G_1 mediante la inhibición estable de Cdk después de la mitosis. (A) En los primeros ciclos celulares embrionarios, la actividad del APC/C-Cdc20 aumenta al final de la mitosis, induciendo la degradación de la ciclina M. Dado que la actividad Cdk-M estimula la actividad del APC/C-Cdc20, la pérdida de la ciclina M provoca la inactivación del APC/C después de la mitosis, lo cual permite que las ciclinas M comiencen a acumularse de nuevo. (B) En las células que contienen una fase G_1, la disminución de la actividad Cdk-M en la mitosis avanzada, conduce a la activación del APC/C-Cdh1 (así como a la acumulación de proteínas inhibidoras de Cdk, no se muestra). Este proceso asegura una inhibición continua de la actividad Cdk después de la mitosis, tal como se necesita para la fase G_1.

continúa después de la mitosis: aunque la actividad del APC/C-Cdc20 haya disminuido, la actividad del APC/C-Cdh1 es elevada (Figura 17–60B).

Un segundo mecanismo que inhibe la actividad Cdk en G_1 depende del aumento de la síntesis de las CKI, las proteínas inhibidoras de Cdk de las que hemos tratado antes. Las levaduras de gemación, en las que se comprende mejor este mecanismo, poseen una CKI llamada *Sic1*, que se une e inactiva Cdk-M en la etapa final de la mitosis y en G_1. Al igual que Cdh1, Sic1 también es inhibida por Cdk-M, que fosforila Sic1 durante la mitosis, induciendo su ubiquitinización por el SCF. Por lo tanto, Sic1 y Cdk-M, al igual que Cdh1 y Cdk-M, se inhiben mutuamente. Por consiguiente, la disminución de la actividad Cdk-M que se produce al final de la mitosis hace que la proteína Sic1 se acumule, contribuyendo a mantener la actividad Cdk-M baja después de la mitosis. Una CKI denominada *p27* (véase Figura 17–19) puede realizar funciones semejantes en células animales.

En la mayoría de células, la disminución de la transcripción de los genes de las *ciclinas M* también inactiva Cdk-M al final de la mitosis. En las levaduras de gemación, por ejemplo, Cdk-M induce la expresión de estos genes, originando un bucle de retroalimentación positiva. Este bucle se inactiva cuando las células salen de la mitosis: la inactivación de Cdk-M por Cdh1 y Sic1 reduce la transcripción génica de la ciclina M y, en consecuencia, una disminución de la síntesis de la ciclina M. Las proteínas reguladoras de genes que inducen la expresión de las ciclinas S y G_1/S también se inhiben durante G_1.

Así, la activación del APC/C-Cdh1, la acumulación de las CKI y la disminución de la expresión génica de las ciclinas colaboran para que la fase G_1 sea el momento en el que toda la actividad Cdk está inhibida. Como en muchos otros aspectos del control del ciclo celular, la existencia de varios mecanismos reguladores hace que el sistema de inhibición sea más compacto y pueda seguir funcionando con una eficiencia razonable. Entonces, ¿cómo escapa la célula de este estado estacionario de G_1 para iniciar un nuevo ciclo celular? La respuesta es que la actividad Cdk-G_1/S, que aumenta hacia finales de G_1, libera todos los mecanismos de frenado que inhiben la actividad Cdk, como describiremos en la próxima sección.

Resumen

Después de que la mitosis haya terminado la formación de un par de núcleos hijos, la citocinesis finaliza el ciclo celular y se divide la propia célula. La citocinesis depende de un anillo de actina y miosina que se contrae al final de la mitosis en un lugar a medio camino entre los cromosomas segregados. En las células animales, la ubicación del anillo contráctil se determina por señales procedentes de los microtúbulos del huso de la anafase. La defosforilación de las dianas de la Cdk, como consecuencia de la inactivación de la actividad Cdk en la anafase, desencadena la citocinesis en el momento correcto después de la anafase. Después de la citocinesis, la célula entra en un estado G_1 estable de baja actividad Cdk, donde espera las señales para entrar en un nuevo ciclo celular.

CONTROL DE LA DIVISIÓN CELULAR Y DEL CRECIMIENTO CELULAR

Un zigoto de ratón y un zigoto de un ser humano tienen un tamaño similar pero dan lugar a animales de tamaños diferentes. ¿Qué factores del control de la función celular de los seres humanos y de los ratones son los responsables de estas diferencias de tamaño? La misma pregunta fundamental puede hacerse para cada órgano y tejido del cuerpo de un animal. ¿Qué factores del control del funcionamiento celular explican la longitud de la trompa de un elefante o el tamaño de su cerebro o de su hígado? Para la mayoría de estas preguntas todavía no tenemos respuesta, lo cual es debido a que han recibido poca atención en comparación con otras cuestiones de la biología celular y de la biología del desarrollo. No obstante, es posible señalar los elementos que deben constituir la respuesta.

El tamaño de un órgano o de un organismo depende principalmente de su masa celular total, la cual depende tanto del número total de células como del tamaño de estas células. A su vez, el número de células depende de la cantidad de divisiones celulares y de la muerte celular. Por lo tanto, el tamaño de los órganos y del cuerpo está determinado por tres procesos fundamentales: el crecimiento celular, la división celular y la muerte celular. Cada uno de estos procesos está estrictamente regulado, tanto por programas intracelulares como por moléculas señalizadoras extracelulares que controlan estos programas.

Por regla general, las moléculas señalizadoras extracelulares que regulan el tamaño celular y el número de células son proteínas de secreción solubles, proteínas que se unen a la superficie de las células o componentes de la matriz extracelular. Desde un punto de vista funcional, pueden dividirse en tres clases principales:

1. *Mitógenos*, que estimulan la división celular, fundamentalmente desencadenando una oleada de actividad Cdk-G_1/S que libera controles intracelulares negativos que de otra manera bloquearían la progresión a través del ciclo celular.
2. *Factores de crecimiento*, que estimulan el crecimiento celular (un aumento de la masa celular) induciendo la síntesis de proteínas y de otras macromoléculas e inhibiendo su degradación.
3. *Factores de supervivencia*, que estimulan la supervivencia celular inhibiendo el tipo de muerte celular programada conocida como *apoptosis*.

Muchas moléculas de señalización extracelulares inducen todos estos procesos y otras sólo algunos. En efecto, el término *factor de crecimiento* se utiliza con frecuencia de forma inapropiada para describir un factor con cualquiera de estas actividades. Aún peor, el término *crecimiento celular* es utilizado con frecuencia para referirse a un aumento del número de células o *proliferación celular*.

Además de estas tres clases de señales estimuladoras, existen moléculas de señalización extracelulares que inhiben la proliferación celular, el crecimiento celular o ambos procesos; en general, se sabe poco respecto a este tema. También existen moléculas de señalización extracelulares que activan la apoptosis.

En esta sección nos centraremos sobre todo en estudiar cómo los mitógenos y otros factores, como el daño en el DNA, controlan la velocidad de la división celular. Después, trataremos el importante pero por lo general mal entendido problema de cómo una célula que prolifera, coordina su crecimiento con la división celular para así mantener su tamaño apropiado. Se tratará el control de la supervivencia celular y de la muerte celular por apoptosis en el Capítulo 18.

Los mitógenos estimulan la división celular

Los organismos unicelulares tienden a crecer y a dividirse con tanta rapidez como pueden y su velocidad de proliferación depende en gran medida de la disponibilidad de nutrientes en el medio. Sin embargo, las células de un organismo pluricelular sólo se dividen cuando el organismo necesita más células. Así, para que una célula animal prolifere, necesita recibir señales extracelulares en forma de **mitógenos**, procedentes de otras células, por lo general de las células vecinas. Los mitógenos superan los mecanismos intracelulares de frenado que bloquean la progresión a través del ciclo celular.

Uno de los primeros mitógenos identificados fue el *factor de crecimiento derivado de las plaquetas* (*PDGF*: ***platelet-derived growth factor***), que es característico de muchos otros descubrimientos posteriores. El camino hacia su aislamiento comenzó al observar que los fibroblastos proliferan en una placa de cultivo si se les suministra *suero*, pero no proliferan si se les suministra *plasma*. El plasma se obtiene eliminando las células de la sangre e impidiendo que se produzca la coagulación; el suero se obtiene permitiendo la coagulación de la sangre y recogiendo el líquido resultante libre de células. Cuando la sangre coagula, las plaquetas incorporadas en el coágulo liberan el contenido de sus vesículas de secreción (**Figura 17–61**). La mayor capacidad del suero de inducir la proliferación celular sugiere que las plaquetas contienen uno o más mitógenos. Esta hipótesis se confirmó al observar que los extractos de plaquetas podían utilizarse en lugar del suero para estimular la proliferación de los fibroblastos. Se demostró que el factor clave de los extractos era una proteína que posteriormente se purificó y se denominó PDGF. En el organismo, el PDGF liberado de los coágulos sanguíneos ayuda a estimular la división celular durante la cicatrización de las heridas.

El PDGF sólo es una de las más de 50 proteínas conocidas que actúan como mitógenos. La mayoría de estas proteínas tienen una amplia especificidad. El PDGF, por ejemplo, puede estimular la división de muchos tipos celulares, incluidos los fibroblastos, las células musculares lisas y las células neurogliales. Asimismo, el *factor de crecimiento epidérmico* (*EGF*: ***epidermal growth factor***) no sólo actúa sobre células epidérmicas sino también sobre muchos otros tipos celulares, incluyendo tanto células epiteliales como no epiteliales. En cambio, algunos mitógenos tienen una especificidad reducida; por ejemplo, la *eritropoyetina* sólo induce la proliferación de los precursores de los glóbulos rojos. Muchos mitógenos,

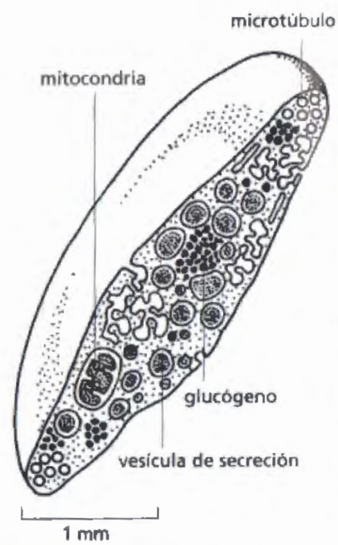


Figura 17–61 Una plaqueta. Las plaquetas son células en miniatura sin núcleo. Circulan por la sangre y contribuyen a que se produzca la coagulación sanguínea en los lugares de daño tisular, evitando así una hemorragia masiva. También liberan varios factores que estimulan la cicatrización de las heridas. La plaqueta que se muestra se ha seccionado por la mitad para mostrar sus vesículas de secreción, algunas de las cuales contienen el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF).

incluido el PDGF, también desempeñan otras funciones además de estimular la división celular: estimulan el crecimiento celular, la supervivencia, la diferenciación o la migración, dependiendo de las circunstancias y del tipo celular de que se trate.

En algunos tejidos, proteínas de señalización extracelulares inhibidoras se oponen a los reguladores positivos, inhibiendo de esa manera el crecimiento de los órganos. Las proteínas de señalización inhibidoras más conocidas son el TGFβ y sus homólogos. El TGFβ inhibe la proliferación de varios tipos celulares mediante el bloqueo de la progresión del ciclo celular en G_1 o la estimulación de apoptosis.

Las células pueden retrasar la división entrando en un estado especializado no proliferativo

En ausencia de una señal mitogénica que estimule la proliferación, la actividad Cdk se mantiene inhibida en G_1, a través de los diversos mecanismos tratados anteriormente, y se bloquea la progresión hacia un nuevo ciclo celular. En algunas ocasiones, las células desorganizan parcialmente su sistema de control del ciclo celular y salen del ciclo, entrando en un estado especializado no proliferativo llamado $\mathbf{G_0}$.

La mayoría de las células de nuestro cuerpo están en G_0, pero las bases moleculares y la reversibilidad de este estado varían en función del tipo celular. La mayoría de nuestras neuronas y de las células musculares esqueléticas se encuentran en un estado G_0 de *diferenciación terminal*, en el cual su sistema de control del ciclo celular está por completo desmantelado: la expresión de los genes que codifican varias Cdk y ciclinas está permanentemente inhibida y rara vez se produce la división celular. Otros tipos celulares abandonan el ciclo celular sólo de forma transitoria y conservan la capacidad de reorganizar con rapidez el sistema de control del ciclo celular y volver a entrar en el ciclo. Por ejemplo, la mayoría de las células del hígado están en G_0, pero si el hígado se daña pueden ser estimuladas para dividirse. Aún más, otros tipos celulares, incluidos los fibroblastos y algunos linfocitos, repetidamente abandonan y vuelven a entrar en el ciclo celular a lo largo de toda su vida.

Casi todas las variaciones en la duración del ciclo celular de un organismo adulto se producen durante el tiempo que la célula pasa en G_1 o G_0. Por el contrario, el tiempo que tarda una célula en progresar desde el comienzo de la fase S hasta finalizar la mitosis es por lo general breve (de 12 a 24 horas en mamíferos) y bastante constante, con independencia del tiempo que transcurra entre una división y la siguiente.

Los mitógenos estimulan las actividades de Cdk-G_1 y de Cdk-G_1/S

En la mayoría de células animales, los mitógenos regulan la velocidad de la división celular interviniendo en la fase G_1 del ciclo celular. Como se ha indicado, durante la fase G_1 actúan mecanismos que inhiben la actividad Cdk y bloquean la entrada en la fase S. Los mitógenos anulan estos frenos que inhiben la actividad Cdk y permiten así que comience la fase S.

Como se ha descrito en el Capítulo 15, los mitógenos interactúan con receptores de superficie celular que activan numerosas vías de señalización intracelular. Una de las vías principales actúa a través de la pequeña GTPasa **Ras**, que induce la activación de una *cascada de MAP-quinasas*. Este hecho conduce a un aumento de la síntesis de proteínas reguladoras de genes, incluido **Myc**. Se cree que Myc estimula la entrada en el ciclo celular mediante varios mecanismos, uno de los cuales es aumentar la expresión de los genes que codifican las ciclinas de G_1 (ciclinas D), incrementando así la actividad de Cdk-G_1 (Cdk4-ciclina D). Myc también tiene un papel clave en la estimulación de la transcripción de los genes que inducen el crecimiento celular.

En las células animales, la función clave de los complejos Cdk-G_1 es activar un grupo de factores reguladores de genes denominado **proteínas E2F**, que se unen a secuencias específicas de DNA de las regiones promotoras de una gran variedad de genes que codifican proteínas necesarias para la entrada en la fase S, incluyendo las ciclinas G_1/S, las ciclinas S y proteínas implicadas en la síntesis de DNA y la duplicación cromosómica. En ausencia de estimulación mitogénica, la expresión génica dependiente de E2F está inhibida por la interacción entre E2F y miembros de la familia de la **proteína del retinoblastoma** (**Rb**). Cuando los mitógenos estimulan la proliferación celular, se acumulan complejos Cdk-G_1 activos que fosforilan miembros de la familia Rb y disminuyen su afinidad por E2F. Después, las proteínas E2F liberadas activan la expresión de sus genes diana (**Figura 17–62**).

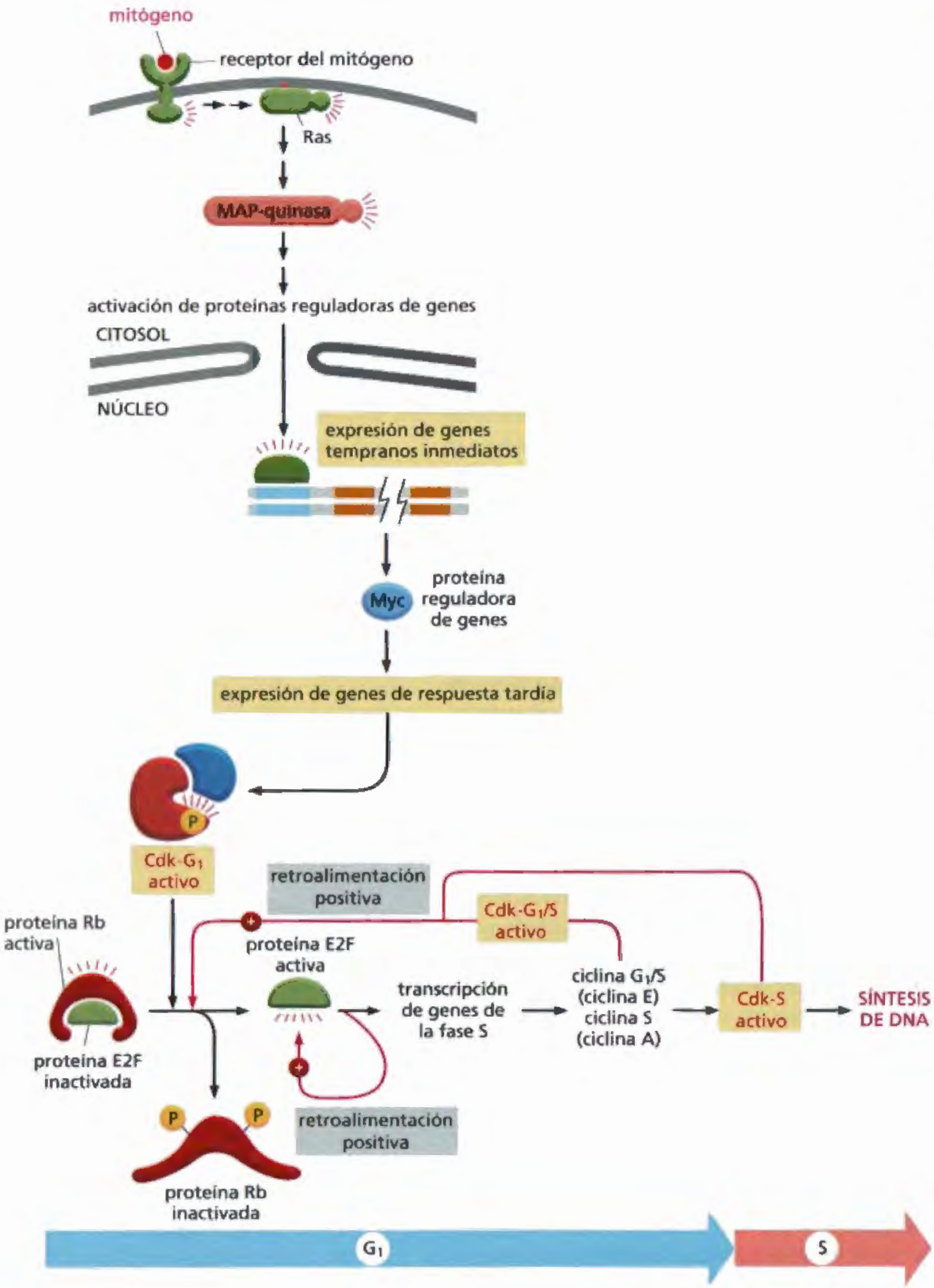


Figura 17–62 Mecanismos que controlan la entrada en el ciclo celular y el inicio de la fase S en las células animales. Como se describe en el Capítulo 15, los mitógenos se unen a receptores de la superficie celular iniciando vías de señalización intracelulares. Una de las principales vías supone la activación de la pequeña GTPasa Ras, la cual activa una cascada de MAP-quinasas que provoca el aumento de la expresión de numerosos genes *tempranos inmediatos*, incluido el gen que codifica la proteína reguladora de genes Myc. Myc aumenta la expresión de muchos genes de *respuesta tardía*, incluyendo algunos que aumentan la actividad del complejo Cdk-G_1 (Cdk4-ciclina D), el cual fosforila miembros de la familia de proteínas Rb. La fosforilación inactiva las proteínas Rb, liberándose la proteína reguladora de genes E2F que activa la transcripción de los genes de la transición G_1/S, incluidos los genes de la ciclina G_1/S (ciclina E) y de la ciclina S (ciclina A). La aparición resultante de las actividades Cdk-G_1/S y Cdk-S aumenta aún más la fosforilación de la proteína Rb y se origina un bucle de retroalimentación positiva. Además, las proteínas E2F también estimulan la transcripción de sus propios genes, lo que origina otro bucle de retroalimentación positiva.

Este sistema de control transcripcional, como muchos otros sistemas de control que regulan el ciclo celular, contiene bucles de retroalimentación que inducen una rápida transición G_1/S. Las proteínas E2F liberadas, por ejemplo, aumentan la transcripción de sus propios genes. Además, la transcripción dependiente de E2F de los genes de la ciclina G_1/S (ciclina E) y la ciclina S (ciclina A) provoca un aumento de las actividades Cdk-G_1/S y Cdk-S, lo cual aumenta a su vez la fosforilación de la proteína Rb y favorece aún más la liberación de E2F (Figura 17–62).

El principal miembro de la familia Rb, la propia proteína Rb, fue identificado originariamente a través de los estudios sobre un tipo de tumor ocular infantil hereditario conocido como *retinoblastoma* (véase Capítulo 20). La pérdida de las dos copias del gen Rb provoca una excesiva proliferación celular en la retina en desarrollo, lo que sugiere que la proteína Rb es en particular importante para limitar la división celular en este tejido. La pérdida completa de Rb no causa un aumento inmediato de la proliferación de células retinianas u otros tipos celulares, en parte porque Cdh1 y las CKI también ayudan a inhibir la progresión a través de G_1, y en parte porque otros tipos celulares contienen proteínas homólogas a Rb que proporcionan un sostén de seguridad en ausencia de Rb. Es también probable que otras proteínas, no homólogas a Rb, ayuden a regular la actividad de E2F.

Existen niveles adicionales de control que promueven un extraordinario aumento de la actividad Cdk-S al comienzo de la fase S. Hemos mencionado que el activador Cdh1 del APC/C inhibe el incremento de los niveles de las ciclinas después de la mitosis. En las células animales, sin embargo, las ciclinas G_1 y G_1/S son resistentes a Cdh1 y pueden actuar sin oposición del APC/C estimulando la fosforilación de la proteína Rb y la expresión génica dependiente de E2F. Por el contrario, la ciclina S no es resistente a Cdh1 y su aumento de concentración es inhibido inicialmente por la actividad APC/C-Cdh1. Sin embargo, Cdk-G_1/S también fosforila e inactiva el APC/C-Cdh1, permitiendo así la acumulación de la ciclina S, que estimula aún más la activación de Cdk-S. Cdk-G_1/S también inactiva proteínas CKI que inhiben la actividad Cdk-S. El efecto global de todas estas interacciones es la rápida y completa activación de los complejos Cdk-S necesarios para el inicio de la fase S.

El daño en el DNA bloquea la división celular: la respuesta al daño en el DNA

La progresión a través del ciclo celular y, por lo tanto, la velocidad de la proliferación celular, no sólo está controlada por los mitógenos extracelulares sino también por otros mecanismos extracelulares e intracelulares. Una de las influencias más importantes es el daño en el DNA, el cual puede suceder como consecuencia de reacciones química espontáneas en el DNA, errores en la replicación del DNA, la exposición a la radiación o a ciertos agentes químicos. Es imprescindible que la célula repare los cromosomas dañados antes de que intente duplicarlos o segregarlos. El sistema de control del ciclo celular puede detectar con facilidad el daño en el DNA y detener el ciclo celular en cualquiera de los dos puntos de control: uno en el Inicio hacia el final de G_1, el cual impide la entrada en el ciclo celular y en la fase S, y el otro en el punto de control G_2/M, el cual impide la entrada en la mitosis (véase Figura 17–21).

El daño en el DNA inicia una vía de señalización que activa una de las dos proteínas quinasa homólogas denominadas **ATM** y **ATR**, las cuales se asocian con el lugar del daño y fosforilan varias proteínas diana, incluidas otras dos proteínas quinasas denominadas *Chk1* y *Chk2*. Ambas quinasas fosforilan otras proteínas diana que provocan la detención del ciclo celular. Una diana principal es la proteína reguladora de genes **p53**, la cual estimula la transcripción del gen que codifica una proteína CKI llamada *p21*; esta proteína se une a los complejos Cdk–G_1/S y Cdk–S e inhibe sus actividades, ayudando así a bloquear la entrada en el ciclo celular (**Figura 17–63**). <TGAA>

El daño en el DNA activa p53 a través de un mecanismo indirecto. En las células no dañadas, p53 es muy inestable y su concentración muy baja como consecuencia en gran parte de la interacción con otra proteína, *Mdm2*, que actúa como una ubiquitina ligasa que marca p53 para su degradación en los proteosomas. La fosforilación de p53 tras el daño en el DNA reduce su unión a Mdm2. Esto disminuye la degradación de p53, lo que produce un acusado aumento de la concentración de p53 en la célula. Además, la disminución de la unión a Mdm2 aumenta la capacidad de p53 para estimular la transcripción génica (Figura 17-63).

Las proteínas quinasa Chk1 y Chk2 también impiden la progresión del ciclo celular al fosforilar miembros de la familia de proteínas fosfatasa Cdc25, inhibiendo así su función. Como se describió anteriormente, estas quinasas son en especial importantes en la activación de Cdk-M al comienzo de la mitosis (véase Figura 17–25). De este modo, la inhibición de la actividad de Cdc25 por el daño en el DNA ayuda a impedir la entrada en la mitosis (véase Figura 17–21).

La respuesta al daño en el DNA también detecta problemas que se presentan cuando una horquilla de replicación se detiene durante la replicación del DNA. Cuando los nucleótidos se agotan, por ejemplo, las horquillas de replicación se paran durante la fase de elongación de la síntesis del DNA. Para evitar que la célula intente segregar cromosomas parcialmente replicados, los mismos mecanismos que responden al daño en el DNA detectan las horquillas de replicación detenidas y bloquean la entrada en la mitosis hasta que se hayan solucionado los problemas de las horquillas de replicación.

La respuesta al daño en el DNA no es esencial para la división celular normal si las condiciones ambientales son ideales. Sin embargo, las condiciones ambientales rara vez son ideales: durante la vida de cualquier célula siempre se produce un nivel bajo de daño en el DNA, de modo que si la respuesta al daño no funcionara, este último se acumularía en la progenie de la célula. Con el tiempo, la acumulación de daño genético en células que carecen de la respuesta al daño en el DNA conduce a un aumento de la frecuencia de mutaciones

que provocan cáncer. En efecto, por lo menos en la mitad de todos los cánceres humanos se han identificado mutaciones en el gen *p53* (véase Capítulo 20). Esta pérdida de función de p53 permite que la célula cancerosa acumule mutaciones más rápidamente. Asimismo, una rara enfermedad genética denominada *ataxia telangiectasia* es consecuencia de una deficiencia en ATM, una de las proteínas quinasa que se activa en respuesta al daño en el DNA inducido por los rayos X; los enfermos que padecen esta enfermedad son muy sensibles a los rayos X y sufren una mayor frecuencia de cáncer.

¿Qué sucede si el daño en el DNA es tan grave que no se puede reparar? La respuesta varía en función del organismo. Los organismos unicelulares como las levaduras de gemación detienen de forma transitoria su ciclo celular e intentan reparar el daño, pero el ciclo se reanuda aunque no se haya completado la reparación. Para un organismo unicelular, la vida con mutaciones es aparentemente mejor que no vivir. Sin embargo, en los organismos pluricelulares, la salud del organismo tiene preferencia sobre la vida de una célula. Las células que se dividen con graves daños en el DNA amenazan la vida del organismo, ya que el daño genético puede producir con frecuencia cáncer y otras enfermedades. Así, las células animales con graves daños en el DNA no intentan dividirse, sino que se autoeliminan induciendo la apoptosis. Por lo tanto, a menos que el daño en el DNA sea reparado, la respuesta al daño en el DNA puede conducir o a la detención del ciclo celular o a la muerte celular. Tal y como veremos en el siguiente capítulo, la apoptosis inducida por el daño en el DNA depende de la activación de p53. En efecto, es la función inductora de la apoptosis de p53 la que aparentemente es más importante para protegernos del cáncer.

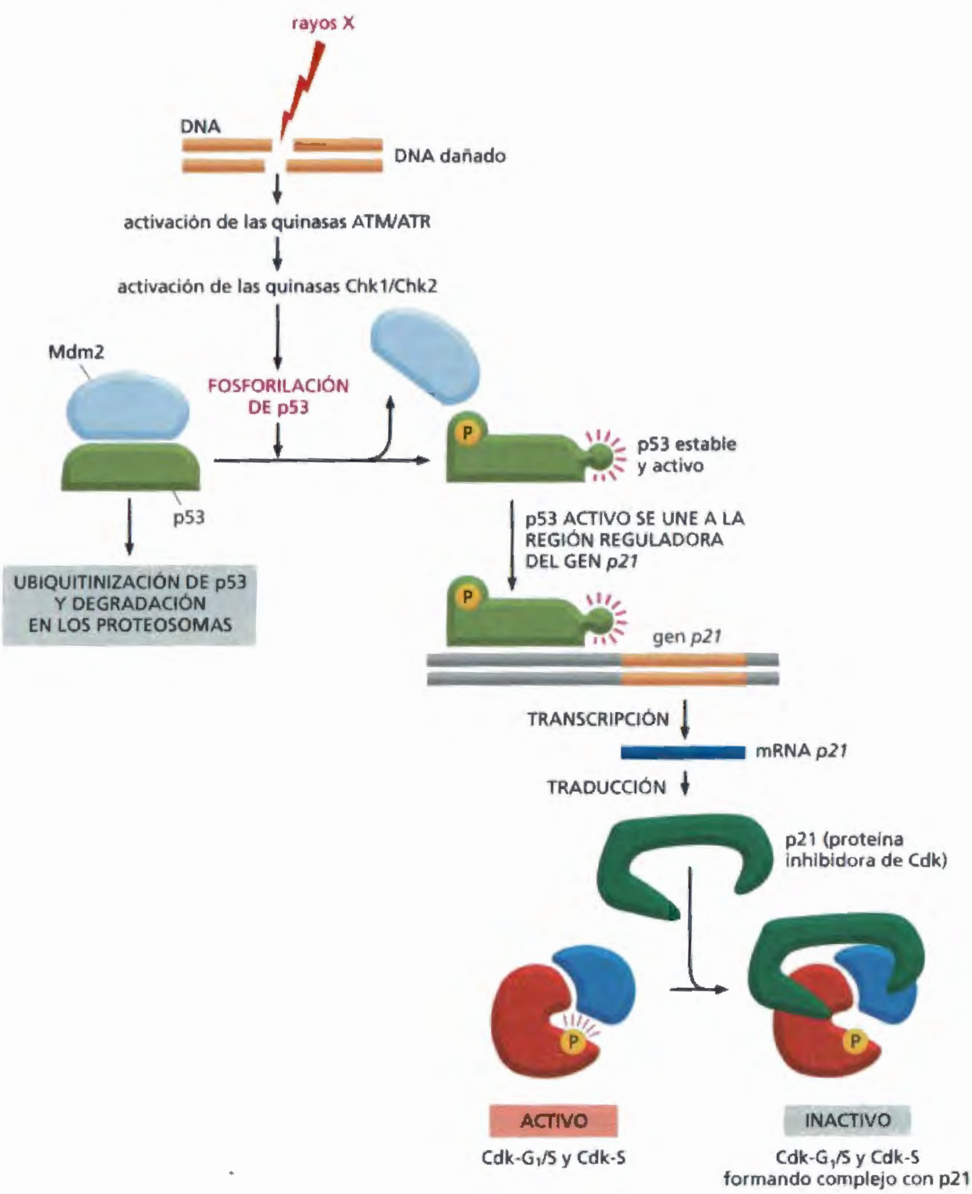


Figura 17–63 De qué forma el daño en el DNA detiene el ciclo celular en G_1. Cuando el DNA está dañado, varias proteínas quinasa son reclutadas en el lugar del daño e inician una vía de señalización que provoca la detención del ciclo celular. La primera quinasa que se localiza en el lugar dañado es o bien ATM o bien ATR, dependiendo del tipo de daño. A continuación, se reclutan y se activan proteínas quinasa adicionales, denominadas Chk1 y Chk2, dando lugar a la fosforilación de la proteína reguladora de genes p53. Normalmente, Mdm2 se une a p53 e induce su ubiquitinización y posterior degradación en los proteosomas. La fosforilación de p53 bloquea su unión a Mdm2; en consecuencia, p53 se acumula en grandes cantidades y estimula la transcripción del gen que codifica la proteína CKI, p21. La proteína p21 se une e inactiva a los complejos Cdk-G_1/S y Cdk-S, deteniendo a la célula en G_1. En algunas ocasiones, el daño en el DNA también induce o bien la fosforilación de Mdm2 o bien una reducción de su síntesis, lo cual provoca un aumento adicional de p53 (no se muestra).

Muchas células humanas limitan de forma programada el número de veces que se pueden dividir

Muchas células animales se dividen un número limitado de veces antes de detenerse y experimentar la detención permanente del ciclo celular. Por ejemplo, cuando se cultivan fibroblastos humanos procedentes de tejidos normales en un medio mitogénico estándar, sólo se dividen entre 25 y 50 veces. Hacia el final de este periodo, la proliferación se enlentece y finalmente se detiene; las células entran en un estado de no división del cual ya no se recuperan. Este fenómeno se denomina **senescencia celular replicativa**, aunque no parece probable que sea responsable del envejecimiento del organismo. Parece que la senescencia del organismo depende, al menos en parte, de la progresiva oxidación perjudicial de macromoléculas de vida larga. Así, las estrategias que reducen el metabolismo (como disminuir la ingesta de alimento) y que, por lo tanto, reducen la producción de especies reactivas de oxígeno, pueden alargar la duración de la vida de los animales de experimentación.

La senescencia celular replicativa de los fibroblastos humanos parece ser consecuencia de cambios en la estructura de los **telómeros**, de las secuencias repetidas de DNA y de proteínas asociadas que se localizan en los extremos de los cromosomas. Como se ha descrito en el Capítulo 5, cuando una célula se divide las secuencias de DNA del telómero no se replican del mismo modo que el resto del genoma, sino que son sintetizadas por la enzima **telomerasa**. La telomerasa también induce la formación de estructuras proteicas terminales que protegen los extremos de los cromosomas. Dado que los fibroblastos humanos, y muchas otras células somáticas humanas, carecen de telomerasa, sus telómeros se acortan en cada división celular y sus estructuras proteicas terminales se deterioran de forma progresiva. Finalmente, los extremos expuestos de los cromosomas son detectados como daño en el DNA, induciendo la detención del ciclo celular dependiente de p53, la cual se parece a la detención inducida por otros tipos de daño en el DNA (véase Figura 17–63). Por el contrario, las células de los roedores mantienen la actividad telomerasa y la función de los telómeros cuando proliferan en cultivo, de modo que carecen de un mecanismo dependiente de los telómeros que limite la proliferación. La expresión forzada de la telomerasa en fibroblastos humanos normales, utilizando técnicas de ingeniería genética, impide este tipo de senescencia. Por desgracia, la mayoría de las células cancerosas han recuperado la capacidad de expresar la telomerasa y de mantener la función del telómero a medida que proliferan; como consecuencia de ello, las células cancerosas no experimentan la senescencia celular replicativa.

Las señales de proliferación anómalas originan la detención del ciclo celular o la apoptosis, excepto en células cancerosas

Muchos de los componentes de las vías de señalización mitogénicas están codificados por genes que inicialmente fueron identificados como genes inductores de cáncer, u *oncogenes*, ya que sus mutaciones contribuyen al desarrollo de cáncer. Así, la mutación de un solo aminoácido de la pequeña GTPasa Ras provoca la hiperactivación de la proteína, conduciendo a la estimulación constante de las vías de señalización dependientes de Ras, incluso en ausencia de estimulación mitogénica. Asimismo, las mutaciones que dan lugar a la sobreexpresión de Myc provocan un excesivo crecimiento y proliferación celular, favoreciendo el cáncer.

Sin embargo, en la mayoría de células, cuando de forma experimental se sobreexpresa una forma hiperactiva de Ras o de Myc, el resultado no es una proliferación excesiva sino, sorprendentemente, lo contrario: las células detienen el ciclo celular o llevan a cabo apoptosis. La célula normal parece poder detectar estímulos mitogénicos anómalos y responde impidiendo que haya más divisiones. Respuestas como éstas contribuyen a dificultar la supervivencia y la proliferación de las células que contienen mutaciones inductoras de cáncer.

Aunque se desconoce cómo la célula detecta una estimulación mitogénica excesiva, con frecuencia este tipo de estimulación induce la expresión de una proteína inhibidora del ciclo celular denominada *Arf*, la cual se une e inhibe Mdm2. Como se ha mencionado, Mdm2 estimula por lo general la degradación de p53. Por lo tanto, la activación de Arf provoca el aumento de los niveles de p53 e induce la detención del ciclo celular o la apoptosis (**Figura 17–64**).

Entonces, si estos mecanismos bloquean la división o la supervivencia de las células mutantes que poseen señales de proliferación hiperactivas, ¿cómo se originan las célu-

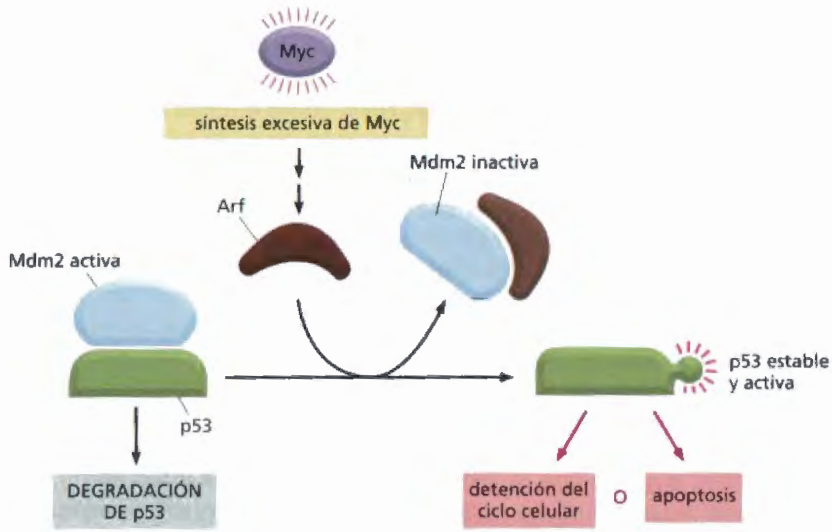


Figura 17–64 Detención del ciclo celular o inducción de la apoptosis como consecuencia de una estimulación excesiva de las vías mitogénicas. Los niveles demasiado elevados de Myc originan la activación de Arf, la cual se une e inhibe Mdm2, generando así un aumento de la concentración de p53 (véase Figura 17–60). En función del tipo celular y de las condiciones extracelulares, p53 inducirá a continuación la detención del ciclo celular o la apoptosis.

las cancerosas? La respuesta es que a menudo el sistema protector está inactivado en las células cancerosas debido a mutaciones en los genes que codifican componentes esenciales de las respuestas de punto de control, como Arf o p53 o las proteínas que ayudan a activarlos.

El crecimiento del organismo y de los órganos depende del crecimiento celular

La división celular no es suficiente para que un organismo o un órgano crezcan. Si las células proliferaran sin crecer, se volverían progresivamente más pequeñas y no se produciría ningún aumento neto de la masa celular total. Por lo tanto, en la mayoría de poblaciones celulares que proliferan, el crecimiento celular acompaña a la división celular. En los organismos unicelulares, como las levaduras, tanto el crecimiento celular como la proliferación celular sólo necesitan nutrientes. Por el contrario, en los animales, tanto el crecimiento celular como la proliferación celular dependen de moléculas de señalización extracelulares, sintetizadas por otras células, denominadas, respectivamente, **factores de crecimiento** y mitógenos.

Como los mitógenos, los factores de crecimiento extracelulares que estimulan el crecimiento de las células animales se unen a receptores de la superficie celular y activan vías de señalización intracelulares. Estas vías provocan la acumulación de proteínas y de otras macromoléculas, ya que aumentan la velocidad de su síntesis y reducen la velocidad de su degradación. Estas vías también inducen un aumento del consumo de nutrientes y la producción del ATP necesario para impulsar el aumento de la síntesis proteica. Una de las vías de señalización intracelular más importantes activada por los receptores de los factores de crecimiento es aquella en la que participa la enzima *PI 3-quinasa*, la cual añade un fosfato procedente del ATP en la posición 3 de los fosfolípidos de inositol de la membrana plasmática. Como se describe en el Capítulo 15, la activación de la PI 3-quinasa conduce a la activación de una quinasa, llamada *TOR*, la cual se encuentra en el centro de las vías reguladoras del crecimiento de todos los eucariotas. TOR activa muchas dianas de la célula que estimulan procesos metabólicos y aumentan la síntesis proteica. Una de las dianas es una proteína quinasa denominada *quinasa S6 (S6K)*, que fosforila la proteína ribosómica S6, aumentando la capacidad de los ribosomas de traducir un subconjunto de moléculas de mRNA, la mayoría de las cuales codifican componentes ribosómicos. TOR también activa de forma indirecta un factor de iniciación de la traducción llamado *eIF4E* y de forma directa proteínas reguladoras de genes que estimulan el aumento de la expresión de genes que codifican subunidades ribosómicas (**Figura 17–65**).

Las células que proliferan por lo general coordinan su crecimiento y división

Para que las células que proliferan mantengan un tamaño constante, deben coordinar su crecimiento con la división celular para asegurar que el tamaño celular se duplique con cada

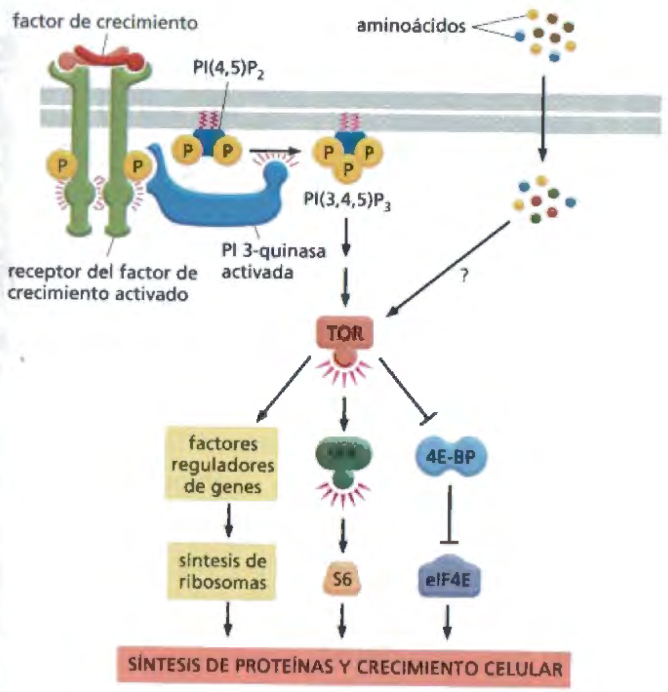


Figura 17–65 Estimulación del crecimiento celular por factores de crecimiento extracelulares y nutrientes. Como se describe en el Capítulo 15, la ocupación de receptores de la superficie celular por factores de crecimiento provoca la activación de la PI 3-quinasa, la cual induce la síntesis de proteínas a través de una compleja vía de señalización que conduce a la activación de la proteína quinasa TOR; los nutrientes extracelulares, como los aminoácidos, también colaboran en la activación de TOR mediante un mecanismo desconocido. Como se muestra, TOR utiliza numerosos mecanismos que inducen la síntesis de proteínas; también inhibe la degradación de proteínas (no se muestra). Además, los factores de crecimiento aumentan la síntesis de la proteína reguladora de genes Myc (no se muestra), la cual activa la transcripción de varios genes que activan el metabolismo y el crecimiento celular. 4E-BP es un inhibidor del factor de inicio de la traducción eIF4E.

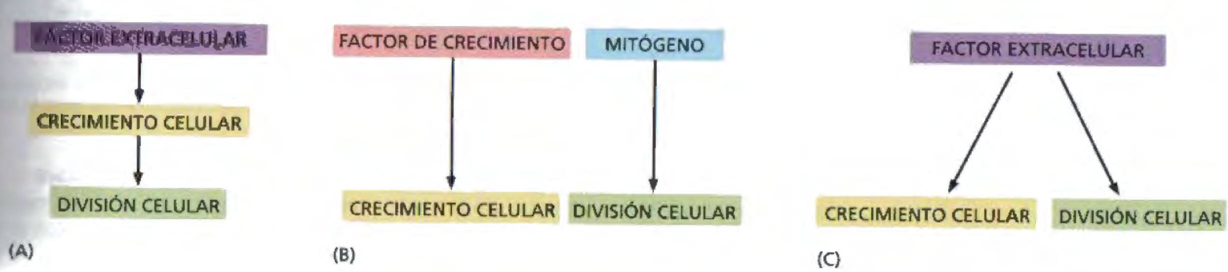
división: si las células crecieran muy lentamente, se volverían más pequeñas con cada división, y si crecieran demasiado rápido, se irían volviendo más grandes. Se desconoce cómo logran las células esta coordinación, pero parece probable que suponga numerosos mecanismos que varían en diferentes organismos e incluso en diferentes tipos celulares del mismo organismo (**Figura 17–66**).

Sin embargo, el crecimiento y la división de las células animales no siempre están coordinados. En muchas ocasiones, están por completo desacoplados para permitir el crecimiento sin la división o la división sin el crecimiento. Por ejemplo, las células musculares y las neuronas pueden crecer de manera espectacular después de que hayan abandonado de forma permanente el ciclo celular. Asimismo, los óvulos de muchos animales crecen hasta alcanzar un gran tamaño sin dividirse; sin embargo, después de la fecundación, esta relación se invierte y se producen muchas rondas de división sin crecimiento (véase Figura 17–9).

En comparación con la división celular, existen muy pocos estudios sobre cómo se controla el tamaño celular en los animales. Como consecuencia de ello, continúa siendo un misterio cómo se determina el tamaño celular y por qué los diferentes tipos celulares de un mismo animal crecen hasta tener un tamaño tan diferente (**Figura 17–67**). Uno de los casos mejor comprendidos en mamíferos es el de las *neuronas simpáticas* adultas, la cuales han abandonado permanentemente el ciclo celular. Su tamaño depende de la cantidad del *factor de crecimiento nervioso* (NGF: *nerve growth factor*) secretado por las células diana a las que inerva; cuanto mayor sea la cantidad de NGF a la que la neurona tiene acceso, mayor será su tamaño.

Parece probable que los genes que expresa una célula determinan los límites de su tamaño, mientras que las moléculas de señalización extracelulares y los nutrientes regulan el tamaño dentro de estos límites. El reto estriba en identificar los genes y las moléculas de señalización pertinentes de cada tipo celular.

Figura 17–66 Posibles mecanismos que coordinan el crecimiento y la división celulares. En las células que proliferan, el tamaño celular se mantiene mediante mecanismos que coordinan las velocidades de la división y del crecimiento celular. Hay muchos mecanismos y diferentes tipos celulares utilizan distintas combinaciones de ellos. (A) En muchos tipos celulares sobre todo levaduras, la velocidad de la división celular está controlada por la velocidad del crecimiento celular, de manera que sólo se produce la división cuando la velocidad del crecimiento alcanza un umbral mínimo; en levaduras, los niveles de los nutrientes extracelulares son los que regulan principalmente la velocidad del crecimiento celular y por consiguiente la velocidad de la división celular. (B) En algunos tipos celulares animales, el crecimiento y la división se pueden controlar por factores extracelulares distintos (factores de crecimiento y mitógenos, respectivamente); el tamaño celular depende de los niveles relativos de los dos tipos de factores. (C) Algunos factores extracelulares pueden estimular tanto el crecimiento celular como la división celular mediante vías de señalización activadas de forma simultánea que estimulan el crecimiento, y mediante otras vías que estimulan la progresión del ciclo celular.



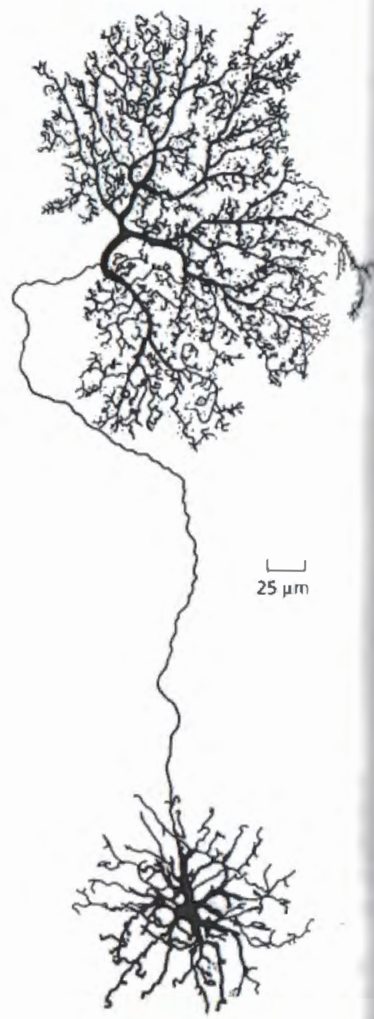


Figura 17–67 Diferencia de tamaño entre una neurona (de la retina) y un linfocito en un mamífero. Ambas células contienen la misma cantidad de DNA. Una neurona sigue creciendo después de haber abandonado permanentemente el ciclo celular. Durante este tiempo, la relación entre los volúmenes del citoplasma y del núcleo aumenta en gran medida (en un factor superior a 10^5 en algunas neuronas). (Neurona de B.B. Boycott, en Essays on the Nervous System [R. Bellairs y E.G. Gray, eds]. Oxford, UK: Clarendon Press, 1974.)

Las células vecinas compiten por las proteínas de señalización extracelulares

Cuando se cultivan en una placa en presencia de suero, la mayoría de los tipos celulares de los mamíferos se adhieren al fondo de la placa, se extienden y se dividen hasta que forman una monocapa confluente. Cada célula se une a la placa y contacta con las células vecinas por todos los lados. Cuando esto ocurre, las células normales, a diferencia de las células cancerosas, dejan de proliferar –un fenómeno conocido como *inhibición de la división celular dependiente de la densidad*. Inicialmente, este fenómeno se describió bajo la denominación de "inhibición por contacto" de la división celular, pero no parece probable que las interacciones célula-célula sean las únicas responsables. La densidad celular a la que se detiene la proliferación celular en la monocapa confluente aumenta a medida que la concentración de suero en el medio asciende. Además, si se hace circular un flujo con medio de cultivo fresco sobre una capa confluente de fibroblastos aumentando el aporte de mitógenos, las células que están bajo el flujo son inducidas a dividirse (**Figura 17–68**). Así, la inhibición de la proliferación celular dependiente de la densidad parece reflejar, al menos en parte, la capacidad de una célula de privar localmente al medio de mitógenos extracelulares, privando de ellos a las células adyacentes.

Este tipo de competencia podría ser importante para las células de los tejidos así como para las células en cultivo, dado que les impide proliferar por encima de una cierta densidad de población, determinada por la disponibilidad de mitógenos, factores de crecimiento y factores de supervivencia. Por lo general, la cantidad de estos factores es limitante en los tejidos, de modo que el aumento de su cantidad provoca un aumento del número de células, del tamaño celular o de ambos. Así, en los tejidos, las concentraciones de estos factores desempeñan funciones importantes en la determinación del tamaño y del número de células, y posiblemente en el tamaño final del órgano o del tejido.

En ocasiones, el tamaño total de un tejido también puede estar controlado por factores inhibidores extracelulares. Por ejemplo, la *miostatina* es un miembro de la familia del TGFβ que normalmente inhibe la proliferación de los mioblastos, los cuales se fusionan formando las fibras musculares esqueléticas. Cuando en ratones se elimina el gen que codifica la miostatina, los músculos crecen hasta llegar a alcanzar un tamaño varias veces superior a lo normal. Cabe destacar que dos razas de ganado vacuno que fueron seleccionadas por su volumen muscular acabaron por presentar mutaciones en el gen que codifica la miostatina (**Figura 17–69**).

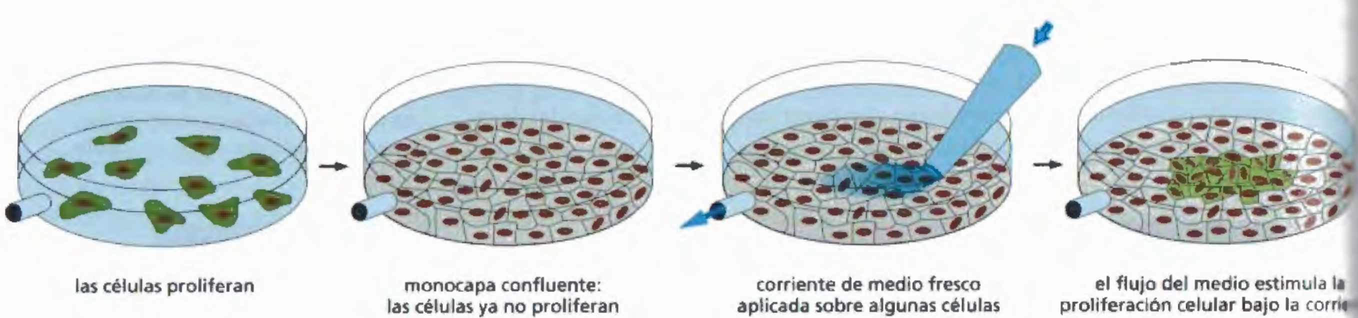


Figura 17–68 Efecto de un medio fresco en una monocapa celular confluente. Las células de una monocapa confluente no se dividen (*gris*). Las células se vuelven a dividir (*verde*) si son expuestas de forma directa a un medio de cultivo fresco. Aparentemente, en la monocapa confluente, la proliferación ha cesado porque el medio de cultivo que está en contacto con las células carece ya de mitógenos por los que compiten las células.



Figura 17–69 Efectos de una mutación de la miostatina en el tamaño de los músculos. La mutación provoca un gran aumento de la masa muscular, como ilustra este toro Azul Belga. La raza Azul Belga fue producida por criadores y sólo recientemente se ha sabido que era portadora de una mutación en el gen de la *miostatina*. (De H.L. Sweeney, *Sci. Am.* 291:62, 2004. Con la autorización de Scientific American.)

Los animales controlan la masa celular total mediante mecanismos desconocidos

El tamaño de un animal o de uno de sus órganos depende en gran parte del número y del tamaño de las células que contiene, es decir, de la masa celular total. Cabe destacar que los animales pueden de algún modo evaluar la masa celular total de un tejido o de un órgano y regularla: en muchas circunstancias, por ejemplo, si se aumenta o disminuye de forma experimental el tamaño celular en un órgano, el número de células se ajusta manteniendo el tamaño normal del órgano. Este fenómeno se ha ilustrado de forma espectacular mediante experimentos en salamandras, en las que se manipuló el tamaño celular alterando la ploidía celular (en todos los organismos, el tamaño de una célula es proporcional a su ploidía o contenido genómico). Las salamandras de diferente ploidía tienen el mismo tamaño, pero el número de células es diferente. Todas las células de una salamandra pentaploide tienen un volumen cinco veces mayor que el de las salamandras haploides y cada órgano de los animales pentaploides sólo tiene una quinta parte de las células que hay en sus semejantes haploides, de modo que los órganos tienen aproximadamente el mismo tamaño (**Figura 17–70** y **Figura 17–71**). En esta ocasión (y en muchas otras), el tamaño de los órganos y el de los organismos dependen de mecanismos que pueden determinar de algún modo la masa celular total. Sin embargo, sigue siendo un misterio cómo los animales calculan y ajustan la masa celular total.

El desarrollo de extremidades y de órganos de tamaño y forma específicos depende de complejos controles posicionales, así como de las concentraciones locales de proteínas de señalización extracelulares que estimulan o inhiben el crecimiento celular, la división y la supervivencia. Como trataremos en el Capítulo 22, se conocen muchos de los genes que colaboran en estos procesos en el embrión. No obstante, queda mucho por aprender acerca de cómo estos genes regulan el crecimiento, la división, la supervivencia y la diferenciación celulares para generar un organismo complejo.

Los controles que gobiernan estos procesos en un organismo adulto también son poco conocidos. Por ejemplo, cuando cicatriza una herida en la piel de un vertebrado, para re-

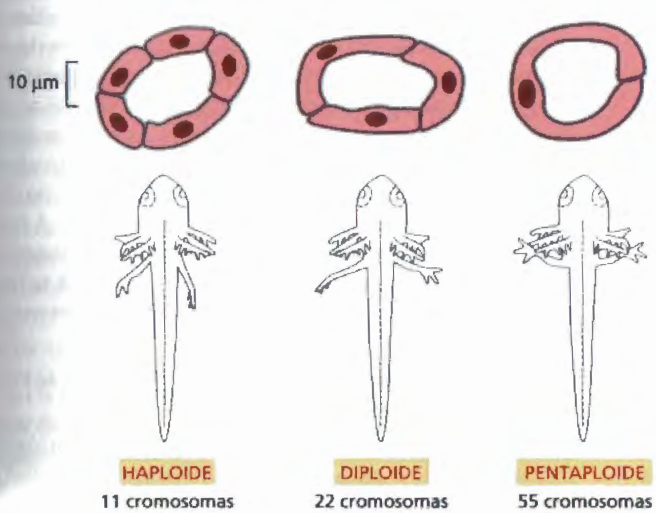


Figura 17–70 Secciones de túbulos renales de larvas de salamandra con ploidías diferentes. En todos los organismos, desde las bacterias a los humanos, el tamaño celular es proporcional a la ploidía. Las salamandras pentaploides, por ejemplo, tienen células que son mucho más grandes que las de las salamandras haploides. Sin embargo, tanto los animales como sus órganos tienen el mismo tamaño, ya que cada tejido del animal pentaploide contiene menos células. Esto indica que el tamaño de un organismo o de un órgano no se controla sencillamente contando el número de divisiones celulares o el número de células; la masa celular total tiene que regularse de algún modo. (Adaptado de G. Fankhauser, en Analysis of Development [B.H. Willier, P.A. Weiss y V. Hamburger, eds.], pp. 126-150. Philadelphia: Saunders, 1955.)

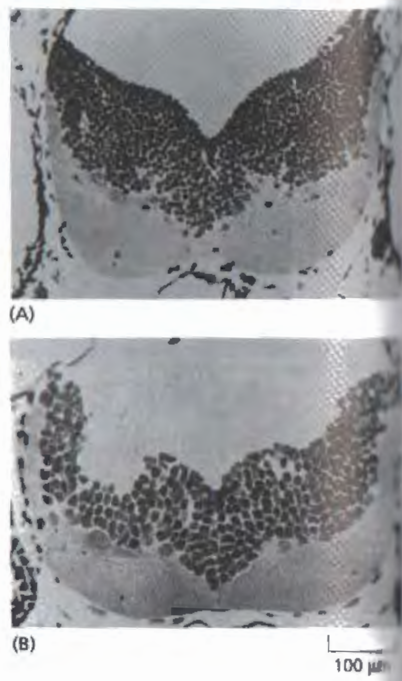


Figura 17–71 El cerebro de una salamandra haploide y el de una tetraploide. (A) Esta micrografía muestra una sección transversal del cerebro de una salamandra haploide. (B) La sección transversal correspondiente del cerebro de una salamandra tetraploide revela que la disminución del número de células se compensa con el mayor tamaño de éstas, de manera que el tamaño global del cerebro es el mismo en los dos animales. (De G. Fankhauser, *Int. Rev. Cytol.* 1:165-193, 1952. Con la autorización de Elsevier.)

construir el tejido perdido deben regenerarse casi una docena de tipos celulares, desde los fibroblastos a las células de Schwann, en cantidades, tamaños y posiciones adecuados. Asimismo, los mecanismos que controlan el crecimiento y la proliferación celular en los tejidos también son clave para la comprensión del cáncer, una enfermedad en la que el control no funciona adecuadamente, como se describe en el Capítulo 20.

Resumen

En los organismos pluricelulares, el tamaño, la división y la muerte celulares están cuidadosamente controlados, garantizando que el organismo y sus órganos alcancen y mantengan un tamaño apropiado. Los mitógenos estimulan la velocidad de la división celular eliminando los frenos moleculares que contienen la progresión del ciclo celular en G_1. Los factores de crecimiento inducen el crecimiento celular (un aumento de la masa celular) estimulando la síntesis e inhibiendo la degradación de macromoléculas. Para mantener un tamaño constante, las células que proliferan utilizan numerosos mecanismos que aseguran que el crecimiento celular está coordinado con la división celular. Los animales mantienen el tamaño normal de sus tejidos y órganos ajustando el tamaño celular, compensando los cambios en el número de células o viceversa. Se desconocen los mecanismos que hacen que esto sea posible.

PROBLEMAS

¿Qué afirmaciones son ciertas? Explicar por qué sí o por qué no

17–1 Dado que un humano adulto está formado por alrededor de 10^{13} células, y que a diario mueren y son reemplazadas unas 10^{10} células, cada tres años nos convertimos en una persona nueva.

17–2 La regulación de los complejos Cdk-ciclina depende por completo de la fosforilación y la defosforilación.

17–3 Con el objeto de que las células que proliferan mantengan un tamaño relativamente constante, la duración del ciclo celular tiene que coincidir con el tiempo que tarda la célula en duplicar su tamaño.

17–4 Mientras que otras proteínas van y vienen durante el ciclo celular, las proteínas del complejo de reconocimiento del origen permanecen unidas al DNA durante todo el ciclo celular.

17–5 Los cromosomas se sitúan en la placa metafásica mediante fuerzas iguales y opuestas que estiran de ellos hacia los dos polos del huso.

17–6 Si pudiéramos estimular la actividad telomerasa en todas nuestras células, podríamos evitar el envejecimiento.

Resolver los siguientes problemas

17–7 ¿Por qué se considera extraordinario que muchos genes del ciclo celular de células humanas funcionen perfectamente cuando son expresados en levaduras? Después de todo, muchos genes humanos que codifican enzimas que participan en reacciones metabólicas también funcionan en levaduras y este hecho nadie lo considera extraordinario.

17–8 Se ha aislado un nuevo mutante *Cdc* de la levadura de gemación que forma colonias a 25 °C, pero no a 37 °C. El objetivo es aislar el gen de tipo salvaje correspondiente al gen defectuoso del mutante *Cdc* ¿Cómo se podría aislar el gen de tipo salvaje utilizando una biblioteca de DNA plasmídico obtenida de células de levadura de tipo salvaje?

17–9 Se ha aislado un mutante termosensible de la levadura de gemación. El mutante prolifera bien a 25 °C, pero a 35 °C todas las células desarrollan una gran yema y detienen su progresión a través del ciclo celular. La morfología característica de las células en el momento en el que dejan de proliferar se conoce como la morfología "landmark".

Aunque es muy difícil obtener cultivos sincronizados de esta levadura, se trata de determinar exactamente en qué momento del ciclo celular tiene que actuar el producto génico termosensible –su punto de ejecución, en la terminología especializada– para que la célula pueda completar el ciclo. Con un buen microscopio equipado con una platina térmica y una cámara de vídeo, se graba una película de un campo de células cuando experimenten el aumento de la temperatura para observar la morfología de las células cuando detengan su progresión a través del ciclo celular. Dado que las células no se mueven mucho, es relativamente fácil estudiar una determinada célula. Para interpretar lo observado, se organiza un círculo de fotografías de células al inicio del experimento en función del tamaño de sus yemas hijas. A continuación, se buscan las fotos correspondientes a esas mismas células 6 horas después, cuando el crecimiento y la división se han detenido por completo. Los resultados del mutante se muestran en la **Figura P17–1**

A. Indicar en el esquema de la Figura P17–1 dónde se encuentra el punto de ejecución del mutante.

B. ¿Existe correspondencia entre el punto de ejecución y el momento en el que el ciclo celular se detiene en el mutante? ¿Cómo es posible saberlo?



Figura P17–1 Fotografías tomadas a intervalos de un mutante termosensible de levadura (Problema 17–9). Las células del *círculo interior* están ordenadas en función del tamaño de su yema, el cual se corresponde con su posición en el ciclo celular. Después de 6 horas a 37 °C, han dado lugar a las células que se muestran en el *círculo externo*. Posteriormente no se ha producido ni crecimiento ni divisiones.

17–10 La expresión de la subunidad Scc1 del complejo de cohesinas, la cual es imprescindible para que las cromátidas hermanas se emparejen, puede regularse artificialmente en cualquier punto del ciclo celular. Si la expresión se activa al comienzo de la fase S, todas las células se dividen de forma satisfactoria y sobreviven. Por el contrario, si la expresión de Scc1 se activa después de que la fase S haya finalizado, las células no se pueden dividir y mueren, incluso aunque Scc1 se acumule en el núcleo e interaccione eficazmente con los cromosomas ¿Por qué las cohesinas deben estar presentes durante la fase S para que las células se dividan normalmente?

17–11 Si las cohesinas unen las cromátidas hermanas a lo largo de toda su longitud ¿cómo es posible que las condensinas generen cromosomas mitóticos como el que se observa en la **Figura P17–2**, que muestra con claridad las dos cromátidas hermanas como dominios distintos?

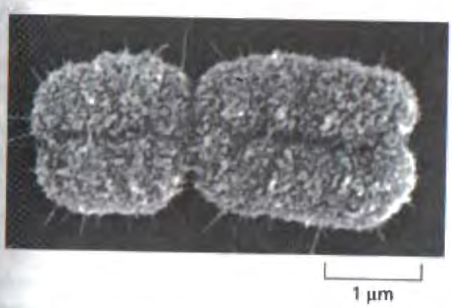


Figura P17–2 Electromicrografía de barrido de un cromosoma mitótico altamente condensado de células de vertebrado (Problema 17–11). (Cortesía de Terry D. Allen.)

17–12 Grandes dosis de cafeína interfieren con el mecanismo de punto de control de la replicación del DNA en las células de los mamíferos ¿Por qué entonces las autoridades sanitarias todavía no han emitido una advertencia apropiada dirigida a los bebedores empedernidos de café y de refrescos de cola? Una taza de café (150 mL) contiene 100 mg de cafeína (196 g/mol) ¿Cuántas tazas de café tendrías que beber para alcanzar la dosis (10 mM) necesaria para interferir con el mecanismo de punto de control de la replicación del DNA? (Un adulto típico contiene aproximadamente 40 litros de agua.)

17–13 En la **Figura P17–3**, se muestra una célula viva del epitelio pulmonar de un tritón en diferentes etapas de la fase M. Ordenar estas imágenes obtenidas con un microscopio óptico en su secuencia correcta e identificar la etapa de la fase M que representa cada una de ellas.

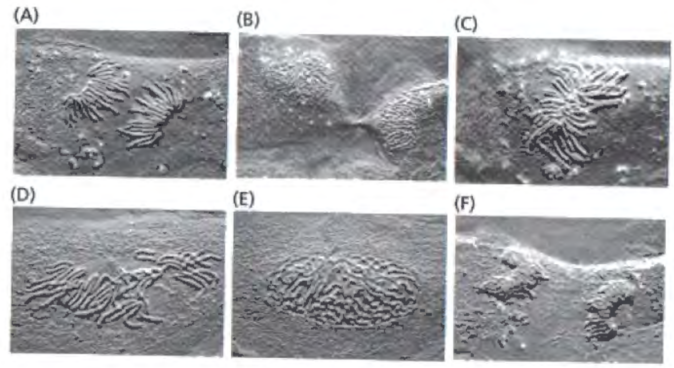


Figura P17–3 Micrografías ópticas de una sola célula en diferentes etapas de la fase M (Problema 17–13). (Cortesía de Conly L. Rieder.)

17–14 ¿Cuántos cinetocoros tiene una célula humana en mitosis?

17–15 Un artículo clásico distingue claramente las propiedades de los microtúbulos astrales de las propiedades de los microtúbulos cinetocóricos. Los investigadores utilizaron centrosomas para iniciar el crecimiento de los microtúbulos y a continuación añadieron los cromosomas. Los cromosomas se unieron a los extremos libres de los microtúbulos, tal como se ilustra en la **Figura P17–4**. Después, diluyeron los complejos formados a una concentración muy baja de tubulina (bastante por debajo de la concentración crítica para el ensamblaje de los microtúbulos) y los examinaron (Figura P17–4). Como se observa, sólo los microtúbulos cinetocóricos fueron estables con la dilución.

A. ¿Por qué los microtúbulos cinetocóricos son estables?

B. ¿Cómo explicar la desaparición de los microtúbulos astrales después de la dilución? ¿Se despegan del centrosoma, se despolimerizan por un extremo o se disgregan a lo largo de su longitud al azar?

C. ¿Sería de ayuda un curso temporal después de la dilución para determinar cuál de estos posibles mecanismos es el responsable de la desaparición de los microtúbulos astrales?

17–16 ¿Cuáles son las dos máquinas citoesqueléticas que se ensamblan para llevar a cabo los procesos mecánicos de la mitosis y la citocinesis en las células animales?

17–17 ¿En qué se diferencian los mitógenos, los factores de crecimiento y los factores de supervivencia?

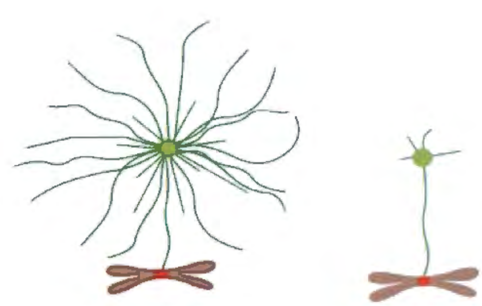


Figura P17–4 Disposición de centrosomas, cromosomas y microtúbulos antes y después de la dilución hasta una baja concentración de tubulina (Problema 17–15).

BIBLIOGRAFÍA

General

Morgan DO (2007) The Cell Cycle: Principles of Control. London: New Science Press.

Murray AW & Hunt T (1993) The Cell Cycle: An Introduction. New York: WH Freeman and Co.

Visión general del ciclo celular

Forsburg SL & Nurse P (1991) Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu Rev Cell Biol* 7:227–256.

Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR et al (1974) Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183:46–51.

Kirschner M, Newport J & Gerhart J (1985) The timing of early developmental events in *Xenopus*. *Trends Genet* 1:41–47.

Nurse P, Thuriaux P & Nasmyth K (1976) Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 146:167–178.

El sistema de control del ciclo celular

Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J et al (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33:389–396.

Lohka MJ, Hayes MK & Maller JL (1988) Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3009–3013.

Masui Y and Markert CL (1971) Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 177:129–146.

Morgan DO (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:261–291.

Murray AW & Kirschner MW (1989) Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* 339:275–280.

Pavletich NP (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and CIP and Ink4 inhibitors. *J Mol Biol* 287:821–828.

Peters JM (2006) The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:644–656.

Petroski MD & Deshaies RJ (2005) Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nature Rev Mol Cell Biol* 6:9–20.

Wittenberg C & Reed SI (2005) Cell cycle-dependent transcription in yeast: promoters, transcription factors, and transcriptomes. *Oncogene* 24:2746–2755.

Fase S

Arias EE & Walter JC (2007) Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes Dev* 21:497–518.

Bell SP & Dutta A (2002) DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 71:333–374.

Bell SP & Stillman B (1992) ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* 357:128–134.

Diffley JF (2004) Regulation of early events in chromosome replication. *Curr Biol* 14:R778–R786.

Groth A, Rocha W, Verreault A et al (2007) Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* 128:721–733.

Tanaka S, Umemori T, Hirai K et al (2007) CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature* 445:328–332.

Zegerman P & Diffley JF (2007) Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature* 445:281–285.

Mitosis

Cheeseman IM, Chappie JS, Wilson-Kubalek EM et al (2006) The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell* 127:983–997.

Dong Y, Vanden Beldt KJ, Meng X et al (2007) The outer plate in vertebrate kinetochores is a flexible network with multiple microtubule interactions. *Nature Cell Biol* 9:516–522.

Heald R, Tournebize R, Blank T et al (1996) Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature* 382:420–425.

Hirano T (2005) Condensins: organizing and segregating the genome. *Curr Biol* 15:R265–R275.

Kapoor TM, Lampson MA, Hergert P et al (2006) Chromosomes can congress to the metaphase plate before biorientation. *Science* 311:388–391.

Mitchison T & Kirschner M (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312:237–242.

Mitchison TJ (1989) Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: evidence from photoactivation of fluorescence. *J Cell Biol* 109:637–652.

Mitchison TJ & Salmon ED (2001) Mitosis: a history of division. *Nature Cell Biol* 3:E17–E21.

Musacchio A & Salmon ED (2007) The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Rev Mol Cell Biol* 8:379–393.

Nasmyth K (2002) Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* 297:559–565.

Nigg EA (2007) Centrosome duplication: of rules and licenses. *Trends Cell Biol* 17:215–221.

Nurse P (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344:503–508.

Page SL & Hawley RS (2003) Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* 301:785–789.

Petronczki M, Siomos MF & Nasmyth K (2003) Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112:423–440.

Salmon ED (2005) Microtubules: a ring for the depolymerization motor. *Curr Biol* 15:R299–R302.

Tanaka TU, Stark MJ & Tanaka K (2005) Kinetochore capture and bi-orientation on the mitotic spindle. *Nature Rev Mol Cell Biol* 6:929–942.

Uhlmann F, Lottspeich F & Nasmyth K (1999) Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* 400:37–42.

Wadsworth P & Khodjakov A (2004) E pluribus unum: towards a universal mechanism for spindle assembly. *Trends Cell Biol* 14:413–419.

Citocinesis

Albertson R, Riggs B & Sullivan W (2005) Membrane traffic: a driving force in cytokinesis. *Trends Cell Biol* 15:92–101.

Burgess DR & Chang F (2005) Site selection for the cleavage furrow at cytokinesis. *Trends Cell Biol.* 15:156–162.

Dechant R & Glotzer M (2003) Centrosome separation and central spindle assembly act in redundant pathways that regulate microtubule density and trigger cleavage furrow formation. *Dev Cell* 4:333–344.

Eggert US, Mitchison TJ & Field CM (2006) Animal cytokinesis: from parts list to mechanisms. *Annu Rev Biochem* 75:543–566.

Glotzer M (2005) The molecular requirements for cytokinesis. *Science* 307:1735–1739.

Grill SW, Gonczy P, Stelzer EH et al (2001) Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Nature* 409:630–633.

Jurgens G (2005) Plant cytokinesis: fission by fusion. *Trends Cell Biol* 15:277–28[illegible]

Rappaport R (1986) Establishment of the mechanism of cytokinesis in animal cells. *Int Rev Cytol* 105:245–281.

Control de la división celular y del crecimiento celular

Adhikary S & Eilers M (2005) Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nature Rev Mol Cell Biol* 6:635–645.

Campisi J (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120:513–522.

Conlon I & Raff M (1999) Size control in animal development. *Cell* 96:235–244

Frolov MV, Huen DS, Stevaux O et al (2001) Functional antagonism between E2F family members. *Genes Dev* 15:2146–2160.

Harrison JC & Haber JE (2006) Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet* 40:209–235.

Jorgensen P & Tyers M (2004) How cells coordinate growth and division. *Curr Biol* 14:R1014–R1027.

Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323–331.

Raff MC (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356:397–400.

Sherr CJ & DePinho RA (2000) Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 102:407–410.

Sherr CJ & Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13:1501–1512.

Trimarchi JM & Lees JA (2002) Sibling rivalry in the E2F family. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3:11–20.

Vousden KH & Lu X (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Rev Cancer* 2:594–604.

Zetterberg A & Larsson O (1985) Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:5365–5369.

18

Apoptosis

La muerte celular desempeña una parte esencial en el desarrollo de los vegetales y de los animales y, por lo general, continúa en la edad adulta. En un humano adulto sano, cada hora mueren miles de millones de células en la médula ósea y en el intestino. Nuestros tejidos no se reducen porque, mediante mecanismos reguladores desconocidos, la muerte celular se equilibra con la división celular. En la actualidad sabemos que estas muertes celulares "normales" son una suerte de suicidios, en los que las células activan un programa de muerte intracelular y se autoeliminan de forma controlada; este proceso se denomina **muerte celular programada**. La idea de que las células animales tienen un programa de muerte se propuso en la década de 1970, pero su aceptación general no llegaría hasta 20 años más tarde y dependió de estudios genéticos realizados en el nematodo *C. elegans* que identificaron los primeros genes implicados en la muerte celular programada y en su control.

La muerte celular programada en animales se produce normalmente, aunque no siempre, por **apoptosis** (palabra de origen griego que significa "caer", como las hojas de un árbol). Aunque la apoptosis es sólo una forma de muerte celular programada, es con diferencia la más común y mejor entendida y, de manera confusa, los biólogos utilizan a menudo los términos muerte celular programada y apoptosis de forma indistinta. Las células que mueren por apoptosis experimentan cambios morfológicos característicos. <GCCC> Se encogen y se condensan, el citoesqueleto se colapsa, la envoltura nuclear se desensambla y la cromatina nuclear se condensa y se fragmenta (**Figura 18–1**A). La superficie celular a menudo emite protrusiones y, si la célula es grande, con frecuencia se rompe en fragmentos rodeados de membrana denominados *cuerpos apoptóticos*. Además, la superficie de la célula o de los cuerpos apoptóticos se altera químicamente, de modo que una célula adyacente o un macrófago (una célula fagocítica especializada, véase Capítulo 23) los fagocita con rapidez, antes de que puedan liberar su contenido (Figura 18–1B). De esta manera, la célula muere limpiamente y es eliminada en muy poco tiempo, sin provocar una respuesta inflamatoria perjudicial. Como las células son fagocitadas y digeridas de forma tan rápida, es habitual que se observen pocas células muertas, incluso aunque un gran número de células haya muerto por apoptosis. Es probable que este sea motivo por el que los biólogos han pasado por alto la apoptosis durante muchos años y quizás todavía subestiman su importancia.

A diferencia de la apoptosis y de otras formas de muerte celular programada peor caracterizadas (que suponen el funcionamiento de un programa de muerte intracelular), las células animales que mueren por accidente en respuesta a una lesión aguda, como el trauma o la falta de riego sanguíneo, normalmente mueren por un proceso denominado *necrosis celular*. Las células necróticas se hinchan y se lisan, liberando todo su contenido sobre las células adyacentes y provocando una respuesta inflamatoria (Figura 18–1C).

La muerte celular programada no se limita a los animales. En los vegetales, se produce durante el desarrollo y en la senescencia de las flores y de las hojas, así como en respuesta a la lesión y la infección. La muerte celular programada sucede incluso en los organismos unicelulares, incluidas las levaduras y las bacterias. Los mecanismos moleculares implicados en estos casos son diferentes de los que median la apoptosis en las células animales y no los tendremos en cuenta. En este capítulo, trataremos las funciones de la muerte celular programada en los animales, los mecanismos moleculares de la apoptosis y su regulación, y cómo una apoptosis excesiva o insuficiente puede contribuir a la enfermedad humana.

La muerte celular programada elimina las células superfluas

La cantidad de muerte celular programada que se produce en los tejidos de los animales durante el desarrollo y en adultos es asombrosa. Así, en el desarrollo del sistema nervioso de los

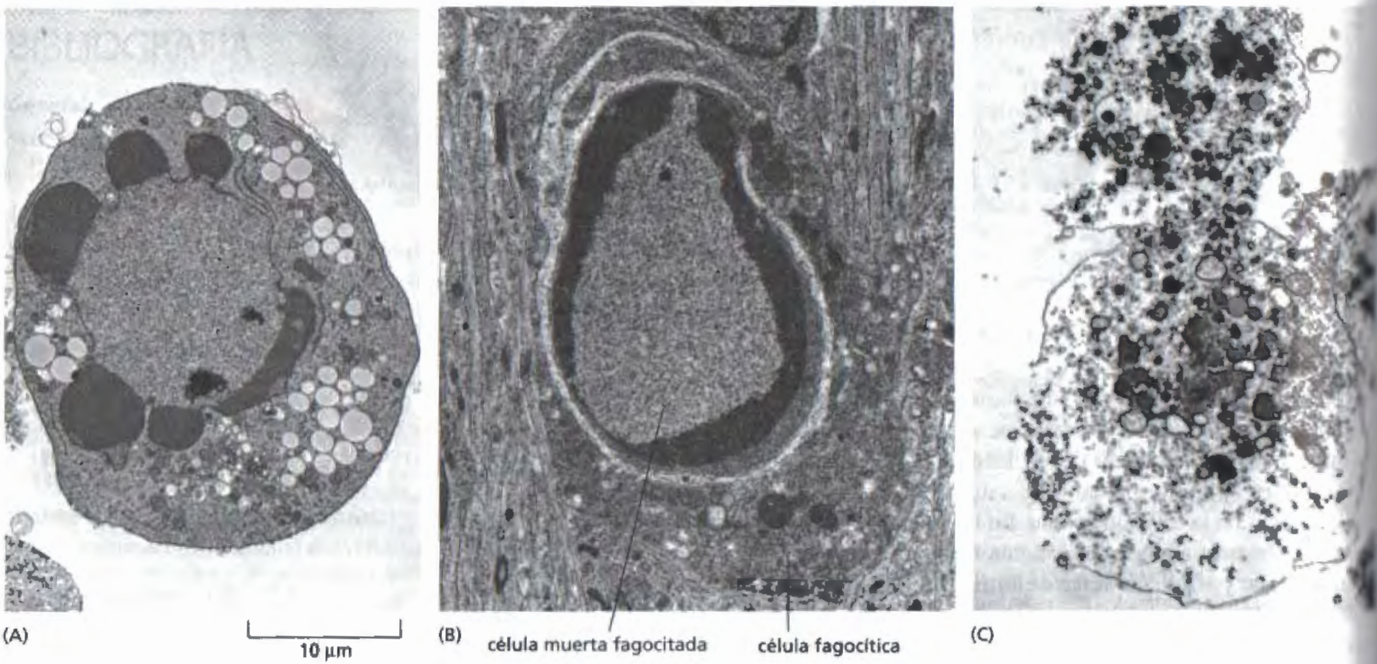


Figura 18–1 Dos formas diferentes de muerte celular. Estas electromicrografías muestran células que han muerto por apoptosis (A y B) o por un tipo de muerte celular accidental llamada necrosis (C). Las células en (A) y (C) murieron en una placa de cultivo, mientras que la célula en (B) murió en un tejido en desarrollo y ha sido fagocitada por una célula fagocítica. Nótese que las células en (A) y (B) se han condensado pero parecen relativamente intactas, mientras que la célula en (C) parece que ha explotado. Las grandes vacuolas que se ven en el citoplasma de la célula en (A) son una característica variable de la apoptosis. (Cortesía de Julia Burne.)

vertebrados más de la mitad de las neuronas mueren poco después de haberse formado. Que mueran tantas células, sobre todo cuando la inmensa mayoría están sanas en el momento en que se autoeliminan, parece un "derroche" excesivo. ¿Cuál es el significado de esta muerte celular masiva?

En algunos casos, la respuesta es evidente. En el desarrollo de los animales, la muerte celular programada elimina las células superfluas, normalmente por apoptosis. La muerte celular, por ejemplo, ayuda a moldear las extremidades durante el desarrollo embrionario: comienzan como estructuras en forma de pala y los dedos se van separando a medida que las células que hay entre ellos van muriendo, como se ilustra con las patas de un ratón en la **Figura 18–2**. En otras ocasiones, las células mueren cuando la estructura que forman ya no es necesaria. Cuando un renacuajo se convierte en rana en la metamorfosis, las células de la cola mueren, y la cola, que no se necesita en la rana, desaparece (**Figura 18–3**). En muchas otras ocasiones, la muerte celular contribuye a regular el número de células. Por ejemplo, durante el desarrollo del sistema nervioso, la muerte celular ajusta el número de neuronas igualándolo al número de células diana inervadas por las neuronas, como se estudiará más adelante.

La muerte celular programada también actúa como un sistema de control de calidad en el desarrollo, eliminando las células que son anormales, inapropiadas, no funcionales o peligrosas en potencia para el animal. Existen ejemplos significativos en el sistema inmunitario adquirido de los vertebrados, donde la apoptosis elimina los linfocitos B y T en desarrollo incapaces de producir receptores antígeno-específicos potencialmente útiles o que producen receptores autorreactivos que hacen a las células peligrosas; también elimina la mayoría de los linfocitos que se activan por una infección, después de que hayan colaborado en la destrucción de los microbios responsables (se trata en el Capítulo 25).

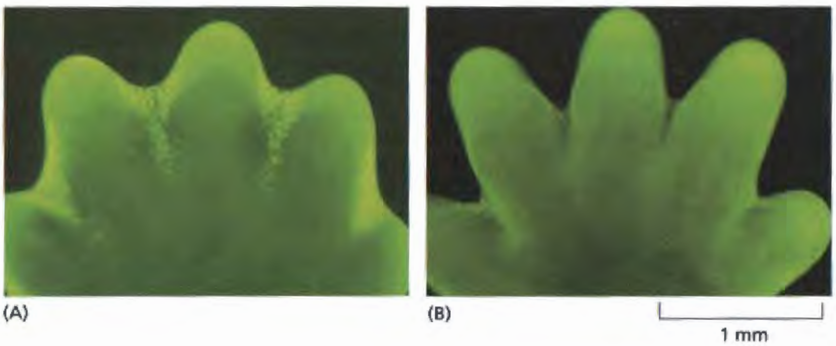


Figura 18–2 Moldeamiento de los dedos mediante apoptosis durante el desarrollo de las patas del ratón. (A) La pata de este feto de ratón se ha teñido con un colorante que marca específicamente las células que han experimentado apoptosis. Las células apoptóticas aparecen como puntos de color *verde claro* entre los dedos en desarrollo. (B) La muerte celular ha eliminado el tejido que hay entre los dedos en desarrollo, como se aprecia un día después, cuando quedan muy pocas células apoptóticas. (De W. Wood et al., *Development* 127:5245-5252, 2000. Con la autorización de The Company of Biologists.)

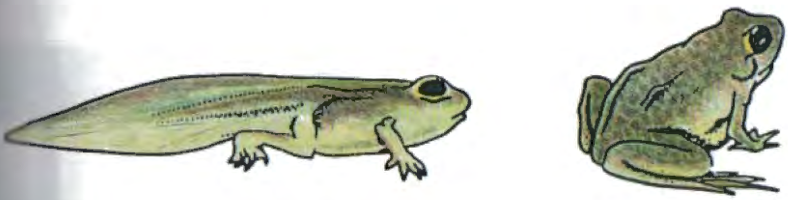


Figura 18–3 Apoptosis durante la metamorfosis de un renacuajo en rana. Cuando un renacuajo se transforma en rana, las células de la cola del renacuajo son inducidas a sufrir apoptosis; como consecuencia de ello, se pierde la cola. El aumento de la concentración sanguínea de la hormona tiroidea provoca los cambios que se producen durante la metamorfosis, incluida la apoptosis en la cola.

En los tejidos adultos que no están creciendo ni reduciéndose, la muerte celular y la división celular tienen que ser reguladas con precisión para asegurar que estén exactamente equilibradas. Si a una rata adulta se le extirpa parte del hígado, la proliferación de las células hepáticas aumenta, compensando la pérdida de células, y si una rata es tratada con fenobarbital –que estimula la división de las células hepáticas (y el aumento de tamaño)– y después se retira el tratamiento, la apoptosis se incrementa en el hígado hasta que éste recupera su tamaño original, por lo general en menos de una semana. Así, el hígado mantiene un tamaño constante regulando tanto el ritmo de la muerte celular como la velocidad a la que nacen sus células, aunque se desconocen los mecanismos de control responsables de esta regulación.

La apoptosis tiene lugar a una gran velocidad en la médula ósea roja de una persona adulta, donde se producen la mayoría de las células sanguíneas. Por ejemplo, en la médula ósea roja se producen de forma continua muchísimos *neutrófilos* (un tipo de leucocito que se estudia en el Capítulo 23), pero la inmensa mayoría de ellos muere por apoptosis en la propia médula ósea roja a los pocos días sin haber desempeñado su función. Este ciclo, aparentemente inútil de producción y destrucción, sirve para mantener un suministro inmediato de neutrófilos de vida efímera, que pueden movilizarse rápidamente para combatir una infección en cualquier parte del cuerpo. Si se comparan con la vida del organismo, es evidente que las células son baratas.

Las células animales pueden reconocer el daño en sus diferentes orgánulos y, si es lo bastante grande, pueden autoeliminarse por apoptosis. Un ejemplo significativo es el daño en el DNA, el cual puede producir mutaciones que provocan cáncer si no se repara. Las células disponen de diversos mecanismos para detectar el daño en el DNA, y, si no lo pueden reparar, se autoeliminan mediante apoptosis.

Las células apoptóticas se reconocen bioquímicamente

Las células que experimentan apoptosis no sólo tienen una morfología característica sino que además manifiestan cambios bioquímicos singulares, que se pueden utilizar para identificarlas. Por ejemplo, durante la apoptosis, una endonucleasa escinde el DNA cromosómico en fragmentos de tamaños característicos; dado que las escisiones se producen en las regiones internucleosomales, los fragmentos se separan en un típico patrón en escalera cuando se analizan mediante electroforesis en gel (**Figura 18–4**A). Además, la fragmentación del DNA genera muchos nuevos extremos de DNA, los cuales se pueden marcar en los núcleos apoptóticos utilizando un nucleótido marcado en la llamada técnica TUNEL (Figura 18–4B).

En la membrana plasmática de las células apoptóticas se produce un cambio muy importante. Normalmente, el fosfolípido con carga negativa *fosfatidilserina* sólo se localiza en la cara citosólica de la bicapa lipídica de la membrana plasmática (véase Figuras 10–3 y 10–16), pero se transloca a la monocapa externa en las células apoptóticas, donde se puede utilizar como marcador de estas células. La fosfatidilserina de la superficie de las células apoptóticas se puede visualizar con una forma marcada de la *Anexina V*, que se une de forma específica a este fosfolípido. Para los biólogos, la fosfatidilserina de la superficie celular es más que un práctico marcador de apoptosis; actúa como una señal que induce a las células vecinas y a los macrófagos a fagocitar la célula muerta. Además de actuar como una señal que indica "cómeme", también bloquea la inflamación a menudo asociada a la fagocitosis: la endocitosis de las células apoptóticas dependiente de la fosfatidilserina inhibe la producción de proteínas de señalización proinflamatorias (citoquinas) por la célula fagocítica.

Los macrófagos fagocitan la mayoría de tipos de pequeñas partículas, incluyendo gotitas lipídicas y cuentas de cristal, pero no fagocitan ninguna célula sana en el animal, supuestamente porque las células sanas expresan en su superficie moléculas señal que indican "no me comas". Así, además de expresar señales en la superficie celular que indican "cómeme" como la fosfatidilserina que estimula la apoptosis, las células apoptóticas tienen que perder o inactivar las señales que indican "no me comas" para que los macrófagos las ingieran.

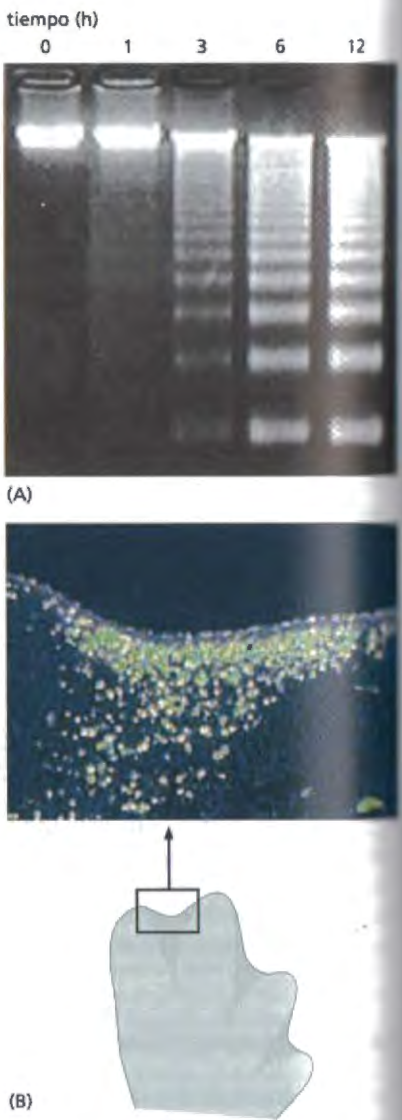


Figura 18–4 Marcadores de apoptosis. (A) Rotura del DNA nuclear que forma un patrón característico de fragmentos en escalera. Se trataron linfocitos procedentes de timo de ratón con un anticuerpo contra el receptor de muerte Fas de la superficie celular (se describe más adelante), para inducir a que las células experimenten apoptosis. Después de varios intervalos de tiempo (indicados en horas en la parte superior de la figura), se extrajo el DNA, se separaron los fragmentos por tamaño mediante electroforesis en un gel de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio. (B) Se utilizó la técnica TUNEL para marcar los extremos cortados de los fragmentos de DNA de los núcleos de las células apoptóticas en una sección tisular de una pata de un embrión de pollo en desarrollo; esta sección transversal a través de la piel y del tejido subyacente es de una región entre dos dedos en desarrollo, como se indica en el dibujo subyacente. El procedimiento se denomina técnica TUNEL (***T****dT-mediated d****U****TP* ***n****ick* ***e****nd* ***l****abeling*) porque la enzima transferasa terminal de desoxinucleótidos (TdT) añade cadenas de desoxinucleótidos (dUTP) marcados a los extremos 3'-OH de los fragmentos de DNA. (A, de D. McIlroy et al., *Genes Dev.* 14:549-558, 2000. Con la autorización de Cold Spring Harbor Laboratory Press; B, de V. Zuzarte-Luis y J.M. Hurlé, *Int. J. Dev. Biol.* 46:871-876, 2002. Con la autorización de UBC Press.)

Las células que experimentan apoptosis con frecuencia pierden el potencial eléctrico que por lo general existe a través de la membrana interna de sus mitocondrias (véase Capítulo 14). Este potencial de membrana se puede medir utilizando colorantes fluorescentes cargados positivamente que se acumulan en las mitocondrias, conducidos por la carga negativa del interior de la membrana interna. Una disminución del marcaje de las mitocondrias con estos colorantes ayuda a identificar las células que están experimentando apoptosis. Como describiremos más adelante, proteínas como el *citocromo c* son normalmente liberadas desde el espacio entre la membrana interna y externa (el *espacio intermembrana*) de las mitocondrias durante el proceso de apoptosis, de forma que la reubicación del citocromo *c* de las mitocondrias al citosol puede utilizarse como otro marcador de apoptosis (véase Fi-gura 18–7).

La apoptosis depende de una cascada proteolítica intracelular mediada por caspasas

La maquinaria intracelular responsable de la apoptosis es similar en todas las células animales. Depende de una familia de proteasas que contienen una cisteína en su sitio activo y que escinden sus proteínas diana sobre residuos específicos de ácido aspártico. Por ese motivo, reciben el nombre de **caspasas** (*c* de cisteína y *asp* de ácido aspártico). Éstas se sintetizan en la célula como precursores inactivos o **procaspasas**, los cuales son activados por lo general por escisión proteolítica. La escisión de las procaspasas se produce en uno o dos residuos de ácido aspártico específicos y es catalizada por otras caspasas (ya activas); la procaspasa es escindida en dos subunidades, una grande y otra pequeña, que forman un heterodímero, y dos de estos dímeros se ensamblan formando el tetrámero activo (**Figura 18–5**A). Una vez activadas, las caspasas escinden y activan otras procaspasas, generando una cascada proteolítica amplificadora (Figura 18–5B).

No todas las caspasas median la apoptosis. En efecto, la primera caspasa que se identificó fue una proteína humana denominada *enzima convertidora de interleuquina-1* (*ICE*: ***i****n*-*terleukin-1-****c****onverting* ***e****nzyme*), la cual se asocia con respuestas inflamatorias en vez de con muerte celular; la ICE libera la citoquina proinflamatoria *interleuquina-1 (IL1)* a partir de una proteína precursora más grande. Con posterioridad al descubrimiento de la ICE, se determinó que un gen necesario para la apoptosis en *C. elegans* codifica una proteína que se asemeja estructural y funcionalmente a la ICE, proporcionando la primera evidencia de que la proteolisis y las caspasas están implicadas en la apoptosis. Ahora se sabe que varias caspasas humanas participan en las respuestas inflamatorias e inmunitarias, pero que la mayoría de ellas están implicadas en la apoptosis (**Tabla 18–1**).

Como se muestra en la Figura 18–5B y en la Tabla 18–1, algunas de las procaspasas que intervienen en la apoptosis actúan al inicio de la cascada proteolítica y se llaman **procaspasas iniciadoras**; cuando se activan, escinden y activan **procaspasas ejecutoras**, que escinden y activan otras procaspasas ejecutoras así como *proteínas diana* específicas de la célula. Entre las numerosas proteínas diana escindidas por las caspasas ejecutoras se encuentran las laminas nucleares (véase Figura 18–5B), cuya escisión provoca la desorganización irreversible de la lámina nuclear (véase Capítulo 16). Otra diana es una proteína que por lo general mantiene inhibida la enzima que degrada el DNA antes mencionada (una endonucleasa); su pro-

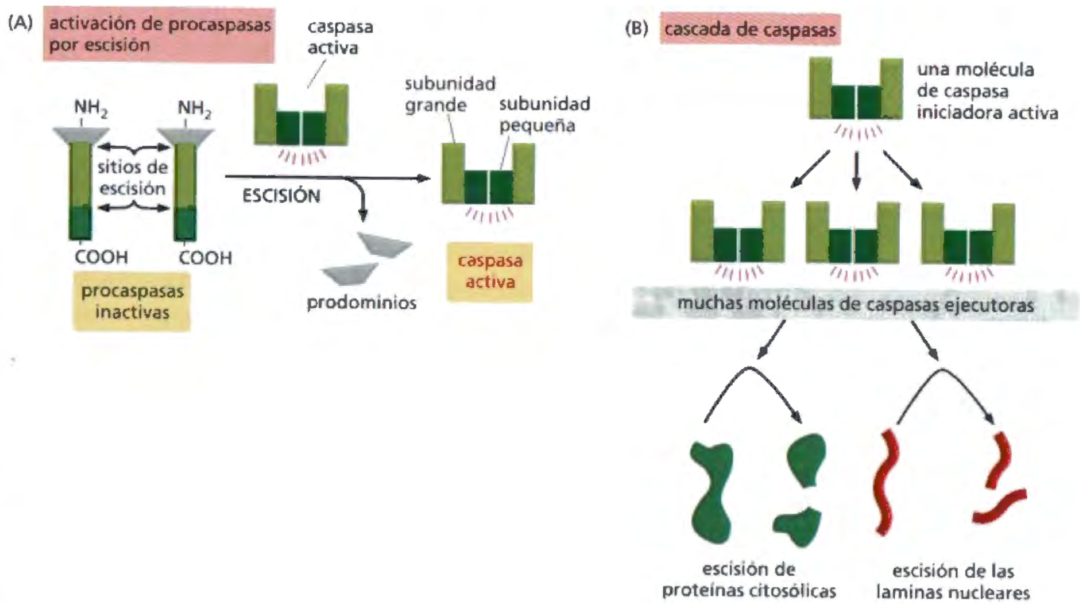


Figura 18–5 Activación de las procaspasas durante la apoptosis. (A) Cada caspasa se sintetiza inicialmente en forma de proenzima inactiva (procaspasa). Algunas procaspasas se activan mediante escisión proteolítica llevada a cabo por una caspasa activada: dos fragmentos escindidos de dos moléculas de procaspasa se asocian entre sí formando una caspasa activa, que es un tetrámero de dos subunidades pequeñas y dos subunidades grandes; los prodominios normalmente se descartan, como se indica. (B) Las primeras procaspasas que se activan se llaman *procaspasas iniciadoras*, las cuales escinden y activan muchas moléculas de *procaspasas ejecutoras*, produciendo una reacción en cadena amplificadora (una cascada proteolítica de caspasas). A continuación las caspasas ejecutoras escinden proteínas clave de la célula, incluidas determinadas proteínas citosólicas y las laminas nucleares, como se muestra aquí, lo que conduce a la muerte controlada de la célula. Aunque no se muestra, las procaspasas iniciadoras se activan mediante proteínas adaptadoras que mantienen las procaspasas en estrecha proximidad en un complejo de activación; las procaspasas iniciadoras se escinden una a la otra en el complejo, pero la escisión sólo estabiliza la proteasa activa.

...ds libera la endonucleasa que fragmentará el DNA del núcleo de la célula. Otras proteínas diana incluyen componentes del citoesqueleto y proteínas de adhesión célula-célula que unen las células a sus vecinas; la escisión de estas proteínas contribuye a que la célula apoptótica se redondee y se separe de las células vecinas, facilitando que una célula adyacente sana la endocite o, en el caso de una célula epitelial, que las células vecinas la extruyan de la capa celular. La cascada de caspasas no sólo es destructiva y autoamplificante sino irreversible, de modo que una vez que la célula ha alcanzado un punto crítico de la vía de destrucción ya no puede volver atrás.

Las caspasas necesarias para la apoptosis varían en función del tipo celular y del estímulo. La inactivación del gen de ratón que codifica la caspasa-3, una caspasa ejecutora, reduce la apoptosis normal en el cerebro en desarrollo. Como consecuencia de ello, el ratón a menudo muere poco después del nacimiento, con un cerebro deformado que contiene demasiadas células. Sin embargo, la apoptosis se produce con normalidad en muchos otros órganos de ese ratón.

Desde las primeras etapas del desarrollo de un animal, las células sanas fabrican constantemente procaspasas y otras proteínas necesarias para la apoptosis. Así, la maquinaria de la apoptosis está siempre preparada; todo lo que se necesita para activarla es un estímulo. Entonces, ¿cómo se inicia la cascada de caspasas? En particular, ¿cómo se activa la primera procaspasa de la cascada? Las procaspasas iniciadoras contienen un *prodominio* largo que contiene un *dominio de reclutamiento de caspasas* (*CARD*: ***caspase recruitment domain***) que les permite ensamblarse con proteínas adaptadoras en *complejos de activación* cuando la célula recibe una señal inductora de apoptosis. Una vez incorporadas en uno de estos complejos, las procaspasas iniciadoras se mantienen en estrecha proximidad, lo que es suficiente para que se activen; entonces, se escinden una a otra haciendo que el proceso sea irreversible. Después, las caspasas iniciadoras activadas escinden y activan procaspasas ejecutoras, iniciando así una cascada proteolítica de caspasas que amplifica la señal de muerte y la propaga por toda la célula.

Las dos vías de señalización mejor comprendidas que pueden activar una cascada de caspasas, que desencadene apoptosis en células de mamífero, son la *vía extrínseca* y la *vía intrínseca*. Cada vía utiliza sus propias procaspasas iniciadoras y complejo de activación, como se describirá a continuación.

Tabla 18–1 Algunas caspasas humanas

Caspasas implicadas en inflamación	caspasas 1 (ICE), 4, 5
Caspasas implicadas en apoptosis	
Caspasas iniciadoras	caspasas 2, 8, 9, 10
Caspasas ejecutoras	caspasas 3, 6, 7

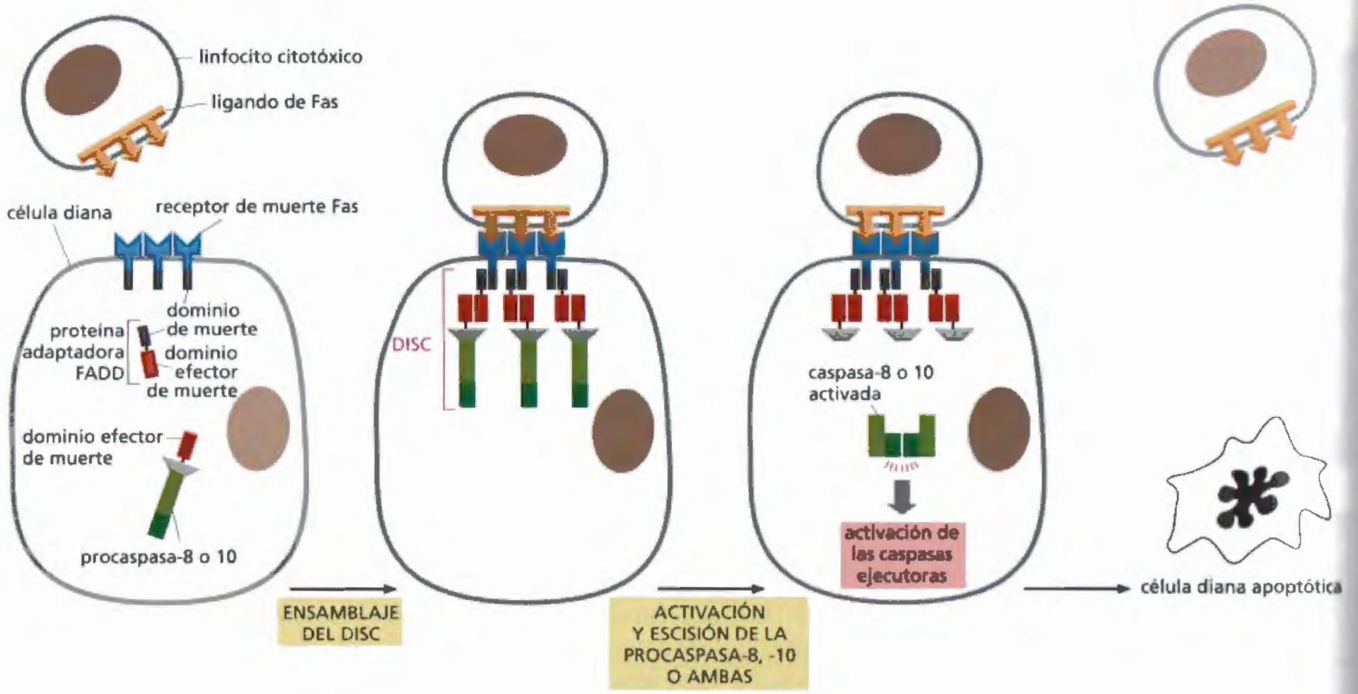


Figura 18–6 La vía extrínseca de la apoptosis se activa a través de los receptores de muerte Fas. El ligando Fas de la superficie de un linfocito citotóxico activa los receptores de muerte Fas de la superficie de la célula diana. Tanto el ligando como el receptor son homotrímeros. Entonces, la cola citosólica de Fas recluta a la proteína adaptadora FADD a través del dominio de muerte de cada proteína (FADD: *fas-associated death domain*; dominio de muerte asociado a Fas). Después, cada proteína FADD recluta una procaspasa iniciadora (procaspasa-8, procaspasa-10, o ambas) a través de un dominio efector de muerte presente tanto en FADD como en la procaspasa, formando un complejo de señalización inductor de muerte (DISC). En el DISC, las moléculas de procaspasa iniciadoras se encuentran en estrecha proximidad, lo que las activa; las procaspasas activadas se escinden una a otra y estabilizan a la proteasa activada, la cual ahora es una caspasa. La caspasa-8 y la caspasa-10 activadas escinden y activan las procaspasas ejecutoras, lo que produce una cascada de caspasas que conduce a la apoptosis.

Los receptores de muerte de la superficie celular activan la vía extrínseca de la apoptosis

La unión de proteínas de señalización extracelulares a **receptores de muerte** de la superficie celular activa la **vía extrínseca** de la apoptosis. Los receptores de muerte son proteínas transmembrana que contienen un dominio de unión al ligando, un único dominio transmembrana y un *dominio de muerte* intracelular, necesario para que los receptores activen el programa apoptótico. Los receptores son homotrímeros y pertenecen a la familia de *receptores del factor de necrosis tumoral* (*TNF*: *tumor necrosis factor*), que incluye el receptor del propio TNF (véase Capítulo 15) y el receptor de muerte *Fas*. Los ligandos que activan los receptores de muerte también son homotrímeros; son estructuralmente homólogos entre sí y pertenecen a la *familia del TNF* de proteínas de señalización.

Un ejemplo bien conocido de cómo los receptores de muerte desencadenan la vía extrínseca de la apoptosis, es la activación de **Fas** en la superficie de la célula diana por el **ligando Fas** de la superficie de un linfocito citotóxico (véase Capítulo 25). Cuando Fas se activa por la unión del ligando Fas, los dominios de muerte de las colas citosólicas de los receptores de muerte Fas reclutan proteínas adaptadoras intracelulares, las cuales a su vez reclutan procaspasas iniciadoras (*procaspasa-8*, *procaspasa-10*, o ambas), formando el **complejo de señalización inductor de muerte** (**DISC**: *death-inducing signaling complex*). Las caspasas iniciadoras, una vez activadas en el DISC, activan las siguientes procaspasas ejecutoras de la cascada induciendo la apoptosis (**Figura 18–6**). Como trataremos más adelante, en algunas células la vía extrínseca tiene que reclutar a la vía intrínseca de la apoptosis para amplificar la cascada de caspasas con el objeto de matar a la célula.

Muchas células producen proteínas inhibidoras que actúan de forma extracelular o intracelular inhibiendo la vía extrínseca. Por ejemplo, algunas células producen *receptores señuelo* de superficie celular que tienen un dominio de unión al ligando pero no un dominio de muerte; dado que se pueden unir a un ligando de muerte, pero que no pueden activar la apoptosis, los receptores señuelo inhiben competitivamente los receptores de muerte. Las células también pueden producir proteínas bloqueantes intracelulares como *FLIP*, que se parece a una procaspasa iniciadora, pero carece del dominio proteolítico. FLIP compite con la procaspasa-8 y la procaspasa-10 por los sitios de unión en el DISC y así inhibe la activación de estas procaspasas iniciadoras. Estos mecanismos inhibidores ayudan a evitar la activación inapropiada de la vía extrínseca de la apoptosis.

En algunas circunstancias, los receptores de muerte activan otras vías de señalización intracelular que no conducen a la apoptosis. Los receptores del TNF, por ejemplo, también pueden activar la vía de NFκB (véase Capítulo 15), que puede estimular la supervivencia ce-

lular y activar genes implicados en respuestas inflamatorias. El tipo de respuestas que dominan en cada caso depende del tipo celular y de las otras señales que actúen.

La vía intrínseca de la apoptosis depende de las mitocondrias

Las células también pueden activar su programa de apoptosis desde dentro de la célula, normalmente en respuesta a una lesión u otras formas de estrés, como el daño en el DNA o la falta de oxígeno, de nutrientes o de señales de supervivencia extracelulares (se describe más adelante). En las células de los vertebrados, esta forma de activación intracelular del programa apoptótico de muerte, se produce a través de la **vía intrínseca** de la apoptosis, la cual depende de la liberación en el citosol de proteínas mitocondriales que por lo general residen en el espacio intermembrana de estos orgánulos (véase Figura 12–21A). Algunas de las proteínas liberadas activan una cascada proteolítica de caspasas en el citoplasma que desencadena la apoptosis.

Una proteína crucial que se libera de las mitocondrias en la vía intrínseca es el **citocromo *c***, un componente de la cadena de transporte de electrones mitocondrial soluble en agua. Cuando es liberado al citosol (**Figura 18–7**), desempeña una función totalmente diferente: se une a una proteína adaptadora, activadora de procaspasas denominada **Apaf1** (*apoptotic protease activating factor*-**1**; *factor activador de proteasas apoptóticas-1*), provocando la oligomerización de Apaf1 en una estructura heptamérica semejante a una rueda que recibe el nombre de **apoptosoma**. En el apoptosoma, las proteínas Apaf1 reclutan moléculas de procaspasa iniciadora (*procaspasa-9*), que se activan por su estrecha cercanía en el apoptosoma, del mismo modo que se activan las moléculas de procaspasa-8 y -10 en el DISC. Después, las moléculas de caspasa-9 activadas proceden a activar las siguientes procaspasas ejecutoras de la cadena induciendo la apoptosis (**Figura 18–8**).

Como se ha señalado, en algunas células, la vía extrínseca tiene que reclutar a la vía intrínseca para amplificar la señal apoptótica que mate a la célula; este proceso requiere la activación de un miembro de la familia de proteínas *Bcl2*, como se explicará todo seguido.

Las proteínas Bcl2 regulan la vía intrínseca de la apoptosis

La vía intrínseca de la apoptosis está estrechamente regulada asegurando que la célula se autoelimina sólo cuando es apropiado. Una clase importante de reguladores intracelulares de la apoptosis es la familia de proteínas **Bcl2** que, como la familia de las caspasas, se

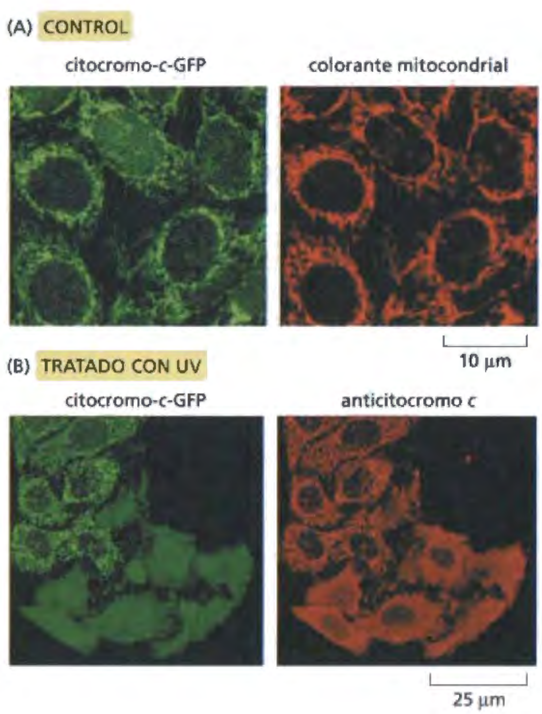


Figura 18–7 Liberación del citocromo *c* de las mitocondrias durante la apoptosis. Micrografías de fluorescencia de células cancerosas humanas en cultivo. (A) Se transfectaron células control con un gen que codifica una proteína de fusión consistente en el citocromo *c* unido a la proteína fluorescente verde (citocromo-*c*-GFP); las células también se trataron con un colorante rojo cargado positivamente que se acumula en las mitocondrias. La distribución solapada del *verde* y el *rojo* indica que el citocromo-*c*-GFP se localiza en las mitocondrias. (B) Se irradiaron células que expresaban el citocromo-*c*-GFP con luz ultravioleta para inducir apoptosis y después de 5 horas se tiñeron con anticuerpos (en *rojo*) contra el citocromo *c*; el citocromo-*c*-GFP también se muestra (en *verde*). Las seis células de la mitad inferior de las micrografías en B han liberado sus citocromos *c* de las mitocondrias al citosol, mientras que las células situados en la mitad superior de las micrografías todavía no lo han hecho. (De J.C. Goldstein et al., *Nat. Cell Biol.* 2: 156-162, 2000. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

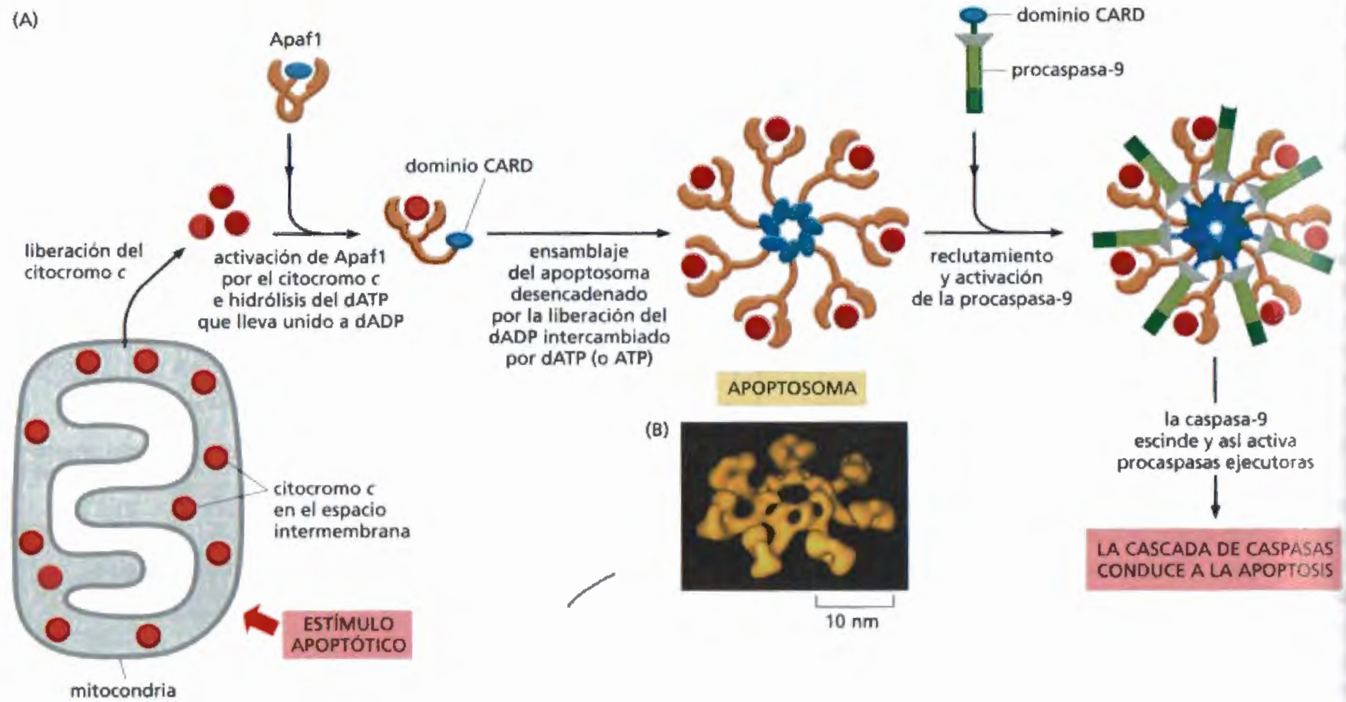


Figura 18–8 La vía intrínseca de la apoptosis. (A) Dibujo esquemático que ilustra cómo el citocromo *c*, que se libera de las mitocondrias, activa Apaf1. La unión del citocromo *c* hace que Apaf1 hidrolice el dATP que lleva unido a dADP (no se muestra). La posterior sustitución del dADP por dATP o ATP (no se muestra) induce que se agregue el complejo generando por Apaf1 y el citocromo *c* formando el apoptosoma, un gran complejo heptamérico que recluta la procaspasa-9 a través del dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) de cada proteína. Las moléculas de procaspasa-9 se activan en el apoptosoma y ahora pueden escindir y activar procaspasas ejecutoras, lo que conduce a la escisión y activación de estas moléculas en una cascada de caspasas. No se muestran otras proteínas liberadas del espacio intermembrana mitocondrial. (B) Modelo de la estructura tridimensional de un apoptosoma. Algunos científicos utilizan el término "apoptosoma" para referirse al complejo que también contiene la procaspasa-9. (B, de D. Aceham et al., *Mol. Cell* 9:423-432, 2002. Con la autorización de Elsevier.)

ha conservado durante la evolución desde los gusanos hasta los humanos; una proteína Bcl2 humana, por ejemplo, puede inhibir la apoptosis cuando es expresada en *C. elegans*.

Las proteínas Bcl2 de mamíferos regulan la vía intrínseca de la apoptosis controlando la liberación del citocromo *c* y de otras proteínas mitocondriales intermembrana al citosol. Algunas proteínas Bcl2 son *proapoptóticas* y estimulan la apoptosis aumentando la liberación, mientras que otras son *antiapoptóticas* e inhiben la apoptosis bloqueando la liberación. Las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas Bcl2 se pueden unir entre sí en varias combinaciones y formar heterodímeros en los que las dos proteínas se inhiben mutuamente. El equilibrio entre las actividades de estas dos clases funcionales de proteínas Bcl2 determina en gran parte si una célula de mamífero vive o muere por la vía intrínseca de la apoptosis.

Como se ilustra en la **Figura 18–9**, las proteínas antiapoptóticas Bcl2, incluidas la propia *Bcl2* (el miembro fundador de la familia Bcl2) y *Bcl-X$_L$*, comparten cuatro *dominios de homología Bcl2 (BH)* diferentes (BH1-4). Las proteínas proapoptóticas Bcl2 comprenden dos subfamilias: las proteínas *BH123* y las proteínas "*sólo BH3*". Las principales proteínas BH123 son *Bax* y *Bak*, similares estructura a Bcl2 pero que carecen del dominio BH4. Las proteínas "sólo BH3" únicamente comparten homología de secuencia con Bcl2 en el dominio BH3 (véase Figura 18–9).

Cuando un estímulo apoptótico desencadena la vía intrínseca, las **proteínas BH123** proapoptóticas se activan y se agregan formando oligómeros en la membrana mitocondrial externa e induciendo la liberación del citocromo *c* y de otras proteínas intermembrana mediante un mecanismo desconocido (**Figura 18–10**). En células de mamífero, **Bax** y **Bak** son las principales proteínas BH123 y al menos una de ellas es necesaria para que la vía intrínseca de la apoptosis funcione: células mutantes de ratón que carecen de ambas proteínas son resistentes a todas las señales proapoptóticas que por lo general activan esta vía. Mientras que Bak está fuertemente unida a la membrana mitocondrial externa, incluso en ausencia de una señal apoptótica, Bax se localiza sobre todo en el citosol y sólo se transloca a la mitocondria si una señal apoptótica la activa. Como trataremos a continuación, la activación de Bax y de Bak depende de las proteínas proapoptóticas "sólo BH3" activadas. Tanto Bax como Bak también actúan en la superficie de las membranas del retículo endoplasmático (ER) y del núcleo; se cree que cuando se activan en respuesta al estrés del ER, liberan Ca^{2+} del ER al citosol, que contribuye a la activación de la vía intrínseca de la apoptosis dependiente de la mitocondria mediante un mecanismo no del todo conocido.

Las **proteínas antiapoptóticas Bcl2** como la propia **Bcl2** y **Bcl-X$_L$** también se localizan en la superficie citosólica de la membrana mitocondrial externa, del ER y de la envuelta nuclear, donde ayudan a conservar la integridad de la membrana, por ejemplo, impidiendo la

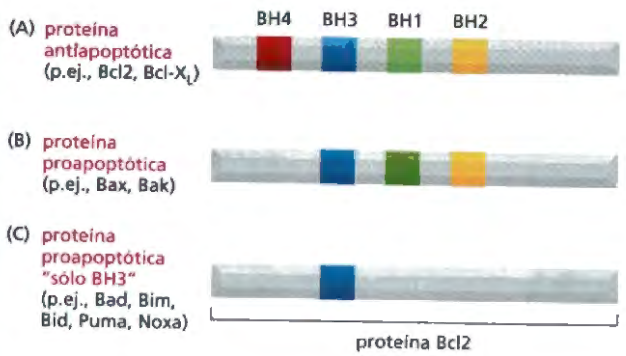


Figura 18–9 Las tres clases de proteínas Bcl2. Nótese que el dominio BH3 es el único dominio BH compartido por todos los miembros de la familia Bcl2. El dominio BH3 media las interacciones directas entre los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia.

inapropiada liberación de proteínas intermembrana de la mitocondria y de Ca^{2+} del ER. Estas proteínas inhiben la apoptosis principalmente al unirse e inhibir proteínas proapoptóticas Bcl2 en estas membranas o en el citosol. En la membrana mitocondrial externa, por ejemplo, se unen a Bak e impiden que oligomerice, inhibiendo así la liberación del citocromo *c* y de otras proteínas intermembrana. En mamíferos, existen al menos cinco proteínas antiapoptóticas Bcl2 y cada célula de mamífero necesita al menos una para sobrevivir. Además, algunas de estas proteínas tienen que ser inhibidas para que la vía intrínseca induzca la apoptosis; las proteínas "sólo BH3" median la inhibición.

Las **proteínas "sólo BH3"** son la mayor subclase de la familia de proteínas Bcl2. La célula las sintetiza o las activa en respuesta a un estímulo apoptótico y se cree que inducen la apoptosis inhibiendo las proteínas antiapoptóticas Bcl2. Su dominio BH3 se une a un largo surco hidrofóbico de las proteínas antiapoptóticas Bcl2 y neutraliza su actividad. Mediante un mecanismo no del todo conocido, esta unión e inhibición permite la agregación de Bax y Bak en la superficie de la mitocondria, lo cual desencadena la liberación de las proteínas mitocondriales intermembrana que inducen la apoptosis (**Figura 18–11**). Algunas proteínas "sólo BH3" se pueden unir de forma directa a Bax y Bak para contribuir a la activación y agregación de estas proteínas proapoptóticas BH123 en la mitocondria y ayudar a liberar las proteínas intermembrana.

Las proteínas "sólo BH3" proporcionan el vínculo crucial entre el estímulo apoptótico y la vía intrínseca de la apoptosis, con diferentes estímulos que activan distintas proteínas "sólo BH3". Por ejemplo, cuando a algunas células se las priva de señales de supervivencia extracelulares, una vía de señalización intracelular que depende de la MAP-quinasa *JNK*, activa la transcripción del gen que codifica la proteína "sólo BH3" *Bim*, que a su vez activa la vía intrínseca. Asimismo, en respuesta al daño en el DNA que no puede ser reparado, la proteína supresora de tumores **p53** se acumula (se trata en los Capítulos 17 y 20) y activa la transcripción de genes que codifican las proteínas "sólo BH3" *Puma* y *Noxa*; estas proteínas "sólo BH3" inducen la vía intrínseca, eliminando así una célula potencialmente peligrosa que en caso contrario pudiera convertirse en cancerosa.

Como se ha mencionado, en algunas células la vía apoptótica extrínseca recluta a la vía intrínseca amplificando la cascada de caspasas que mata a la célula. La proteína "sólo BH3"

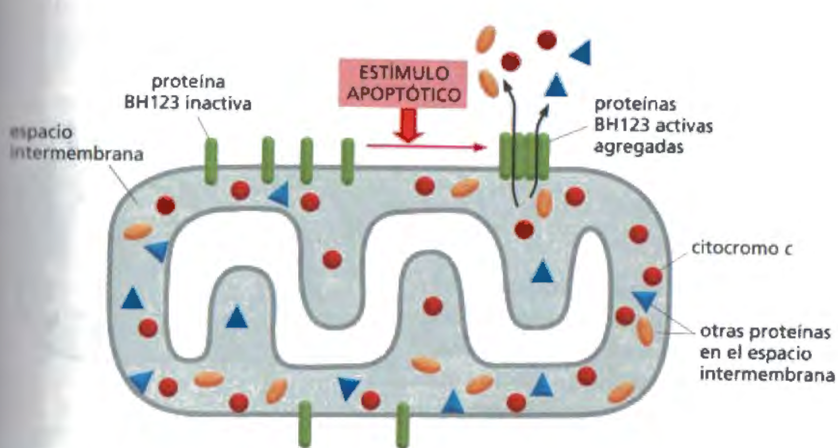


Figura 18–10 El papel de las proteínas Bcl2 proapoptóticas BH123 (principalmente Bax y Bak) en la liberación de proteínas intermembrana mitocondriales en la vía intrínseca de la apoptosis. Cuando se activan por un estímulo apoptótico, las proteínas BH123 se agregan en la membrana mitocondrial externa y liberan el citocromo *c* y otras proteínas del espacio intermembrana al citosol mediante un mecanismo desconocido.

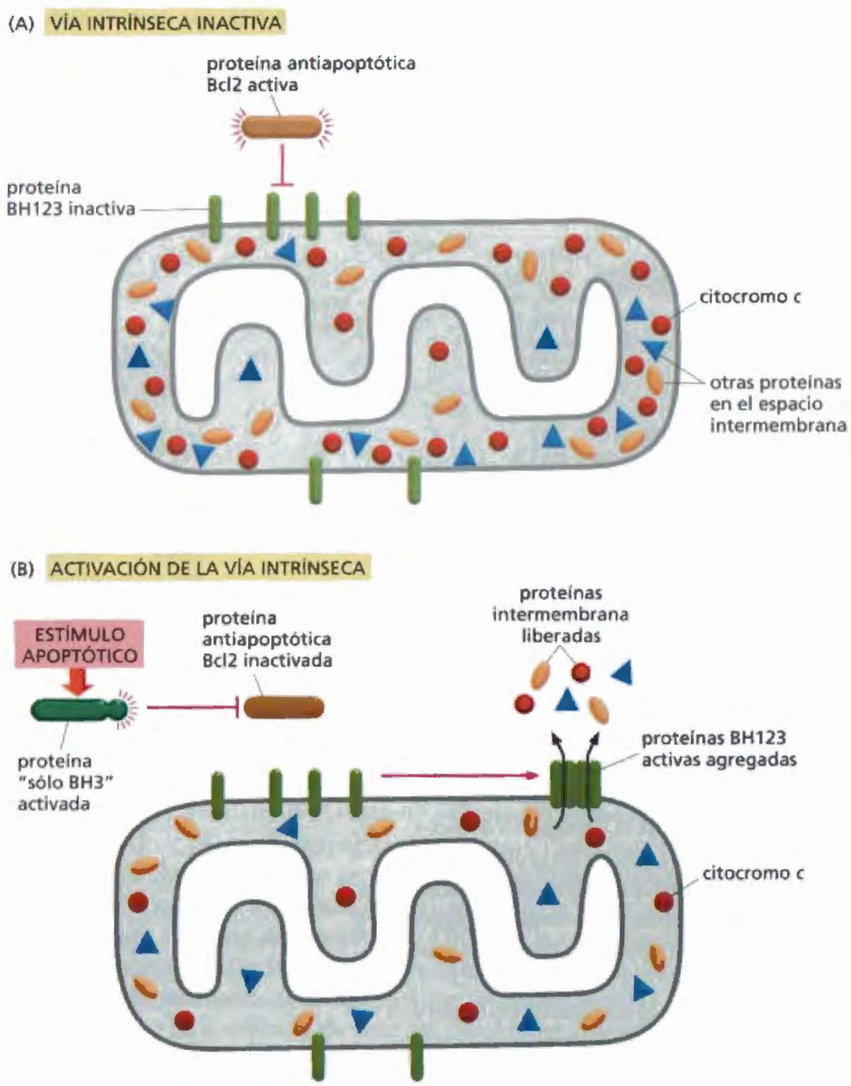


Figura 18–11 La regulación mediante las proteínas proapoptóticas "sólo BH3" y antiapoptóticas Bcl2 de la vía intrínseca d la apoptosis. (A) En ausencia de un estímul apoptótico, las proteínas antiapoptóticas B se unen e inhiben las proteínas BH123 en la membrana mitocondrial externa (y en el citosol; no se muestra). (B) En presencia de estímulo apoptótico, las llamadas proteínas "sólo BH3" se activan y se unen a las protein antiapoptóticas Bcl2 de manera que ya no pueden inhibir a las proteínas BH123, que se activan y se agregan en la membrana mitocondrial externa y estimulan la liberaci de las proteínas intermembrana mitocondriales al citosol. Algunas proteínas "sólo BH3" activadas pueden estimular la liberación de proteínas mitocondriales más directamente uniéndose y activando proteínas BH123. Aunque no se muestra, la proteínas antiapoptóticas Bcl2 están unida a la superficie mitocondrial.

Bid es el vínculo entre las dos vías. Cuando los receptores de muerte activan la vía extrínseca en estas células, la caspasa iniciadora, caspasa-8, escinde Bid y produce una forma truncada de Bid llamada *tBid*. tBid se transloca a la mitocondria, donde inhibe proteínas antiapoptóticas Bcl2 e induce la agregación de proteínas proapoptóticas BH123 liberando el citocromo *c* y otras proteínas intermembrana, amplificando de este modo la señal de muerte.

Las proteínas "sólo BH3" Bid, Bim y Puma (véase Figura 18–9) pueden inhibir todas las proteínas antiapoptóticas Bcl2, mientras que las otras proteínas "sólo BH3" únicamente pueden inhibir un pequeño subconjunto de proteínas antiapoptóticas. Así, Bid, Bim y Puma son los activadores más potentes de la subfamilia "sólo BH3" de proteínas Bcl2.

Las proteínas Bcl2 no son los únicos reguladores de la apoptosis. Las proteínas IAP (***in**hibitors of **ap**optosis*; inhibidor de apoptosis) también desempeñan una función importante en la inhibición de la apoptosis, especialmente en *Drosophila*.

Los IAP inhiben las caspasas

Los **inhibidores de la apoptosis** (**IAP**) se identificaron por primera vez en ciertos virus de insectos (baculovirus), que codifican proteínas IAP impidiendo que una célula huésped infectada por el virus se autoelimine mediante apoptosis. (Con frecuencia las células animales infectadas por virus se autoeliminan para evitar que el virus pueda replicarse e infecte a otras células.) En la actualidad se conoce que la mayoría de las células animales también sintetizan proteínas IAP.

Los IAP tienen uno o más dominios BIR (***baculovirus IAP repeat***; repetición IAP del baculovirus), que les permite unirse e inhibir las caspasas activadas. Algunos IAP también poliubiquitinizan caspasas, marcándolas para su destrucción en los proteosomas. De esta manera, los IAP establecen un umbral inhibidor que las caspasas activadas tienen que superar para desencadenar la apoptosis.

Al menos en *Drosophila*, la barrera inhibidora que proporcionan los IAP se puede neutralizar mediante proteínas **anti-IAP**, que se sintetizan en respuesta a varios estímulos apoptóticos. En las moscas hay cinco anti-IAP, incluidas *Reaper*, *Grim* y *Hid*; su única similitud estructural es su corto motivo N-terminal de unión a los IAP, que se une al dominio BIR de los IAP, impidiendo que el dominio se una a una caspasa. La eliminación de los tres genes que codifican Reaper, Grim y Hid bloquea la apoptosis en moscas. En cambio, la inactivación de uno de los dos genes que codifican los IAP en *Drosophila* provoca que todas las células del embrión de mosca en desarrollo experimenten apoptosis. Como es evidente, el balance entre los IAP y las anti-IAP está estrechamente regulado y es crucial en el control de la apoptosis en las moscas.

En mamíferos, el papel de las proteínas anti-IAP en la apoptosis es más controvertido. Como se ilustra en la **Figura 18–12**, las anti-IAP se liberan desde el espacio intermembrana mitocondrial cuando se activa la vía intrínseca de la apoptosis, bloqueando los IAP en el citosol y estimulando así la apoptosis. Sin embargo, cuando los genes que codifican dos conocidas anti-IAP de mamíferos denominadas *Smac* (también llamada *DIABLO*) y *Omi* son inactivados en células de ratón, aparentemente la apoptosis no se ve afectada; por este motivo, no existe acuerdo sobre sus funciones normales en la regulación de la apoptosis.

En resumen, las actividades combinadas de las proteínas Bcl2, IAP y anti-IAP determina la sensibilidad de una célula animal a un estímulo inductor de la apoptosis, con los IAP y las anti-IAP dominantes en moscas y las proteínas Bcl2 dominantes en mamíferos.

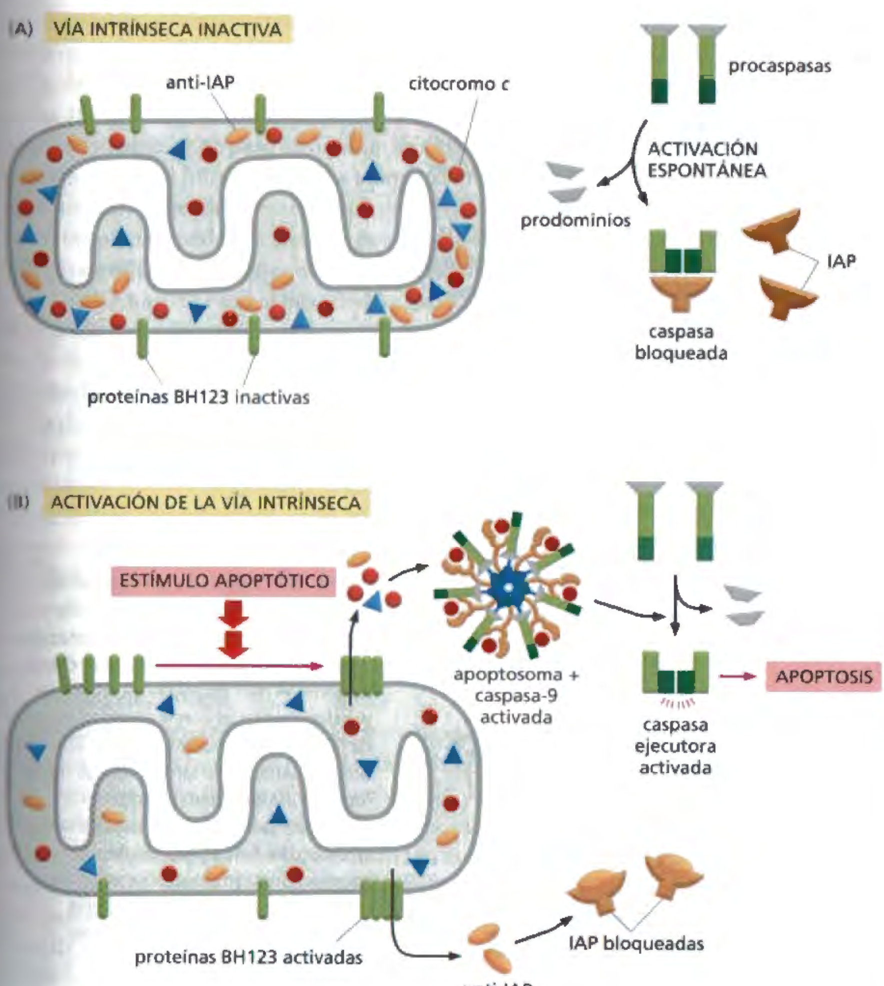


Figura 18–12 Modelo explicativo del papel de los IAP y de las anti-IAP en el control de la apoptosis en células de mamífero. (A) En ausencia de un estímulo apoptótico, los IAP impiden la apoptosis accidental causada por la activación espontánea de las procaspasas. Los IAP se localizan en el citosol y se unen e inhiben cualquier caspasa que se haya activado espontáneamente. Algunos IAP también son ubiquitinas ligasa que ubiquitinizan las caspasas a las que se unen, marcándolas para que sean degradadas en los proteosomas (no se muestra). (B) Cuando un estímulo apoptótico activa la vía intrínseca, entre las proteínas que son liberadas del espacio intermembrana mitocondrial se encuentran las proteínas anti-IAP, las cuales se unen y bloquean la actividad inhibidora de los IAP. Al mismo tiempo, el citocromo *c* liberado desencadena el ensamblaje del apoptosoma, el cual puede activar una cascada de caspasas e inducir la apoptosis.

Los factores de supervivencia extracelulares inhiben la apoptosis de varias formas

Como se ha tratado en el Capítulo 15, las señales extracelulares regulan la mayoría de actividades de las células animales, incluida la apoptosis. Estas señales extracelulares son parte de los controles "sociales" normales que aseguran que las células actúen por el bien de todo el organismo; en este caso, sobreviviendo cuando se necesitan y autoeliminándose cuando ya no son necesarias. Algunas moléculas de señalización extracelulares estimulan la apoptosis, mientras que otras la inhiben. Hemos estudiado proteínas de señalización, como el ligando Fas, que activan receptores de muerte y de ese modo desencadenan la vía extrínseca de la apoptosis. Otras moléculas de señalización extracelular que estimulan la apoptosis son especialmente importantes durante el desarrollo animal: por ejemplo, un repentino aumento de la hormona tiroidea en el torrente sanguíneo es la señal para que las células de la cola del renacuajo experimenten apoptosis en la metamorfosis (véase Figura 18–3), mientras que la producción local de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP: ***bone morphogenic proteins***, tratado en los Capítulos 15 y 22) estimula la autoeliminación de las células que se localizan entre los dedos en desarrollo (véase Figura 18–2). A continuación centraremos el análisis en las moléculas de señalización extracelulares que inhiben la apoptosis, las cuales colectivamente se denominan **factores de supervivencia**.

Para evitar la apoptosis, la mayoría de las células animales necesitan señales procedentes de otras células. Parece que este sorprendente hecho contribuye a asegurar que las células sólo sobreviven cuándo y dónde se necesitan. Por ejemplo, durante el desarrollo del sistema nervioso se genera un exceso de neuronas, que compiten por las cantidades limitadas de factores de supervivencia secretados por las células diana con las que normalmente entran en contacto. Las neuronas que reciben la suficiente cantidad del tipo de señal de supervivencia adecuada viven, mientras que las otras mueren. Así, el número de neuronas que sobreviven se ajusta de forma automática, de manera que sea apropiado para el número de células diana con las que conectan (**Figura 18–13**). Se cree que una competencia similar por las cantidades limitadas de los factores de supervivencia producidos por las células vecinas regula el número de células en otros tejidos, tanto durante el desarrollo como en la edad adulta.

Por lo general, los factores de supervivencia se unen a receptores de la superficie celular que activan vías de señalización intracelular que inhiben el programa apoptótico, regulando con frecuencia a los miembros de la familia de proteínas Bcl2. Por ejemplo, algunos factores de supervivencia hacen que aumente la síntesis de las proteínas antiapoptóticas Bcl2 como la propia Bcl2 o Bcl-X_L (**Figura 18–14**A). Otros actúan inhibiendo la función de las proteínas Bcl2 proapoptóticas "sólo BH3" como *Bad* (Figura 18–14B). En *Drosophila*, algunos factores de supervivencia actúan fosforilando e inactivando proteínas anti-IAP, para que las proteínas IAP inhiban la apoptosis (Figura 18–14C).

Cuando las células de mamíferos son privadas de factores de supervivencia, se autoeliminan produciendo y activando proteínas proapoptóticas "sólo BH3", que activan la vía intrínseca de la apoptosis anulando las proteínas antiapoptóticas Bcl2 necesarias para que la célula se mantenga viva. Las células de ratón que carecen tanto de Bax como de Bak son incapaces de activar la vía intrínseca y, por lo tanto, pueden vivir durante semanas en cultivo en ausencia de factores de supervivencia; no obstante, sin señales de supervivencia las células no pueden importar eficazmente nutrientes. Estas células abastecen sus necesidades metabólicas a través de la *autofagia*, en la que la célula secuestra orgánulos y porciones de su

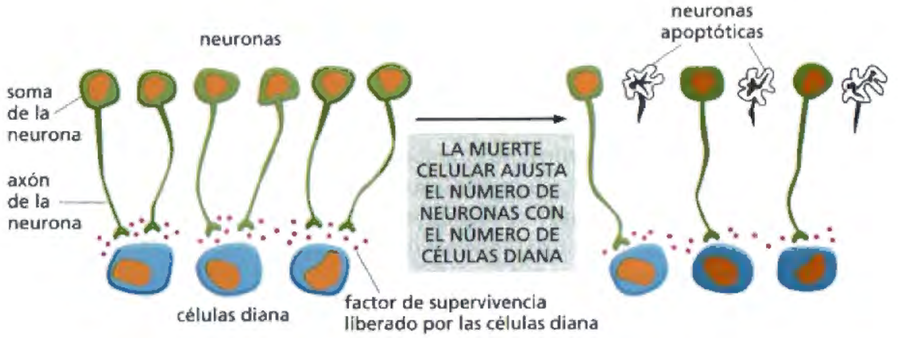


Figura 18–13 Papel de los factores de supervivencia y de la muerte celular en el ajuste del número de neuronas en **desarrollo a la cantidad de tejido diana.** Se generan más neuronas de las que se pueden mantener con la cantidad limitada de factores de supervivencia que liberan las células diana. Por lo tanto, algunas células reciben una cantidad de factores de supervivencia insuficiente para evitar la apoptosis. Esta estrategia de sobreproducción y posterior selección asegura que todas las células diana establezcan contacto con neuronas y que las neuronas sobrantes se eliminen de forma automática.

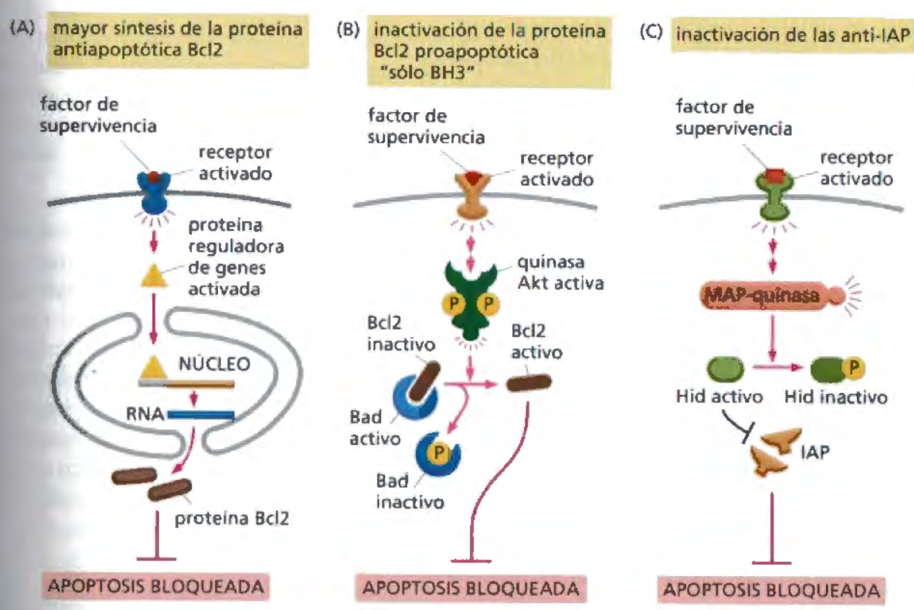


Figura 18–14 Tres maneras mediante las que los factores de supervivencia extracelulares pueden inhibir la apoptosis. (A) Algunos factores de supervivencia inhiben la apoptosis estimulando la transcripción de genes que codifican proteínas antiapoptóticas Bcl2 como la propia Bcl2 o Bcl-X_L. (B) Muchos otros activan la proteína serina/treonina quinasa Akt, la cual, entre muchas otras dianas, fosforila e inactiva la proteína Bcl2 proapoptótica "sólo BH3" Bad (véase Figura 15-64). Cuando no está fosforilada, Bad induce apoptosis uniéndose e inhibiendo Bcl2; una vez fosforilada, Bad se disocia y libera Bcl2 que inhibe la apoptosis. Akt también inhibe la apoptosis fosforilando e inactivando proteínas reguladoras de genes de la familia Forkhead que estimulan la transcripción de genes que codifican proteínas que inducen la apoptosis (no se muestra). (C) En *Drosophila*, algunos factores inhiben la apoptosis estimulando la fosforilación de la proteína anti-IAP Hid. Cuando no está fosforilada, Hid induce la muerte celular inhibiendo los IAP. Una vez fosforilada, Hid ya no inhibe los IAP, que se activan y bloquean la apoptosis.

citoplasma en los autofagosomas, los cuales se fusionan con lisosomas (véase Capítulo 13). Las células finalmente mueren por falta de nutrientes, pero no por apoptosis.

La apoptosis excesiva o insuficiente puede contribuir a la enfermedad

Existen muchas enfermedades humanas en las que un número excesivo de células experimentan apoptosis y de esa manera contribuyen al daño tisular. Algunos de los ejemplos más significativos son los infartos de miocardio y las embolias cerebrales. En estas enfermedades agudas, muchas células mueren por necrosis como consecuencia de la isquemia (aporte sanguíneo inadecuado), pero algunas de las células menos afectadas mueren por apoptosis. Se espera que en el futuro, fármacos como los inhibidores de las caspasas que bloquean la apoptosis sean útiles para proteger las células en estas enfermedades.

En otras enfermedades, mueren por apoptosis un número demasiado reducido de células. Por ejemplo, mutaciones en ratones y humanos que inactivan los genes que codifican el receptor de muerte Fas y el ligando Fas, impiden la muerte normal de algunos linfocitos, provocando que estas células se acumulen en cantidades excesivas en el bazo y en los ganglios linfáticos. En muchas ocasiones, este hecho conduce a la enfermedad autoinmune, en la que los linfocitos reaccionan contra los propios tejidos del individuo.

La disminución de la apoptosis también contribuye al desarrollo de muchos tumores, dado que con frecuencia las células cancerosas regulan de forma anormal el programa apoptótico. <TGAA> Por ejemplo, el gen *Bcl2* se identificó por primera vez en una forma común de linfoma en humanos, en el que una translocación cromosómica provoca la sobreexpresión de la proteína Bcl2; en efecto, Bcl2 toma su nombre de este *linfoma de linfocitos B* (*B cell lymphoma*). La gran cantidad de Bcl2 en los linfocitos portadores de la translocación induce el desarrollo de cáncer al inhibir la apoptosis, prolongando de este modo la supervivencia celular y aumentando el número de células; también disminuye la sensibilidad de las células a los fármacos anticancerosos, que habitualmente actúan induciendo la apoptosis en las células cancerosas.

Asimismo, el gen que codifica la proteína supresora de tumores p53 está mutado en el 50% de los cánceres humanos de manera que no puede inducir la apoptosis o la detención del ciclo celular en respuesta al daño en el DNA. Por lo tanto, la ausencia de función de p53 hace posible que las células cancerosas sobrevivan y proliferen incluso cuando su DNA esté dañado; de esta manera, las células acumulan más mutaciones, algunas de las cuales hacen que el cáncer sea más maligno (véase Capítulo 20). Dado que muchos fármacos anticancerosos inducen apoptosis (y la detención del ciclo celular) mediante un mecanismo dependiente de p53 (se trata en los Capítulos 17 y 20), la ausencia de función de p53 también implica que las células cancerosas sean menos sensibles a estos fármacos.

La mayoría de los cánceres humanos aparecen en tejidos epiteliales como los del pulmón, el tracto intestinal, la mama y la próstata. Este tipo de células cancerosas exhibe muchas anormalidades en su comportamiento, incluyendo una disminución en la capacidad de adherirse a la matriz extracelular y de unirse entre sí mediante uniones intercelulares especializadas. En el capítulo siguiente se describen las estructuras y las funciones de la matriz extracelular y de las uniones celulares.

Resumen

Las células pueden activar un programa intracelular de muerte y autoeliminarse de forma controlada; este proceso se denomina muerte celular programada. De esta manera, las células animales que están irreversiblemente dañadas, que ya no se necesitan o que son una amenaza para el organismo, se pueden eliminar de forma rápida y limpia. En la mayoría de los casos, estas muertes se producen por apoptosis: las células se reducen, se condensan y con frecuencia se fragmentan, y las células adyacentes o los macrófagos fagocitan rápidamente estas células o sus fragmentos antes de que se produzca ninguna fuga del contenido citoplasmático. La apoptosis depende de enzimas proteolíticas denominadas caspasas, las cuales escinden proteínas intracelulares específicas que ayudan a que la célula se autoelimine. Las caspasas están presentes en todas las células animales nucleadas en forma de precursores inactivos denominados procaspasas. Las procaspasas iniciadoras se activan cuando se mantienen próximas entre sí en complejos de activación: una vez activadas, escinden y activan las procaspasas ejecutoras que a su vez, activan otras procaspasas ejecutoras (y otras proteínas diana de la célula), produciendo una cascada proteolítica irreversible y amplificadora.

Las células utilizan al menos dos vías diferentes para activar las procaspasas iniciadoras y desencadenar una cascada de caspasas que induzca la apoptosis: la vía extrínseca se activa mediante ligandos extracelulares que se unen a receptores de muerte de la superficie celular; la vía intrínseca se activa por señales intracelulares que se generan cuando las células están estresadas. Cada vía utiliza sus propias procaspasas iniciadoras, que se activan en complejos de activación diferentes, denominados DISC y apoptosoma, respectivamente. En la vía extrínseca, los receptores de muerte reclutan las procaspasas-8 y 10 mediante proteínas adaptadoras formando el DISC; en la vía intrínseca, el citocromo c *que se libera del espacio intermembrana de las mitocondrias activa Apaf1, la cual se ensambla en un apoptosoma y recluta y activa la procaspasa-9.*

Tanto las proteínas señalizadoras extracelulares como las proteínas intracelulares Bcl2 y las proteínas IAP regulan estrechamente el programa apoptótico asegurando que en una situación normal las células sólo se autoeliminan cuando beneficia al organismo. Las proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas Bcl2 regulan la vía intrínseca controlando la liberación de proteínas intermembrana mitocondriales, mientras que las proteínas IAP inhiben las caspasas activadas e inducen su degradación.

PROBLEMAS

¿Qué afirmaciones son ciertas? Explicar por qué sí o por qué no

18–1 En los tejidos adultos normales, la muerte celular normalmente se equilibra con la división celular.

18–2 Las células de los mamíferos que no tienen citocromo *c* deberían ser resistentes a la apoptosis inducida por la luz UV.

Resolver los siguientes problemas

18–3 Una función importante de Fas y del ligando Fas es mediar en la eliminación de células tumorales por los linfocitos citotóxicos. En un estudio de 35 tumores primarios de colon y pulmón, se detectó que la mitad tenían amplificado y sobreexpresaban un gen que codifica una proteína de secreción que se une al ligando Fas. ¿Por qué la sobreexpresión de esta proteína puede contribuir a la supervivencia de estas células tumorales? Razonar la respuesta.

18–4 El desarrollo del nematodo *Caenorhabditis elegans* genera 959 células somáticas; también produce 131 células adicionales que posteriormente se eliminan mediante muerte celular programada. Los primeros genes implicados en la apoptosis se identificaron en mutantes de *C. elegans* obtenidos mediante experimentos de genética clásica. Entre los muchos genes mutados que afectaban la apoptosis en el nematodo, ninguno se correspondía con el gen del citocromo *c*. ¿Por qué esta molécula efectora fundamental en la apoptosis no se encontró en las numerosas cribas genéticas para genes de "muerte" que se realizaron en *C. elegans*?

18–5 Si fuera posible microinyectar citocromo *c* en el citosol de células de tipo salvaje y de células que fueran doblemente deficientes en Bax y Bak. ¿Qué tipo de célula sufriría apoptosis, uno, los dos o ninguno? Razonar la respuesta.

18–6 A diferencia de sus anomalías cerebrales similares, los ratones recién nacidos deficientes en Apaf1 o caspasa-9 tienen anomalías características en sus patas. Los ratones deficientes en Apaf1 no pueden eliminar el tejido existente entre sus dedos en

desarrollo, mientras que los ratones deficientes en caspasa-9 tienen dedos formados normalmente (**Figura P18–1**). Si Apaf1 y la caspasa-9 participan en la misma vía apoptótica, ¿cómo es posible que estos ratones deficientes difieran en la apoptosis de estas células?

18–7 Cuando se exponen células cancerosas humanas (HeLa) a una dosis de luz UV de 90 mJ/cm^2, la mayoría de las células experimentan apoptosis a las 24 horas. La liberación del citocromo *c* de las mitocondrias ya se puede detectar a las 6 horas de la exposición y continúa aumentando durante más de 10 horas después. ¿Significa esto que las células liberan lentamente su citocromo *c* durante este periodo de tiempo? O en realidad ¿las células liberan rápidamente su citocromo *c* pero cada célula lo hace en diferentes momentos durante el largo periodo de tiempo?

Para contestar a esta pregunta fundamental, se fusiona el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) con el gen del citocromo *c*, de manera que puede observarse el comportamiento de las células individualizadas mediante microscopía de fluorescencia confocal. En las células que expresan la proteína de fusión citocromo *c*-GFP, la fluorescencia muestra el típico patrón punteado de las proteínas mitocondriales. A continuación, se irradian estas células con luz UV para observar los cambios en el patrón punteado.



Figura P18–1 Apariencia de las patas de ratones recién nacidos *Apaf1*$^{-/-}$ y *Casp9*$^{-/-}$ en comparación con las de ratones recién nacidos normales (Problema 18–6). (De H. Yoshida et al., Cell 94:739-750, 1998. Con la autorización de Elsevier.)

En la **Figura P18–2**A y B, se muestran dos de estas células (delimitadas en blanco). La liberación del citocromo *c*-GFP se detecta como un cambio en el patrón de fluorescencia de punteado a difuso. El tiempo transcurrido después de la exposición a la luz UV se indica como horas:minutos debajo de cada imagen.

¿Qué modelo de liberación del citocromo *c* sustenta estas observaciones? Razonar la respuesta.

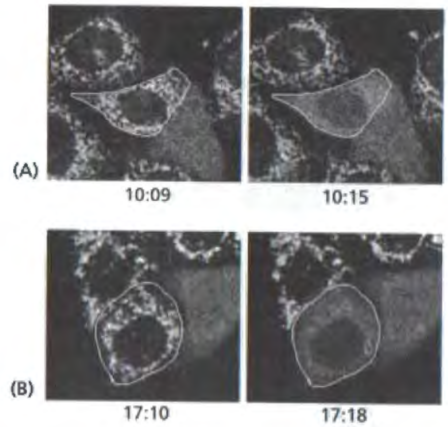


Figura P18–2 Análisis mediante videomicroscopía de fluorescencia con toma a intervalos de tiempo, de la liberación del citocromo *c*-GFP de las mitocondrias de células individualizadas (Problema 18–7). (A) Células observadas durante 8 minutos, 10 horas después de la irradiación UV. (B) Células observadas durante 6 minutos, 17 horas después de la irradiación UV. Una célula en (A) y una en (B), ambas *delimitadas en blanco*, han liberado su citocromo *c*-GFP durante el periodo de tiempo de la observación, que se muestra como horas:minutos bajo cada panel. (De J.C. Goldstein et al., *Nat. Cell Biol.* 2:156-162, 2000. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

BIBLIOGRAFÍA

Adams JM, Huang DC, Strasser A et al (2005) Subversion of the Bcl-2 life/death switch in cancer development and therapy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70:469–77.

Boatright KM & Salvesen GS (2003) Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15:725–731.

Danial NN & Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116:205–219.

Ellis RE, Yuan JY & Horvitz RA (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 7:663–698.

Fadok VA & Henson PM (2003) Apoptosis: giving phosphatidylserine recognition an assist—with a twist. *Curr Biol* 13:R655–R657.

Galonek HL & Hardwick JM (2006) Upgrading the BCL-2 network. *Nature Cell Biol* 8:1317–1319.

Green DR (2005) Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 121:671–674.

Horvitz HR (2003) Worms, life, and death (Nobel lecture). *Chembiochem* 4:697–711.

Hyun-Eui K, Fenghe D, Fang M & Wang X (2005) Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:17545–17550.

Jacobson MD, Weil M & Raff MC (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* 88:347–354.

Jiang X & Wang X (2004) Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* 73:87–106.

Kerr JF, Wyllie AH & Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *B J Cancer* 26:239–257.

Kumar S (2007) Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 14:32–43.

Lavrik I, Golks A & Krammer PH (2005) Death receptor signaling. *J Cell Sci* 118:265–267.

Lowe SW, Cepero E & Evan G (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432:307–315.

Lum JJ, Bauer DE, Kong M et al (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120:237–48.

McCall K & Steller H (1997) Facing death in the fly: genetic analysis of apoptosis in *Drosophila*. *Trends Genet* 13:222–226.

Nagata S (1999) Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* 33:29–55.

Nagata S (2005) DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 23:853–875.

Pop C, Timmer J, Sperandio S & Salvesen GS (2006) The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Mol Cell* 22:269–275.

Raff MC (1999) Cell suicide for beginners. *Nature* 396:119–122.

Rathmell JC & Thompson CB (2002) Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* 109:S97–107.

Tittel JN & Steller H (2000) A comparison of programmed cell death between species. *Genome Biol* 1.

Verhagen AM, Coulson EJ & Vaux DL (2001) Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol* 2:3009.1–3009.10.

Vousden KH (2005) Apoptosis. p53 and PUMA: a deadly duo. *Science* 309:1685–1686.

Willis SN & Adams JM (2005) Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 17:617–625.

V CÉLULAS EN SU CONTEXTO SOCIAL

Parte V
Capítulos

19 Uniones celulares, adhesión celular y matriz extracelular

20 Cáncer

21 La reproducción sexual: meiosis, células germinales y fecundación

22 Desarrollo de los organismos pluricelulares

23 Los tejidos especializados, las células madre y la renovación tisular

24 Patógenos, infección e inmunidad innata

25 El sistema de inmunidad adquirida



Uniones celulares, adhesión celular y matriz extracelular

19

En este capítulo

CADHERINAS Y ADHESIÓN INTERCELULAR 1133

UNIONES ESTRECHAS Y ORGANIZACIÓN DE LOS EPITELIOS 1150

CONDUCTOS INTERCELULARES: UNIONES DE TIPO GAP Y PLASMODESMOS 1158

LA LÁMINA BASAL 1164

INTEGRINAS Y ADHESIÓN CÉLULA-MATRIZ 1169

MATRIZ EXTRACELULAR DE LOS TEJIDOS CONJUNTIVOS ANIMALES 1178

PARED CELULAR VEGETAL 1195

De todas las interacciones sociales que establecen las células en un organismo pluricelular, las más importantes son aquellas que les permiten mantenerse unidas. Las células pueden adherirse unas a otras a través de uniones intercelulares directas o mediante materiales extracelulares que ellas mismas secretan; de un modo u otro, las células tienen que cohesionarse y formar una estructura pluricelular organizada.

Los mecanismos de cohesión controlan la arquitectura del organismo: la forma, la resistencia y la disposición de sus diferentes tipos celulares. Las uniones entre las células generan vías de comunicación, permitiéndoles intercambiar señales que coordinan su comportamiento y regulan sus patrones de expresión génica. La adhesión con otras células y con la matriz extracelular controla la orientación de la estructura interna de cada célula. Tanto la formación y la destrucción de estas uniones, como la remodelación de la matriz, controlan la manera en la que las células se desplazan dentro del organismo, guiándolas mientras el organismo crece, se desarrolla y se repara. Así, el sistema formado por las uniones celulares, los mecanismos de adhesión celular y la matriz extracelular es esencial para cada aspecto de la organización, función y dinámica de las estructuras pluricelulares. Las alteraciones en este aparato conllevan una gran variedad de enfermedades.

Como ejemplos de ingeniería estructural, los grandes organismos pluricelulares representan una proeza sorprendente. Las células son elementos pequeños, deformables, a menudo móviles, que contienen un medio acuoso y que están limitados por una delgada membrana plasmática. A pesar de estas características, millones de ellas pueden combinarse formando una estructura tan masiva, fuerte y estable como pueda serlo un caballo o un árbol. ¿Cómo es posible este fenómeno?

La respuesta la encontramos en dos estrategias básicas de construcción mediante las cuales las tensiones pueden ser transmitidas a través de las estructuras pluricelulares. Una de las estrategias depende de la resistencia que ofrece la *matriz extracelular*, una red compleja de proteínas y cadenas de polisacáridos secretados por las células. La otra estrategia depende de la resistencia del citoesqueleto interno y de las *uniones intercelulares* que conectan los citoesqueletos de las células vecinas. En los vegetales, la matriz extracelular es fundamental, ya que deben su resistencia a las paredes celulares que envuelven cada célula. En animales se utilizan ambas estrategias arquitectónicas, aunque la importancia de cada una de ellas difiere según el tejido de que se trate.

Los tejidos animales son extraordinariamente variados, tal como se describe en el Capítulo 23, pero la mayoría de ellos se pueden clasificar en dos grandes categorías que representan dos extremos arquitectónicos (**Figura 19–1**). En los **tejidos conjuntivos**, tales como el hueso y el tendón, la matriz extracelular es muy abundante, mientras que las células están esparcidas dentro de ella. La matriz es rica en polímeros fibrosos, principalmente de *colágena*, y es ella y no las células, la principal responsable de la respuesta a las tensiones mecánicas a las que está sujeto el tejido. Las interacciones directas entre células son poco frecuentes y la unión de éstas a la matriz permite mantener una tracción mutua.

Por el contrario, en los **tejidos epiteliales**, tales como el revestimiento del intestino o la cubierta epidérmica de la piel, las células se encuentran muy unidas unas a otras formando láminas que se denominan **epitelios**. La matriz extracelular es escasa y está constituida sobre todo por un delgado entramado denominado *lámina basal* (o *membrana basal*) que se localiza en la base de los epitelios. Dentro de los epitelios, las células se unen entre sí mediante diversos tipos de adhesiones intercelulares, a las que se anclan los filamentos del citoesqueleto, transmitiendo tensiones intracelulares desde un lugar de adhesión a otro punto de adhesión.

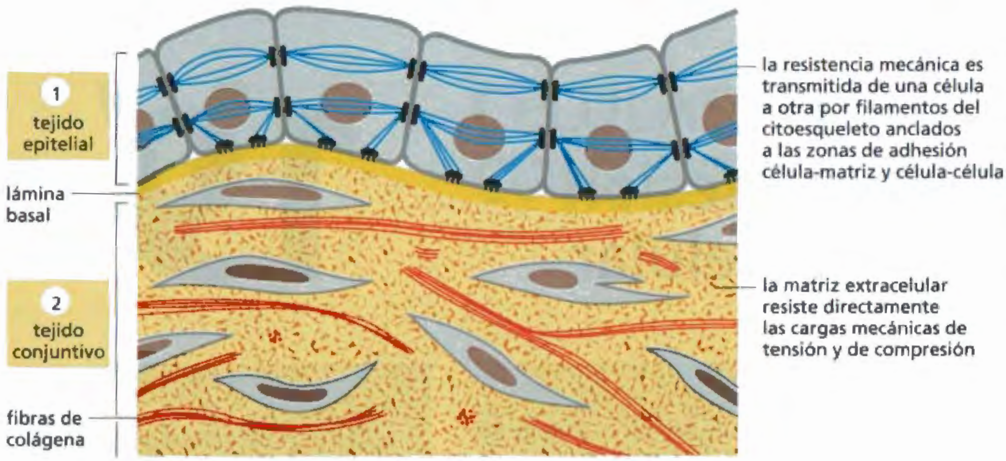


Figura 19–1 Las dos principales maneras mediante las que se unen las células animales. En el tejido conjuntivo, la matriz extracelular es el principal componente que soporta las tensiones. En el tejido epitelial, esta función es ejercida por el citoesqueleto de la propia célula, el cual está unido al de otras células adyacentes por uniones de anclaje. Las adhesiones célula-matriz unen el tejido epitelial con el tejido conjuntivo subyacente.

La unión física es importante, tanto en tejidos epiteliales como en no epiteliales, pero los contactos intercelulares y los de célula-matriz varían en cuanto a estructura y aportan algo más que la transmisión de las fuerzas. Se distinguen cuatro funciones principales, cada una de las cuales sigue diferentes bases moleculares (**Figura 19–2** y **Tabla 19–1**):

1. **Uniones de anclaje**, que incluyen *adhesiones intercelulares y célula-matriz*, que transmiten tensiones y son sostenidas por los filamentos del citoesqueleto intracelular.
2. **Uniones oclusivas**, que sellan los espacios entre las células epiteliales constituyendo una barrera impermeable (o selectivamente permeable).
3. **Uniones formadoras de canales**, que generan conductos que comunican los citoplasmas de las células adyacentes.
4. **Uniones transmisoras de señales**, que permiten transmitir señales de célula a célula a través de sus membranas plasmáticas en las regiones de contacto célula-célula.

Las sinapsis químicas en el sistema nervioso (descritas en el Capítulo 11) y las sinapsis inmunológicas, donde los linfocitos T interactúan con células presentadoras de antígeno (tratadas en el Capítulo 25), son claros ejemplos de uniones transmisoras de señal, pero no son las únicas. Las regiones de comunicación intercelular mediante ligando-receptor transmembrana como Delta y Notch, o efrinas y receptores Eph, tal como se describe en el Capítulo 15, seguirían esta premisa: las membranas celulares deben mantenerse en contacto una con otra para que los ligandos activen a los receptores. Además, hay que destacar que las uniones de anclaje, las uniones oclusivas y las uniones formadoras de canales, por vías distintas, también desempeñan un papel importante en la transmisión de señales.

La primera parte de este capítulo se centrará en los tejidos y en las células animales, comenzando con las adhesiones intercelulares, las uniones oclusivas y las uniones formadoras

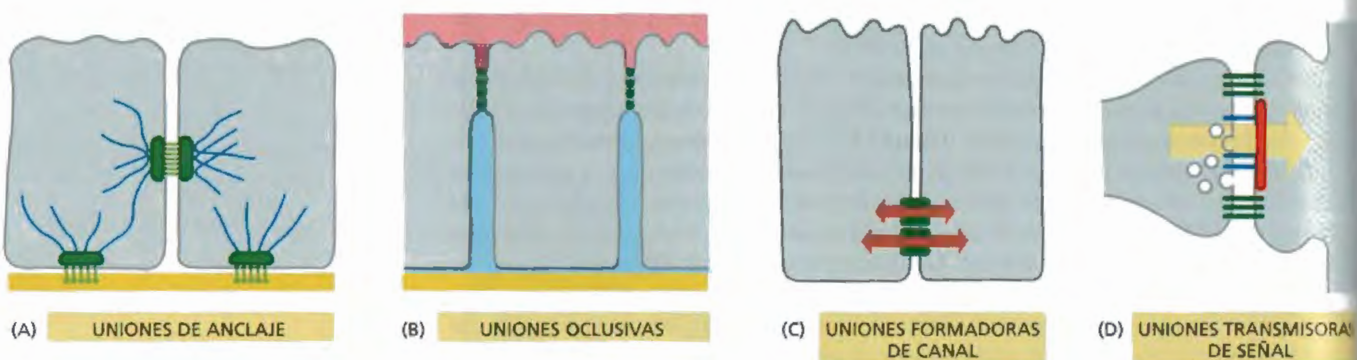


Figura 19–2 Cuatro clases funcionales de uniones celulares en tejidos animales. (A) las uniones de anclaje unen una célula a otra (típicamente mediante la proteína transmembrana *cadherina*) o una célula a la matriz (por lo general mediante la proteína transmembrana *integrina*). (B) Las uniones oclusivas (en las que interviene la proteína *claudina*) sellan los espacios entre las células epiteliales. (C) Las uniones formadoras de canal (formadas por *conexinas* o *inexinas*) forman conductos a través de los cuales moléculas pequeñas e iones pasan de una célula a otra. (D) Las uniones transmisoras de señal son estructuras complejas en las que normalmente existen proteínas de anclaje unidas a proteínas de transducción de señal.

Tabla 19–1 Clasificación funcional de las uniones celulares

UNIONES DE ANCLAJE	
Zonas de anclaje de filamentos de actina	
1.	uniones célula-célula (uniones adherentes)
2.	uniones célula-matriz (adhesiones célula-matriz asociadas a actina)
Zonas de anclaje de filamentos intermedios	
1.	uniones célula-célula (desmosomas)
2.	uniones célula-matriz (hemidesmosomas)
UNIONES DE OCLUSIÓN	
1.	uniones estrechas (en vertebrados)
2.	uniones septadas (en invertebrados)
UNIONES FORMADORAS DE CANAL	
1.	uniones de tipo gap (en animales)
2.	plasmodesmos (en vegetales)
UNIONES TRANSMISORAS DE SEÑAL	
1.	sinapsis químicas (en el sistema nervioso)
2.	sinapsis inmunológicas (en el sistema inmune)
3.	contactos intercelulares de señalización transmembrana ligando-receptor (Delta-Notch, efrina-Eph, etc.). Las uniones de anclaje, las oclusivas y las formadoras de canal, además de ejercer funciones estructurales, también pueden desempeñar funciones de señalización

de canales que unen directamente una célula con otra. Como ejemplos de uniones transmisoras de señales, se examinarán brevemente las sinapsis neuronales desde el punto de vista de sus mecanismos de adhesión y ensamblaje. Veremos cómo se combinan los diferentes tipos de uniones organizando las células dentro de las láminas epiteliales polarizadas. Posteriormente, trataremos la matriz extracelular en animales y los mecanismos mediante los que las células interaccionan con ella a través de adhesiones célula-matriz. Por último, dirigiremos nuestra atención hacia los vegetales y el papel central que ejerce la pared vegetal en su construcción.

CADHERINAS Y ADHESIÓN INTERCELULAR

Las estructuras de las **adhesiones intercelulares** son claramente visibles en epitelios maduros y en otros tejidos –como el músculo cardíaco– que se mantienen cohesionados por fuertes anclajes intercelulares. Estudios de microscopía electrónica permitieron confeccionar una primera clasificación general de estas uniones celulares. Posteriormente, la bioquímica y la biología molecular han mostrado que las diferentes estructuras observadas por microscopía electrónica se relacionan con diferentes sistemas moleculares, no sólo en epitelios adultos sino también en otros tejidos en los que las especializaciones de unión no son tan claramente visibles.

La **Figura 19–3** ilustra esquemáticamente los tipos de uniones que se visualizan en una sección de epitelio maduro al microscopio electrónico y muestra cómo están distribuidas las adhesiones intercelulares (uniones de anclaje), que serán objeto de estudio en esta sección, en relación a otros tipos de uniones a las que nos referiremos más adelante. El esquema muestra la disposición típica en un epitelio *columnar simple* como es el caso del revestimiento del intestino delgado de un vertebrado, formado por una única capa de células altas apoyadas sobre una lámina basal, con su cara más externa, o *apical*, libre y expuesta al medio extracelular. En sus lados, o caras *laterales*, se forman las uniones con las células adyacentes. Cerca del ápice se encuentran las uniones oclusivas (llamadas *uniones estrechas* en vertebrados), que evitan que se puedan filtrar moléculas a través de los espacios intercelulares del epitelio. Por debajo, se localizan otros dos tipos de uniones intercelulares: las **uniones adherentes**, que son regiones de anclaje para los filamentos de actina, y los **desmosomas**, regiones de anclaje para los filamentos intermedios. Más abajo, a menudo mez-

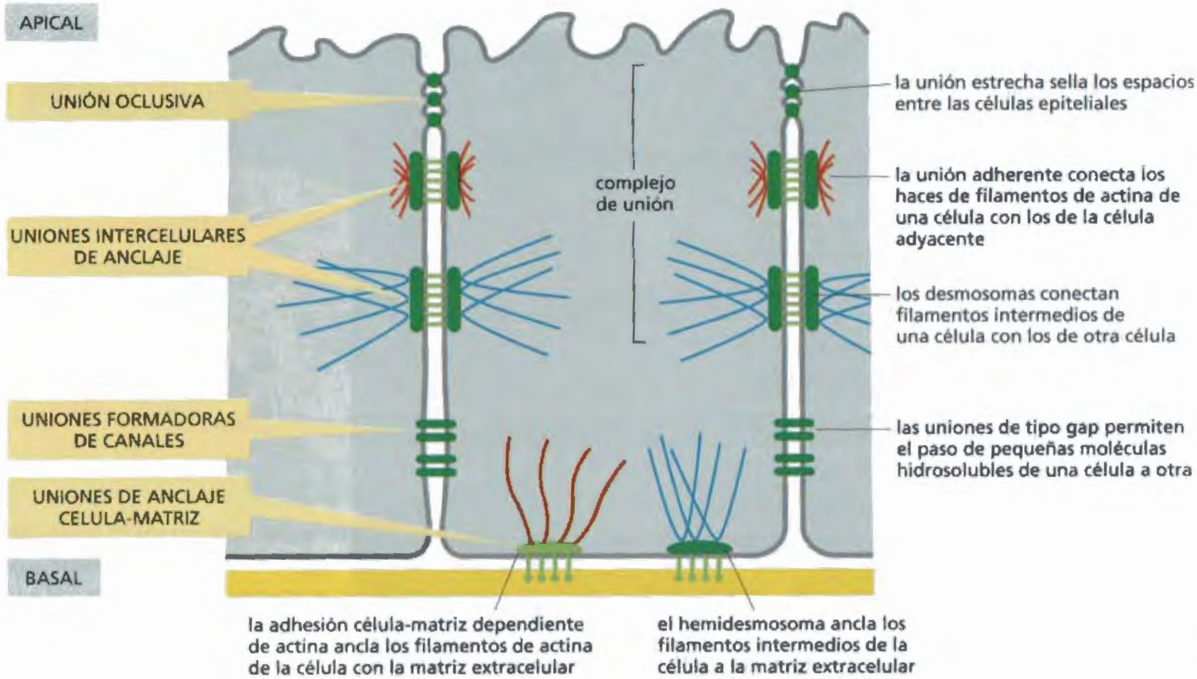


Figura 19–3 Resumen de las diferentes uniones celulares en células epiteliales de vertebrado, clasificadas según sus funciones principales. En el dominio más apical de la célula, la disposición de las uniones es bastante común para todos los epitelios de vertebrados. La unión estrecha ocupa la posición más apical, seguida de la unión adherente (banda de adhesión) y de una fila de desmosomas en disposición paralela; en conjunto, estas estructuras forman el denominado complejo de unión. Las uniones de tipo gap y otros desmosomas se encuentran menos organizados. El esquema está basado en células epiteliales del intestino delgado. Las uniones especializadas en la transmisión de señal se tratan en el próximo capítulo.

clados con desmosomas, se encuentran uniones formadoras de canales denominadas *uniones de tipo gap*.

Otros grupos de adhesiones anclan las células epiteliales a la lámina basal; serán descritas en la última sección de este capítulo. Estas adhesiones célula-matriz se clasifican, del mismo modo que las uniones intercelulares, según sus conexiones con el citoesqueleto: las *adhesiones célula-matriz dependientes de actina* (poco visibles en el intestino delgado, pero abundantes en otros tejidos) anclan los filamentos de actina a la matriz, mientras que los *hemidesmosomas* anclan los filamentos intermedios.

En cada una de estas uniones de anclaje, el papel principal siempre lo desempeñan las **proteínas transmembrana de adhesión**, las cuales atraviesan la membrana y presentan un dominio intracelular unido al citoesqueleto y un dominio extracelular unido a otras estructuras (**Figura 19–4**). Estas moléculas transmembrana asociadas al citoesqueleto se dividen en dos superfamilias que se corresponden con los dos tipos básicos de anclaje extracelular (**Tabla 19–2**). Las proteínas de la superfamilia de las **cadherinas** median principalmente las uniones intercelulares, mientras que las de la familia de las **integrinas** se encargan sobre todo de las uniones célula-matriz. Dentro de cada familia existen especializaciones: algunas cadherinas se unen a actina y forman las uniones adherentes, mientras que otras se unen a filamentos intermedios y forman los desmosomas. Del mismo modo, algunas integrinas

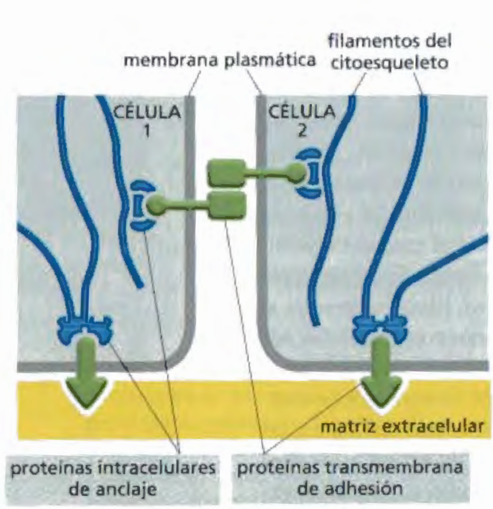


Figura 19–4 Las proteínas transmembrana de adhesión unen el citoesqueleto a estructuras extracelulares. El enlace externo puede ser otra célula (anclaje intercelular, mediado normalmente por cadherinas) o bien la matriz extracelular (anclaje célula-matriz, mediado normalmente por integrinas). Por lo general el enlace interno al citoesqueleto es indirecto, mediante proteínas intracelulares de anclaje, y será descrito más adelante.

Tabla 19–2 Uniones de anclaje

UNIÓN	PROTEÍNA TRANSMEMBRANA DE ADHESIÓN	LIGANDO EXTRACELULAR	ELEMENTO RELACIONADO DEL CITOESQUELETO	PROTEÍNAS DE ANCLAJE INTRACELULAR
Célula-célula				
Unión adherente	cadherina (cadherina clásica)	cadherina en células adyacentes	filamentos de actina	α-catenina, β-catenina, placoglobina (γ-catenina), p120-catenina, vinculina, α-actinina
Desmosoma	cadherina (desmogleína, desmocolina)	desmogleína y desmocolina en células adyacentes	filamentos intermedios	placoglobina (γ-catenina), placofilina, desmoplaquina
Célula-[redacted]				
Adhesión célula-matriz unida a actina	integrina	proteínas de matriz extracelular	filamentos de actina	talina, vinculina, α-actinina, filamina, paxilina, quinasa de adhesión focal (FAK)
Hemidesmosoma	integrina $\alpha_6\beta_4$, colágena de tipo XVII (BP180)	proteínas de matriz extracelular	filamentos intermedios	plectina, distonina (BP230)

se unen a actina y forman las adhesiones célula-matriz dependientes de actina, mientras que otras se unen a filamentos intermedios y forman los hemidesmosomas.

Existen algunas excepciones a estas reglas. Por ejemplo, algunas integrinas no median las uniones célula-matriz sino que median las intercelulares. Además, existen otros tipos de moléculas de adhesión celular que proporcionan uniones de anclaje más débiles, pero lo bastante fuertes para mantener las células unidas en circunstancias especiales. Las uniones basadas en cadherina se consideran como las de mayor relevancia, así que serán las primeras uniones intercelulares que trataremos en profundidad. <CGAA>

Las cadherinas median la adhesión intercelular dependiente de Ca^{2+} en los tejidos animales

Las cadherinas están presentes en todos los animales pluricelulares cuyo genoma ha sido analizado, así como en el grupo de los coanoflagelados. Éstos pueden existir como organismos unicelulares individuales o como colonias pluricelulares, y se considera que son los protistas a partir de los cuales han evolucionado los animales. Otros eucariotas, como los hongos y los vegetales, carecen de cadherinas, como sucede en bacterias y arqueas. Por lo tanto, parece que las cadherinas constituyen una parte esencial de lo que es un animal.

Las cadherinas reciben su nombre de su dependencia de iones de Ca^{2+}: la eliminación del Ca^{2+} extracelular provoca que las uniones por cadherinas se desorganicen. En algunos casos, especialmente en tejidos embrionarios, esto es suficiente para separar las células. En otros casos es necesario un tratamiento más severo como, por ejemplo, combinar la eliminación del Ca^{2+} con la adición de proteasas como la tripsina. Las proteasas degradan las adhesiones mediadas por la matriz extracelular y por moléculas de adhesión intercelular no dependientes de Ca^{2+}. En cualquier caso, cuando las células disociadas se colocan en un medio de cultivo normal, las adhesiones se reconstruyen y las células vuelven a unirse entre sí.

Este tipo de asociación intercelular proporcionó uno de los primeros ensayos que permitieron identificar las moléculas de adhesión celular. En estos experimentos, mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra las células de interés se probó la eficacia de cada anticuerpo en la supresión, impidiendo la formación de nuevas adhesiones en células que previamente habían sido disociadas. Los anticuerpos que mostraban este efecto se utilizaron para aislar las moléculas de adhesión intercelular que reconocían.

Casi todas las células de los vertebrados, y probablemente también las de otros animales, expresan una o más proteínas de la familia de las cadherinas, dependiendo del tipo celular. Además, diversas evidencias indican que las cadherinas constituyen las moléculas de adhesión encargadas de mantener unidas las células en tejidos embrionarios tempranos. Por ejemplo, los tejidos embrionarios en cultivo se desorganizan cuando son tratados con anticuerpos anti-cadherina; si la adhesión mediada por cadherina se conserva intacta, los anticuerpos contra otras moléculas de adhesión tienen un efecto reducido. Estudios en em-

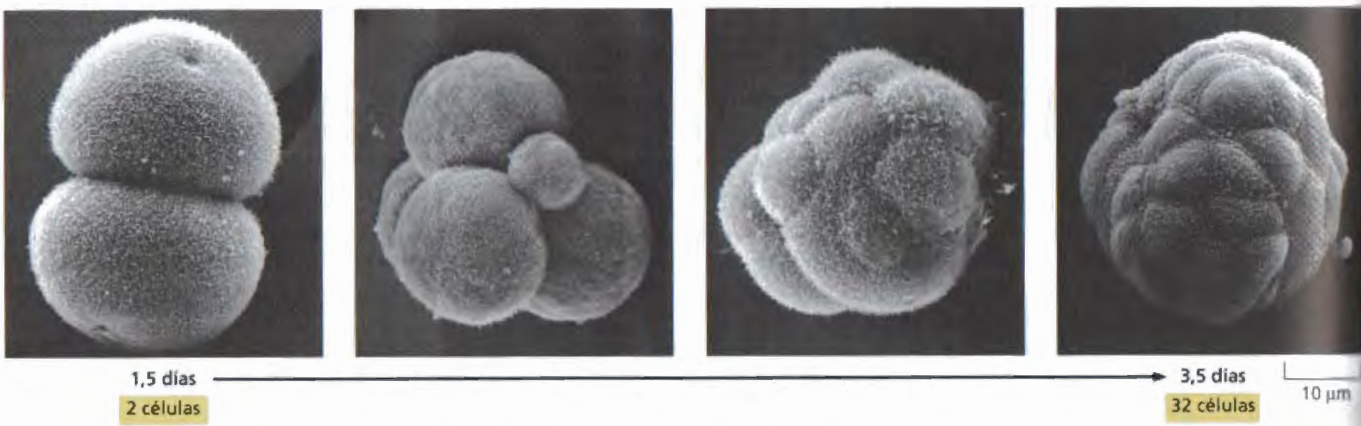


Figura 19–5 Compactación de un embrión temprano de ratón. Las células del embrión temprano se unen de forma muy laxa. En el estadio de ocho células, éstas empiezan a expresar E-cadherina y, como consecuencia de ello, sus uniones se hacen más fuertes y se adhieren más estrechamente a otras células. (Electromicrografías de microscopio electrónico de barrido por cortesía de Patricia Calarco; el estadio de 16-32 células de P. Calarco y C.J. Epstein, *Dev. Biol.* 32: 208-213, 1973. Con la autorización de Academic Press.)

briones tempranos de ratón ilustran el papel que tienen las cadherinas sobre el desarrollo. Hasta el estadio de ocho células, las células embrionarias de ratón se encuentran unidas de manera muy laxa y son esféricas. Entonces, mediante un cambio morfológico súbito denominado compactación, las células se compactan y forman uniones intercelulares más potentes, tanto que la superficie externa del embrión adquiere un aspecto liso (**Figura 19–5**). Los anticuerpos contra una cadherina específica, la *E-cadherina*, bloquean esta compactación, mientras que los anticuerpos que reaccionan con otras moléculas de superficie celular no lo consiguen. Las mutaciones que inactivan la E-cadherina causan la desorganización de los embriones y su muerte en estadios tempranos del desarrollo.

En vertebrados, la superfamilia de las cadherinas está constituida por cientos de proteínas diferentes e incluye algunas que presentan funciones de señalización

Las tres primeras cadherinas caracterizadas fueron denominadas de acuerdo con los tejidos en los que se localizaron. Así, la *E-cadherina* se encuentra en muchos tipos de células epiteliales; la *N-cadherina* en neuronas, en fibras musculares y en células del cristalino, y la *P-cadherina* en células placentarias y epidérmicas. Sin embargo, cualquiera de ellas puede encontrarse en otros tejidos. Por ejemplo, la N-cadherina también se expresa en fibroblastos y la P-cadherina se expresa en regiones cerebrales (**Figura 19–6**). Estas y otras **cadherinas clásicas** presentan cierta homología en sus dominios extracelulares e intracelulares. Mientras que todas ellas presentan funciones adhesivas bien definidas, también son importantes en la señalización. A través de sus dominios intracelulares, tal como veremos más adelante, transmiten información al interior de la célula permitiéndole adaptar su comportamiento en función de si está o no unida a otras células.

También existe un gran número de **cadherinas no clásicas** cuyas secuencias son menos homólogas, y de las que sólo en el cerebro se expresan más de 50. Las cadherinas no clásicas agrupan a proteínas con capacidad adhesiva reconocida, tales como diversas *protocadherinas* localizadas en cerebro y las *desmocolinas* y *desmogleínas* formadoras de los desmosomas. También incluyen proteínas que parecen estar implicadas principalmente en la señalización, como la *T-cadherina*, que carece de dominio transmembrana y se ancla a la membrana de neuronas y fibras musculares a través del glicosil fosfatidilinositol (GPI), y las proteínas *Fat* y

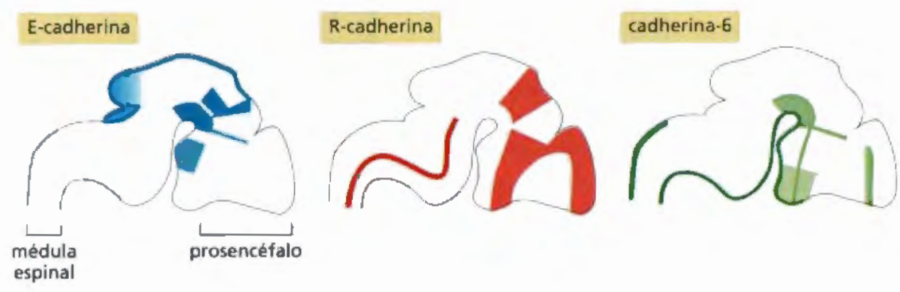


Figura 19–6 Diversidad entre las cadherinas del sistema nervioso central. El esquema muestra los patrones de expresión de tres cadherinas clásicas en el cerebro embrionario de ratón. En el cerebro también se expresan más de 70 cadherinas, tanto clásicas como no clásicas, siguiendo patrones complejos que reflejarían sus funciones en la guía y mantenimiento de la organización en este órgano tan complejo.

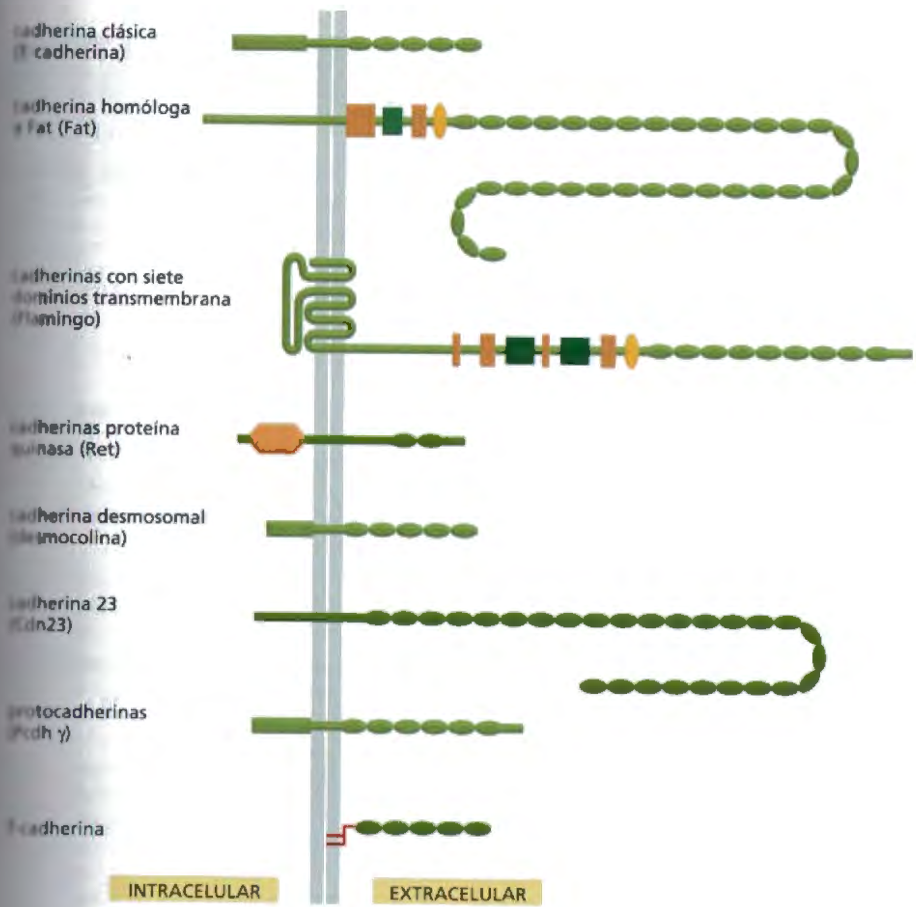


Figura 19–7 La superfamilia de las cadherinas. El diagrama muestra algunas de las diferencias existentes entre miembros de la superfamilia de las cadherinas. Todas ellas presentan porciones extracelulares que contienen varias copias del dominio cadherina (*óvalos verdes*), pero sus zonas intracelulares son más diversas, lo que refleja interacciones con una gran variedad de señales intracelulares, tales como moléculas de señalización o moléculas que anclan las cadherinas al citoesqueleto. Los diferentes colores en Fat, Flamingo y Ret representan los dominios conservados que se encuentran en otras familias de proteínas.

Flamingo, las cuales se identificaron como productos génicos de *Drosophila*, regulando respectivamente el crecimiento epitelial y la polaridad celular. El conjunto formado por cadherinas clásicas y no clásicas constituye la denominada **superfamilia de las cadherinas** (**Figura 19–7** y **Tabla 19–3**), que en humanos cuenta con más de 180 miembros. ¿Cómo se relacionan las estructuras de estas proteínas con sus funciones y por qué son tan numerosas?

Las cadherinas median adhesiones homofílicas

Habitualmente las uniones de anclaje intercelulares son simétricas: si por ejemplo se asocian a actina a un lado de la unión, también habrá actina en el otro lado. De hecho, la unión entre cadherinas es **homofílica** (**Figura 19–8**): las moléculas de cadherina de un subtipo específico expresadas por una célula interaccionan con moléculas del mismo subtipo, u otro muy parecido, expresadas por las células adyacentes. Según el modelo actual, la interacción tiene lugar en los extremos N-terminal de las moléculas de cadherina, es decir, en los extremos que se encuentran más alejados de la membrana. La proteína forma una protuberancia, o nudo, adyacente a una invaginación, de manera que las moléculas de cadherinas que emergen desde las membranas celulares opuestas se unen mediante la inserción del nudo de una en la invaginación de la otra (**Figura 19–9**A).

El espacio que existe entre las membranas celulares en una unión de anclaje está delimitado con precisión y depende de la estructura de las moléculas de cadherina que participan en ella. Por definición, todos los miembros de la superfamilia presentan una región extracelular que consiste en varias copias de un motivo denominado *dominio cadherina*. Las cadherinas clásicas de los vertebrados presentan 5 de estas repeticiones, mientras que en desmogleínas y desmocolinas hay 4 o 5; algunas cadherinas no clásicas poseen más de 30. Cada dominio cadherina forma una unidad más o menos rígida que se une al siguiente dominio cadherina mediante una región bisagra (Figura 19–9B). Los iones Ca^{2+} se unen cerca de cada región bisagra impidiendo su flexión, de manera que el conjunto de los dominios cadherina se comportan como una barra rígida, aunque ligeramente curvada. Cuando el

Tabla 19–3 Algunos miembros de la superfamilia de las cadherinas

DENOMINACIÓN	LOCALIZACIÓN PRINCIPAL	TIPO DE UNIÓN ASOCIADO	FENOTIPO RESULTANTE CUANDO SE HA INACTIVADO EN RATÓN
Cadherinas clásicas			
E-cadherina	varios epitelios	uniones adherentes	muerte en el estadio de blastocisto; los embriones no son capaces de llevar a cabo la compactación
N-cadherina	neuronas, corazón, músculo esquelético, cristalino y fibroblastos	uniones adherentes y sinapsis químicas	los embriones mueren a causa de defectos cardíacos
P-cadherina	placenta, epidermis, epitelio de la glándula mamaria	uniones adherentes	desarrollo anormal de la glándula mamaria
VE-cadherina	células endoteliales	uniones adherentes	desarrollo vascular anormal (apoptosis de las células endoteliales)
Cadherinas no clásicas			
Desmocolina	piel	desmosomas	trastorno que produce vesículas en la piel
Desmogleína	piel	desmosomas	trastorno que produce vesículas en la piel a consecuencia de la pérdida de la adhesión intercelular de los queratinocitos
T-cadherina	neuronas, músculo, corazón	ninguno	desconocido
Cadherina 23	oído interno, otros epitelios	uniones entre esterocilios en células con pelos sensoriales	sordera
Fat (en *Drosophila*)	epitelios y sistema nervioso central	uniones transmisoras de señal (polaridad de células planar)	aumento del tamaño de los discos imaginales y tumores; polaridad de células planar interrumpida
Fat1 (en mamíferos)	varios epitelios y sistema nervioso central	hendidura del diafragma del glomérulo renal y otras uniones	pérdida de hendidura del diafragma; trastornos en cerebro y ojo
α, β y γ-protocadherinas	neuronas	sinapsis químicas y membranas no sinápticas	degeneración neuronal
Flamingo	epitelios sensoriales y otros epitelios	uniones intercelulares	células con polaridad planar interrumpida; defectos en el tubo neural

Ca^{2+} es eliminado, las regiones bisagra se pueden flexionar y el conjunto de la estructura se vuelve flexible. Se supone que al mismo tiempo la conformación del extremo N-terminal cambia un poco y disminuye la afinidad por la molécula de cadherina de la célula opuesta. Así, las moléculas de cadherina desestabilizadas por la pérdida de Ca^{2+} son rápidamente degradadas por enzimas proteolíticas.

A diferencia de lo que ocurre con los receptores para moléculas de señalización solubles, los cuales se unen con una elevada afinidad a sus ligandos específicos, las cadherinas (como la mayoría de otras proteínas de adhesión intercelular) se unen a otras cadherinas con una afinidad relativamente baja. Para que la unión sea fuerte, se han de formar muchas de estas uniones débiles al mismo tiempo. Cuando se unen a sus parejas, orientadas en sentido opuesto en otra célula, a menudo las moléculas de cadherina se agrupan de forma lateral con otras cadherinas de la misma célula. De esta manera un gran número de moléculas de cadherina agrupadas lateralmente colaboran formando una unión de anclaje (Figura 19–9C). La fuerza de esta unión es bastante mayor que cualquiera de los enlaces intermoleculares individuales; esta unión es fácil de deshacer separando sus moléculas secuencialmente, como dos piezas de ropa que están unidas con fuerza por Velcro y, sin embargo, se pueden separar con facilidad. Un "principio Velcro" semejante a éste es operativo en las adhesiones intercelulares y célula-matriz en las que intervienen otras proteínas transmembrana adhesivas. La formación y rup-

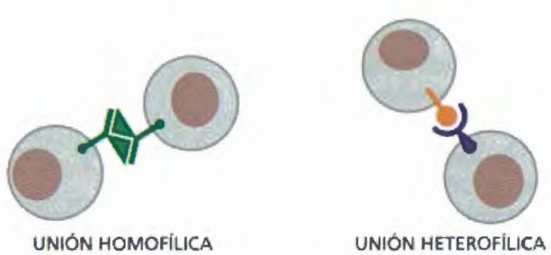
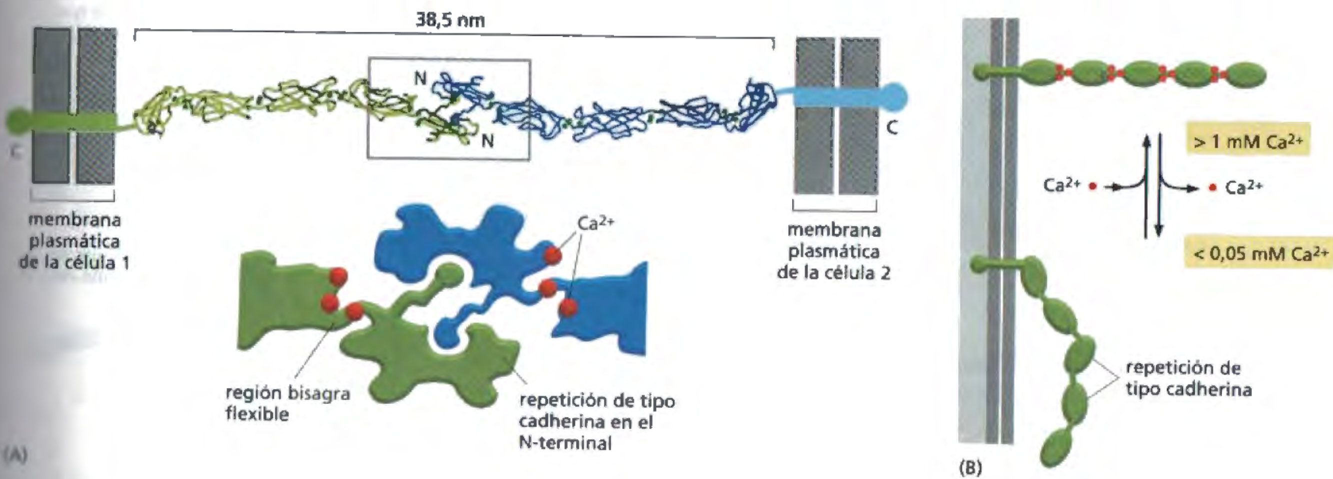


Figura 19–8 Uniones homofílicas y uniones heterofílicas. Por lo general, las cadherinas se unen de forma homofílica; otras moléculas de adhesión, tratadas más adelante, se unen de forma heterofílica.



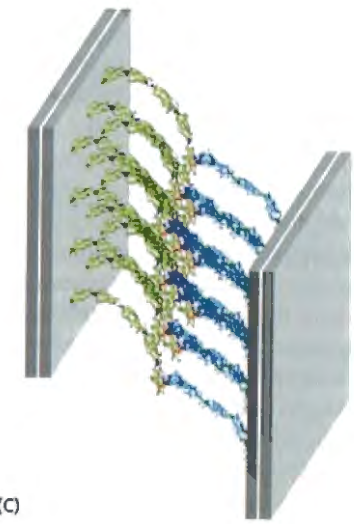


Figura 19–9 Estructura y función de las cadherinas. (A) Dominio extracelular de una cadherina clásica (C-cadherina) e hipótesis sobre el tipo de unión homofílica de dos moléculas de cadherina de células opuestas: extremo con extremo. Estructura obtenida por difracción de rayos X del dominio extracelular de una C-cadherina cristalizada. (B) La región extracelular de cada uno de los polipéptidos consiste en una serie de dominios compactados llamados repeticiones de tipo cadherina, los cuales están unidos por regiones flexibles tipo bisagra que evitan, junto con el Ca^{2+} que se une a ellas, que la molécula se flexione. En ausencia de Ca^{2+}, la molécula se vuelve flácida y la adhesión no se produce. (C) En una unión típica, varias moléculas de cadherina se disponen en paralelo funcionando como un Velcro que las mantiene unidas. Se supone que las cadherinas de una misma célula se emparejan lateralmente en sus regiones N-terminales, y a través de la unión de sus colas intracelulares mediante otras proteínas (no se muestra). (Basado en T.J. Boggon et al., *Science* 296:1308-1313, 2002. Con la autorización de AAAS.)

una de las uniones de anclaje desempeña un papel vital en el desarrollo y en la constante renovación de los tejidos en muchas partes del organismo maduro. <CGAA>

La adhesión selectiva célula-célula posibilita a las células disociadas de vertebrados reagruparse en tejidos organizados

Las cadherinas forman anclajes homofílicos específicos, lo que explica por qué existen tantos miembros diferentes en la familia. Estas proteínas no actúan como una cola que deja las superficies pegajosas, sino que median un reconocimiento altamente específico por el cual se unen las células del mismo tipo y permanecen segregadas de otros tipos celulares.

Este sistema selectivo mediante el cual las células animales se unen entre sí ya fue demostrado hace más de 50 años, mucho antes del descubrimiento de las cadherinas, en experimentos en que los embriones de anfibios eran disociados en células individuales. Estas células fueron mezcladas para estudiar su reasociación. Curiosamente, a menudo las células disociadas se reagrupaban *in vitro* formando estructuras parecidas a las del embrión original (**Figura 19–10**). El mismo fenómeno sucede si se disocian las células de dos órganos embrionarios de vertebrados, tales como el hígado y la retina y se mezclan formando un aglomerado. En este caso, los agregados entremezclados se separarán de forma gradual en

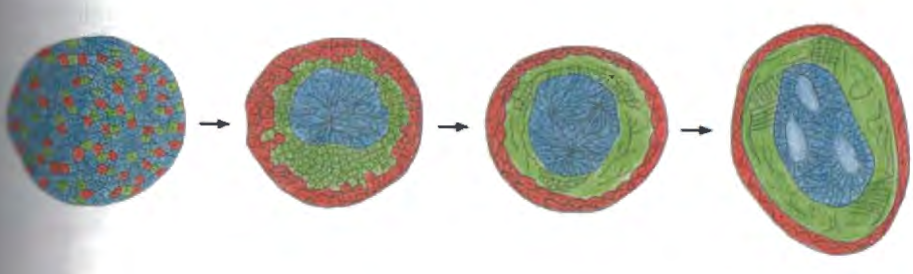


Figura 19–10 Clasificación. Células de diferentes zonas de un embrión de anfibio se segregan dependiendo de su origen. Se muestra un experimento clásico en el que se han desagregado células mesodérmicas (en *verde*), células de la placa neural (en *azul*) y células epidérmicas (en *rojo*) y posteriormente se reagrupan. Estas células se clasificarán según la organización reminiscente de un embrión normal, con una "placa neural" interna, una epidermis externa y un mesodermo entre ambas. (Modificado de P.L. Townes y J. Holtfreter, *J. Exp. Zool.* 128:53-120, 1995. Con la autorización de Wiley-Liss.)



Figura 19–11 Dispersión y agrupamiento selectivos de células formando diferentes tejidos en un embrión de vertebrado. Algunas de las células que al principio forman parte del tubo neural alteran sus propiedades adhesivas y se segregan del epitelio formando la cresta neural en la parte superior del tubo neural. Posteriormente, las células migran y dan lugar a diversos tipos celulares y tejidos en el embrión. Aquí se muestran agregándose y diferenciándose formando dos grupos de neuronas, denominados ganglios, en el sistema nervioso periférico. Mientras que algunas células de la cresta neural se diferencian en neuronas del ganglio, otras lo hacen en células satélite (células gliales especializadas en dar soporte) que rodean a las neuronas. El cambio de patrón de expresión de moléculas de adhesión permite estos ajustes estructurales.

función de su órgano de origen. Por lo general, las células disociadas se adhieren más fácilmente a los agregados de su propio órgano que a los agregados de otros órganos. Es evidente que existen sistemas de reconocimiento intracelular que hacen que las células de un mismo tejido diferenciado se adhieran entre sí de manera preferente.

Estos resultados sugieren que en los animales la arquitectura tisular no es un producto de la historia, sino que está organizada activamente y se mantiene por el sistema de afinidades que existen entre ellas y con la matriz extracelular. Además, en el embrión en desarrollo podemos seguir las células mientras se diferencian y podemos observar cómo se desplazan y se reagrupan mediante adhesiones selectivas formando nuevas estructuras. Algunos de estos desplazamientos son sutiles, mientras que otros son más evidentes, incluyendo migraciones de largo alcance, tal como describiremos en el Capítulo 22. Por ejemplo, en los embriones de vertebrados las células de la *cresta neural* abandonan el epitelio del tubo neural, del cual forman parte inicialmente, y migran a lo largo de vías específicas a otras muchas regiones. Allí se reagrupan con otras células formando diversos tejidos, incluido el tejido nervioso periférico (**Figura 19–11**). Para encontrar su camino, las células son guiadas a lo largo de los tejidos embrionarios mediante *quimiotaxis* o *quimiorrepulsión*, es decir, que el desplazamiento se encuentra bajo la influencia de moléculas solubles que atraen o repelen a las células en migración. También puede ocurrir un *contacto guiado* mediante el cual las células que migran entran en contacto con otras células o elementos de la matriz extracelular, realizando adhesiones temporales que controlan la vía escogida. Cuando las células en migración alcanzan su destino, para organizarse en un tejido tienen que reconocer a otras células del tipo apropiado y unirse a ellas. En todos estos procesos de selección, contacto guiado y ensamblaje tisular, las cadherinas desempeñan un papel esencial.

Las cadherinas controlan la mezcla selectiva de las células

La aparición y desaparición de cadherinas específicas están correlacionadas con las etapas del desarrollo embrionario en las que las células se reagrupan y cambian sus contactos dando lugar a nuevas estructuras tisulares. Así, por ejemplo, mientras se forma el tubo neural y se separa del ectodermo, las células de este tubo pierden la expresión de E-cadherina y adquieren la expresión de otras cadherinas, incluyendo la N-cadherina, mientras que las células del ectodermo continúan expresando E-cadherina (**Figura 19–12**A, B). Después, cuando las células de la cresta neural migran desde el tubo neural, estas cadherinas son difícilmente detectables, mientras que otra cadherina (la cadherina-7) mantiene unidas a las células en migración dando lugar a grupos poco asociados (Figura 19–12C). Por último, cuando las células se agregan formando un ganglio, vuelven a expresar N-cadherina (véase Figura 19–11). Si la N-cadherina se sobreexpresa de forma artificial en células de la cresta neural emergente, éstas no pueden abandonar el tubo neural.

Estudios realizados con cultivos celulares sostienen la hipótesis de que la unión homofílica de las cadherinas controla estos procesos de segregación tisular. Por ejemplo, si células de la línea celular de fibroblastos en cultivo, denominadas *células L* (las cuales no expresan cadherinas y tampoco se adhieren entre ellas) son transfectadas con DNA que codifica la E-cadherina, adquieren la capacidad de adherirse y esta adhesión es inhibida con anticuerpos anti-E-cadherina. Dado que las células L transfectadas no se adhieren a las no transfectadas, podemos concluir que esta adhesión depende de la unión entre dos E-cadherinas de células diferentes. Si se mezclan células L que expresan diferentes cadherinas, éstas se segregarán y se agregarán selectivamente, indicando que diferentes cadherinas se unen de manera preferencial con las de su propio tipo (**Figura 19–13**A), mimetizando lo que sucede cuando se mezclan células que proceden de diferentes tejidos. Si se mezclan células L que

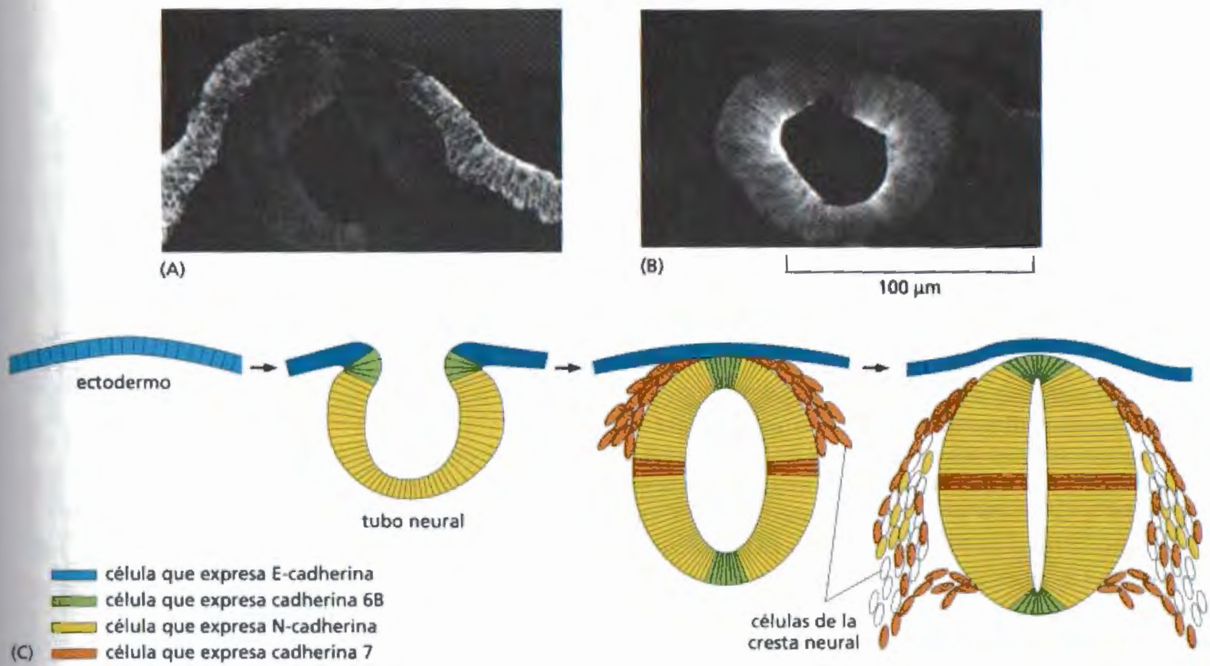


Figura 19–12 Cambios de patrón de expresión de las cadherinas durante la construcción del sistema nervioso. Se muestran secciones transversales de un embrión de pollo y de qué forma el tubo neural se separa del ectodermo y las células de la cresta neural se separan del tubo neural. (A, B) Imágenes de inmunofluorescencia mostrando el tubo neural en desarrollo marcado con anticuerpos contra (A) E-cadherina y (B) N-cadherina. (C) Con el cambio de expresión génica, los diferentes grupos de células se segregan unos de otros según las cadherinas que expresan. (Micrografías por cortesía de Kohei Hatta y Masatoshi Takeichi.)

...an diferentes cantidades de la misma cadherina, tiene lugar una segregación celular del ...o tipo (Figura 19–13B). Por lo tanto, parece probable que las diferencias cuantitativas y ...tivas en la expresión de las cadherinas participan en la organización de los tejidos.

Twist regula las transiciones epitelio-mesenquimáticas

...mblaje de las células formando un epitelio es un proceso reversible. Las células disper... y no adheridas, que a menudo se denominan *células mesenquimáticas*, pueden reunirse ...ndo un epitelio si se activa la expresión de sus moléculas de adhesión. Al contrario, las ...s epiteliales pueden cambiar su carácter, segregarse y migrar lejos de su epitelio de ori... como entidades individuales. Tales *transiciones epitelio-mesenquimáticas* tienen un ... importante en el desarrollo embrionario normal como, por ejemplo, en el origen de la ... neural (véase Figura 19–11). Parece que para estas transiciones resulta esencial un sis... de control en el que participa un grupo de genes reguladores denominados Slug, Snail ... Twist, que tienen a la E-cadherina como diana. Así, por ejemplo, en diversos tejidos de ...s y de vertebrados, si se activa la expresión de Twist, las células epiteliales adquieren ...otipo mesenquimático, mientras que si se bloquea esta expresión, sucede lo contrario.

...s transiciones epitelio-mesenquimáticas también suceden como procesos patológi... durante la vida adulta, como ocurre en el caso del cáncer. La mayoría de los cánceres se ...nan en los epitelios, pero se hacen peligrosamente propensos a diseminarse, convir...se en *malignos*, sólo cuando las células cancerosas se escapan del epitelio original e ...n otros tejidos. Experimentos realizados con cultivos de células malignas procedentes ...ncer de mama muestran que el bloqueo de la expresión de Twist puede retrotraerlas ... un carácter no maligno. A la inversa, si se estimula la expresión de Twist, se puede con... que células epiteliales normales sufran una transición epitelio-mesenquimática y se ...orten como células malignas. Twist ejerce sus efectos, al menos en parte, inhibiendo la ...ión de las cadherinas que mantienen unidas a las células epiteliales. Concretamente, ... E-cadherina es una de sus dianas. De hecho parece que a menudo las mutaciones que ...ban la producción o la función de E-cadherina también se encuentran en las células ...osas, facilitando que se vuelvan invasivas, tal como describimos en el Capítulo 20.

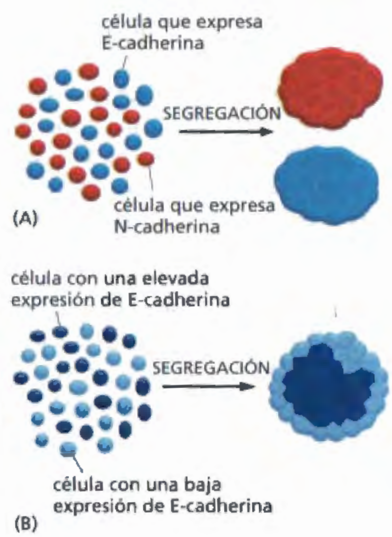


Figura 19–13 Segregación celular dependiente de cadherinas. Las células en cultivo pueden segregarse según el tipo y la concentración de las cadherinas que expresan. El proceso se puede visualizar marcando las diferentes poblaciones celulares con diferentes colorantes. (A) Las células que expresan N-cadherina se segregan de las que expresan E-cadherina. (B) Células con una alta expresión de E-cadherina son segregadas de las que presentan una baja expresión de la misma.

Las cateninas conectan las cadherinas clásicas con el citoesqueleto de actina

Los dominios extracelulares de las cadherinas median las uniones homofílicas y, por otro lado, los dominios intracelulares de las cadherinas típicas, incluyendo las clásicas y las no clásicas, proporcionan el anclaje para los filamentos del citoesqueleto: anclaje a la actina en las uniones adherentes y a los filamentos intermedios en los desmosomas, tal como se indicó anteriormente (véase Figura 19–3). La unión al citoesqueleto es indirecta y depende de un grupo de *proteínas de anclaje intracelular* accesorias que se ensamblan en la cola de la cadherina. Esta unión, que conecta la cadherina a la actina o a filamentos intermedios, incluye diferentes componentes (**Figura 19–14**). Estos componentes varían según el tipo de anclaje pero, en general, las que tienen un papel más relevante son la *β-catenina* y/o la *γ-catenina* (*placoglobina*), que están muy relacionadas con la primera.

En las uniones adherentes, también se encuentra presente un pariente lejano de este par de proteínas, la *catenina-p120*, que colabora en la regulación del ensamblaje del complejo. Cuando la catenina-p120 es eliminada de forma artificial, las cadherinas son rápidamente degradadas y se pierde la adhesión intercelular. Un incremento artificial en la cantidad de catenina-p120 tiene un efecto opuesto. Es posible que las células utilicen variaciones en la cantidad de catenina-p120, o en su estado de fosforilación, como una vía para regular la fuerza de unión. En cualquier caso, parece que la unión a la actina es esencial para que se produzca una adhesión intercelular eficiente, ya que las cadherinas clásicas que carecen de su dominio citoplasmático no pueden mantener unidas con fuerza a las células.

Las uniones adherentes coordinan la motilidad basada en la actina en células adyacentes

Las uniones adherentes constituyen una parte esencial de la maquinaria que moldea la forma de las estructuras pluricelulares en los animales. La unión indirecta de los filamentos de una célula a los de sus vecinas permite a las células de un tejido utilizar sus citoesqueletos de actina de forma coordinada.

Las uniones adherentes se presentan de diferentes formas. En muchos tejidos no epiteliales, aparecen como anclajes puntuales o dispuestos en bandas que conectan indirectamente los filamentos de actina cortical por debajo de las membranas plasmáticas de dos células adyacentes. En el músculo cardíaco (tratado en el Capítulo 23), anclan los haces de actina del aparato contráctil y actúan en paralelo con desmosomas uniendo las células contráctiles. En el músculo, los lugares en los que se producen las uniones intercelulares son tan evidentes que se pueden observar en secciones teñidas al microscopio óptico y reciben el nombre de *discos intercalados*. Pero los ejemplos prototípicos de uniones adherentes se producen en los epitelios, en los que a menudo forman un **cinturón de adhesión** continuo (o *zonula adherens*) justo debajo de la cara apical del epitelio, rodeando cada una de las células que interactúan en la lámina (**Figura 19–15**). En el interior de cada célula, adyacente al cinturón de adhesión, se encuentra un haz contráctil de filamentos de actina orientados de forma paralela a la membrana plasmática y sujetos a ella por cadherinas y proteínas intracelulares de anclaje. Los haces de actina están unidos mediante cadherinas y proteínas de anclaje a una extensa red transcelular. Este entramado se puede contraer con la ayuda de las miosinas (proteínas motoras tratadas en el Capítulo 16) y proporciona la fuerza motriz de un proceso fundamental en la morfogénesis animal: el plegamiento de las láminas de células epiteliales en tubos, vesículas y otras estructuras relacionadas (**Figura 19–16**).

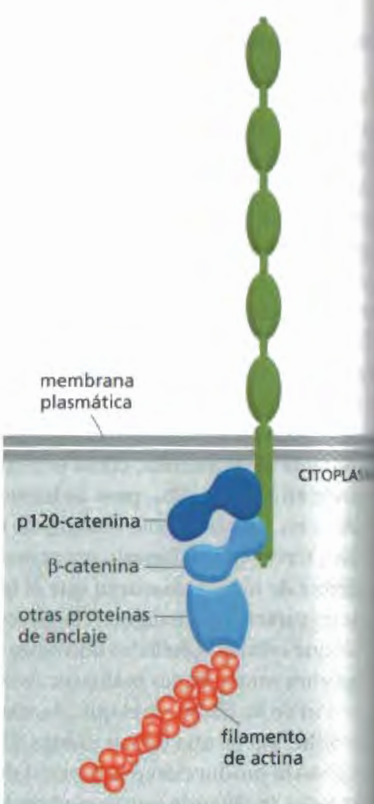


Figura 19–14 Anclaje de las cadherinas clásicas a los filamentos de actina. Las cadherinas interaccionan indirectamente con los filamentos de actina mediante la β-catenina y otras proteínas de anclaje. Es probable que la α-catenina, la vinculina y la placoglobina (una proteína homóloga a la β-catenina, también denominada γ-catenina) estén presentes en la unión o que intervengan en el control de este ensamblaje, pero los detalles del anclaje todavía no se conocen bien. Otra proteína intracelular, denominada p120-catenina, también se une a la cola citoplasmática de las cadherinas, regulando su función. La β-catenina ejerce también funciones en la señalización intracelular, como se describió en el Capítulo 15 (véase Figura 15–77).

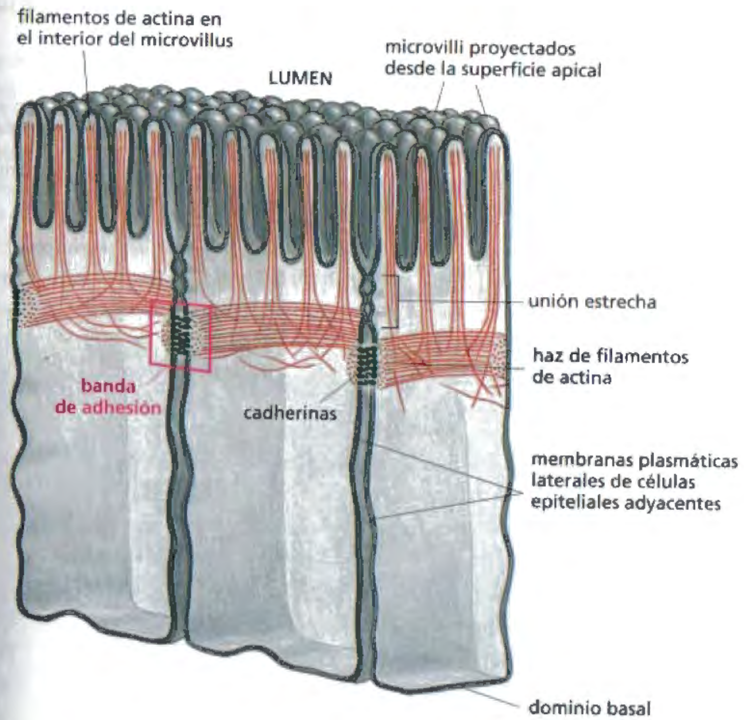


Figura 19–15 Uniones adherentes entre células epiteliales del intestino delgado. Estas células están especializadas en la absorción de nutrientes; en su cara apical, en contacto con el lumen del intestino, presentan numerosas microvellosidades o microvilli (expansiones que aumentan el área de superficie de absorción). Las uniones adherentes forman una *banda de adhesión* que rodea cada una de las células interconectadas y donde se observa claramente un anillo contráctil de filamentos de actina a lo largo de la cara citoplasmática de la región membranosa implicada en la unión. Los haces de filamentos de actina se encuentran anclados a las cadherinas por proteínas de anclaje intracelular. Las cadherinas se extienden por la membrana plasmática y sus dominios extracelulares se unen de forma homofílica a otras cadherinas de las células vecinas. De este modo, los haces de filamentos de actina de células adyacentes permanecen enlazados.

Los desmosomas confieren resistencia mecánica a los epitelios

Los desmosomas son estructuralmente similares a las uniones adherentes pero no se enlazan a actina sino a filamentos intermedios. Su principal función es proporcionar resistencia mecánica. Los desmosomas son importantes en los vertebrados, pero no se encuentran, por ejemplo, en *Drosophila*. Están presentes en la mayoría de los epitelios maduros de vertebrados y son muy abundantes en la epidermis, el epitelio que forma la capa externa de la piel. A menudo, para los estudios bioquímicos, se utiliza la epidermis bucal de las vacas, la cual tiene que soportar una agresión mecánica constante cuando el animal pasta.

La **Figura 19–17**A muestra la estructura general de un desmosoma; la Figura 19–17B muestra algunas de las proteínas que lo forman. Los desmosomas suelen aparecer como manchas, en forma de botones, de adhesión intercelular, remachando las células entre sí

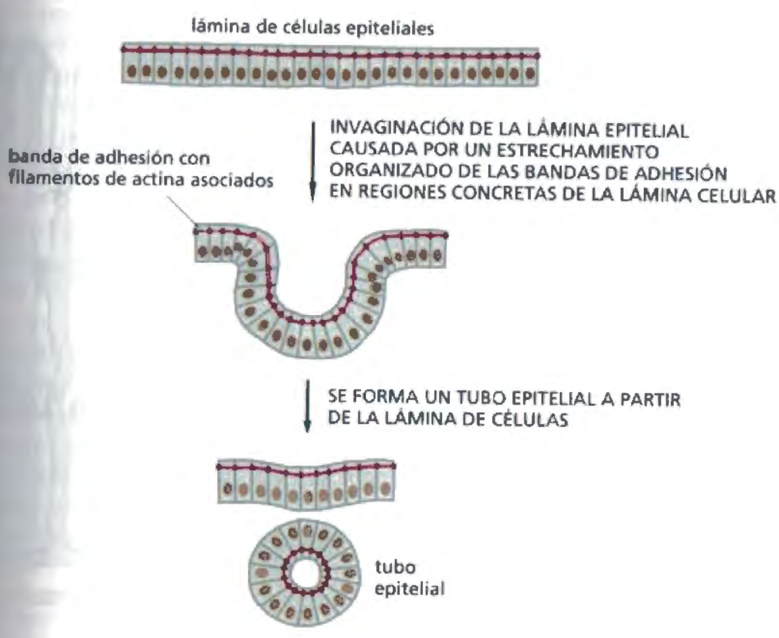


Figura 19–16 Plegamiento de una lámina epitelial formando un conducto. La contracción orientada de haces de filamentos de actina situados a lo largo de la banda de adhesión provoca el estrechamiento en las zonas apicales de las células epiteliales permitiéndoles formar un tubo. Un ejemplo de este fenómeno es la formación del tubo neural en los primeros estadios embrionarios de los vertebrados (véase Figura 19–12 y Capítulo 22). Aunque no se representan, se supone que los reordenamientos celulares en el seno de la lámina epitelial también desempeñan un papel importante en el desarrollo del proceso.

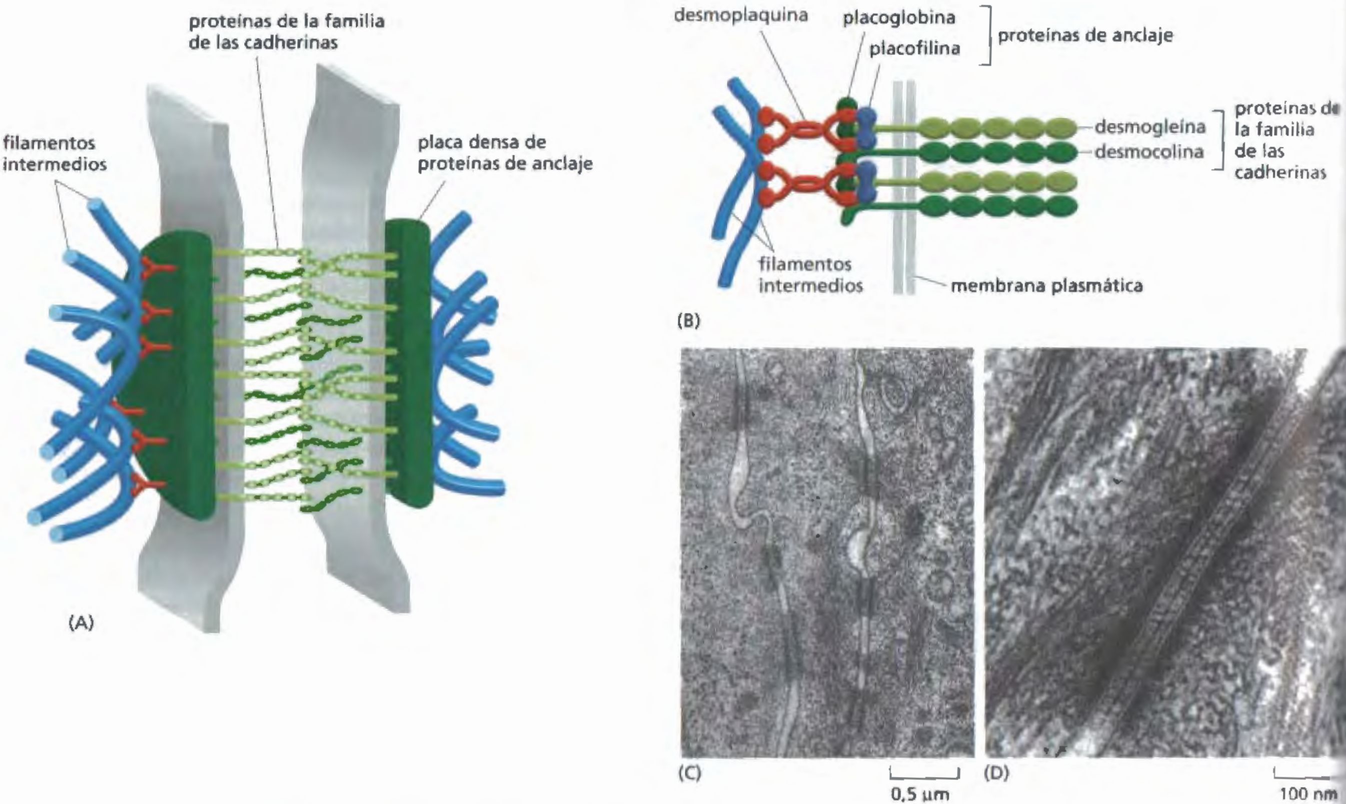


Figura 19–17 Desmosomas. (A) Componentes estructurales de un desmosoma. Sobre la superficie citoplasmática de las membranas que interactúan se organiza una placa densa compuesta por un conjunto de proteínas intracelulares de adhesi Un haz de filamentos de queratina se ancla a cada placa. Las proteínas transmembrana de adhesión de la familia de las cadherinas se unen a las placas e interaccionan mediante sus dominios extracelulares manteniendo unidas las células a trav de un mecanismo dependiente de Ca^{2+}. (B) Algunas de las moléculas que forman un desmosoma. Desmogleína y desmoco son miembros de la familia de las cadherinas. Sus colas citoplasmáticas se unen a la *placoglobina* (γ-catenina) y a la *placofili* (relativamente homóloga a la p120-catenina), las cuales, a su vez, se une a la *desmoplaquina*. Ésta también interacciona de forma lateral con los filamentos intermedios y, de esta manera, ancla el desmosoma a dichos filamentos. (C) Imagen obtenid por microscopía electrónica correspondiente a desmosomas situados entre dos células epiteliales en la piel de un ratón rec nacido. (D) Parte del mismo tejido a mayor aumento para mostrar un desmosoma en el que se observa claramente su ancla a filamentos intermedios. (C y D, de W. He, P. Cowin y D.L. Stokes, *Science* 302:109-113. Con la autorización de AAAS.)

(Figura 19–17C). En el interior de la célula, los haces en forma de cordón de filamentos intermedios, que están anclados a los desmosomas, forman una estructura de gran resistencia a la tracción (Figura 19–17D), se unen a haces similares de las células adyacentes y generan un entramado que se extiende por todo el tejido (**Figura 19–18**). El tipo de filamentos intermedios que se une a los desmosomas depende del tipo de célula: por ejemplo, en células epiteliales existen *filamentos de queratina* y en las células de músculo cardíaco, *filamentos de desmina.*

La importancia de los desmosomas queda demostrada en algunas formas de una grave enfermedad de la piel, el *pénfigo*. Los individuos afectados por esta enfermedad fabrican anticuerpos contra una de sus propias cadherinas desmosomales. Estos anticuerpos reconocen y degradan las uniones desmosomales que mantienen unidas a sus células epidérmicas (los queratinocitos). Este hecho se traduce en un grave trastorno de la piel con formación de ampollas y pérdida de fluidos corporales.

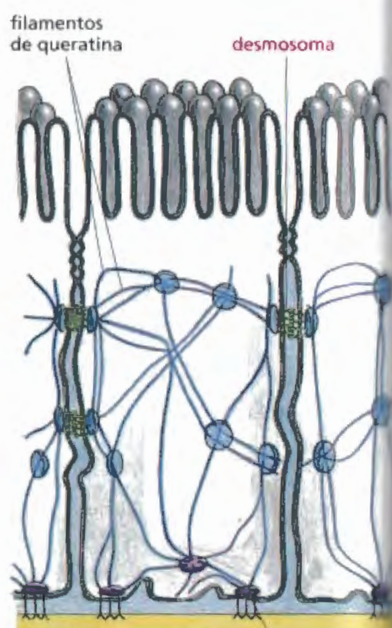


Figura 19–18 Desmosomas, hemidesmosomas y la red de filamentos intermedios. Las redes de filamentos de queratina de dos células adyacentes –en este ejemplo, células epiteliales del intestino delgado– están conectadas indirectamente a través de los desmosomas y con la lámina basal a través de los hemidesmosomas.

Las uniones intercelulares envían señales al interior de la célula

La formación y ruptura de las uniones son acontecimientos importantes en la vida de las células e inducen grandes cambios en su funcionamiento interno. Del mismo modo, pero en un sentido inverso, cambios en el estado interno de la célula tienen que ser capaces de desencadenar la formación o ruptura de sus uniones. Por lo tanto, existe una intercomunicación compleja entre la maquinaria de adhesión y las vías de señalización química. Se ha descrito cómo los cambios en la catenina-P120 pueden regular la formación de uniones adherentes y cómo varias vías de señalización intracelular pueden controlar la formación de uniones mediante la fosforilación de ésta y de otras proteínas de unión. Más adelante se describirá el modo en que la formación y ruptura de adhesiones pueden enviar señales al interior celular a través de mecanismos en los que participan *proteínas de armazón* en la cara intracelular de la unión.

Otro de los principales componentes de la interacción recíproca entre adhesión y señalización es la β-catenina. En este capítulo ya se ha mencionado que es una proteína intracelular de anclaje fundamental en las uniones adherentes, uniendo las cadherinas a los filamentos de actina. En el Capítulo 15 apareció en otro contexto, como un componente de la vía de señalización de WNT, trasladándose del citoplasma al núcleo donde activa la transcripción de genes diana. Distintas partes de la molécula ejercen la función adhesiva y la función reguladora de genes, pero una sola molécula no puede ejercer ambas funciones a la vez. La desintegración de una unión adherente puede liberar moléculas de β-catenina de manera que se trasladan desde la superficie celular al núcleo como moléculas de señalización y, por el contrario, las actividades de los componentes de la vía de señalización de Wnt (que regulan la fosforilación y la degradación de β-catenina) pueden controlar la disponibilidad de β-catenina para formar uniones adherentes.

Algunas cadherinas no clásicas transmiten la señal al interior de la célula por otras vías. Por ejemplo, los miembros de la subfamilia Flamingo presentan siete dominios transmembrana, lo que sugiere que podrían actuar como receptores acoplados a proteínas G. La cadherina endotelial vascular (VE-cadherina: *vascular endothelial-cadherin*) es otro ejemplo de ello, ya que no sólo media la adhesión entre células endoteliales, sino que también es necesaria para la supervivencia de estas células. Así, a pesar de que las células endoteliales que no expresan VE-cadherina se pueden adherir a otras células a través de N-cadherinas, no sobreviven, ya que para que puedan responder a la proteína extracelular *factor de crecimiento vascular endotelial* (VEGF: *vascular endothelial growth factor*), que proporciona una señal para la supervivencia, este factor tiene que unirse a un receptor tirosina quinasa (tratado en el Capítulo 15) que requiere VE-cadherina como correceptor.

Las selectinas median las uniones intercelulares transitorias en el sistema vascular

La superfamilia de las cadherinas es fundamental para la adhesión intercelular en los animales, pero por lo menos existen otras tres superfamilias de proteínas de adhesión que también son importantes: las *integrinas*, las *selectinas* y los miembros de la *superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig)* de adhesión. Más adelante trataremos las integrinas con más detalle: su función principal consiste en la adhesión célula-matriz, pero en circunstancias especiales algunas de ellas median la adhesión intercelular. La dependencia al Ca^{2+} permite diferenciar de forma sencilla, mediante ensayos experimentales, las diferentes clases de proteínas. Las selectinas, del mismo modo que las cadherinas y las integrinas, requieren Ca^{2+} para sus funciones adherentes, mientras que los componentes de la familia de las Ig no lo requieren.

Las selectinas son proteínas de membrana con capacidad para reconocer glúcidos (*lectinas*) y median diferentes adhesiones intercelulares en el compartimiento vascular. Su función principal, al menos en vertebrados, está relacionada con las respuestas inflamatorias y con la regulación del tráfico de los leucocitos. Los leucocitos llevan una vida nómada e itinerante entre la sangre y los tejidos lo cual requiere un comportamiento especial de adhesión. Las selectinas controlan la unión de estos leucocitos de la sangre a las células endoteliales de los vasos sanguíneos y facilitan la migración hacia los tejidos circundantes.

Cada selectina es una proteína transmembrana con un dominio lectina muy conservado que se une a un oligosacárido específico expresado por otra célula (**Figura 19–19**A). Por lo menos existen tres tipos de selectinas: la *L-selectina* en los glóbulos blancos de la sangre, la *P-selectina* en las plaquetas sanguíneas y en las células endoteliales tras su activación local

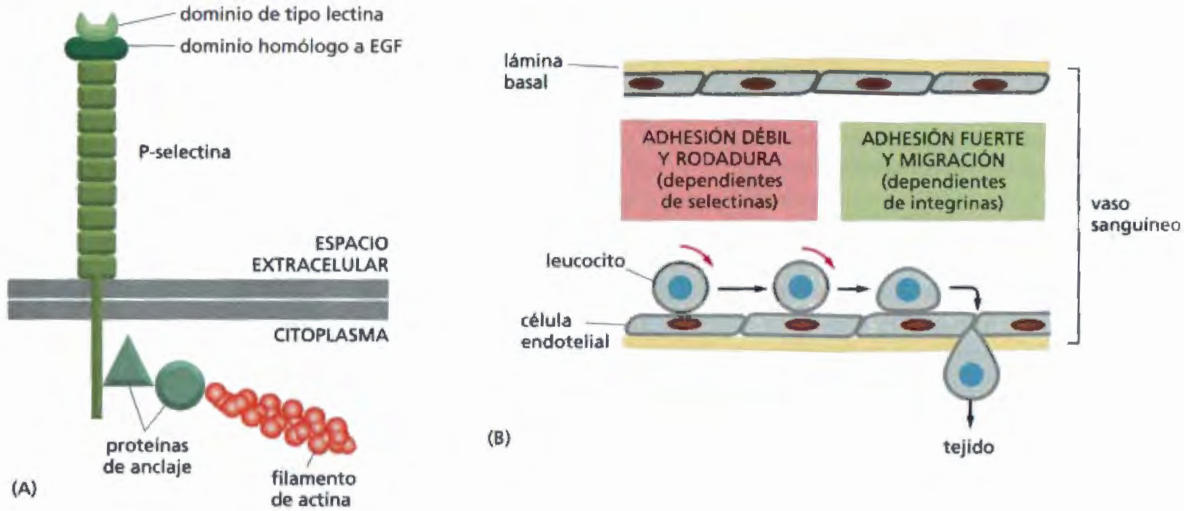


Figura 19–19 Estructura y función de las selectinas. (A) Estructura de la P-selectina. La selectina interacciona con el citoesqueleto de actina mediante proteínas de anclaje que todavía están mal caracterizadas. (B) Mecanismo por el que las selectinas y las integrinas median las adhesiones intercelulares necesarias para que los leucocitos migren desde el torrente sanguíneo hasta los tejidos. Primero, las selectinas de las células endoteliales se unen a los oligosacáridos de los leucocitos de manera que estos últimos se adhieren levemente a la pared de los vasos sanguíneos. Entonces, los leucocitos activan una integrina (generalmente llamada LFA1) en la membrana plasmática para que ésta se pueda unir a una proteína denominada ICAM1 (de la familia de las Ig) en la membrana de la célula endotelial. Este hecho crea una unión fuerte que permite a los leucocitos atravesar los vasos.

por una respuesta inflamatoria y la *E-selectina*, que también se expresa en las células endoteliales activadas. En los órganos linfoides, como por ejemplo un nódulo linfático o la amígdala, las células endoteliales expresan oligosacáridos que son reconocidos por la L-selectina de los linfocitos, lo que dará lugar a su adhesión y posterior infiltración en dichos órganos. En tejidos inflamados, los papeles se invierten: las células endoteliales activan la expresión de selectinas que reconocen oligosacáridos expresados por leucocitos y plaquetas circulantes, facilitando su intervención con objeto de resolver la disfunción local. Las selectinas actúan en colaboración con las integrinas, que refuerzan la unión de las células sanguíneas al endotelio. La adhesión intercelular mediada por selectinas e integrinas es *heterofílica*, es decir, se unen a moléculas de tipos diferentes. En efecto, las selectinas se unen a oligosacáridos específicos de glucoproteínas y glucolípidos mientras que las integrinas lo hacen a proteínas específicas.

Para que los leucocitos abandonen la sangre y entren en los tejidos las selectinas y las integrinas actúan secuencialmente (Figura 19–19B). Las selectinas median una adhesión laxa dado que la unión del dominio lectina con el ligando glucídico es de baja afinidad. Esto permite a los leucocitos adherirse reversiblemente al endotelio, rodando sobre su superficie a favor del flujo sanguíneo. Esta situación se mantiene hasta que el leucocito activa sus integrinas. Como se indicará más adelante, estas proteínas transmembrana pueden cambiar a una conformación adherente que les permita agarrarse a otras proteínas externas a la célula, en este caso, a las proteínas superficiales de las células endoteliales. Una vez se ha unido de este modo, el leucocito se escapa de la corriente sanguínea hacia el tejido arrastrándose entre las células endoteliales del vaso.

Las proteínas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas median la adhesión célula-célula independiente de Ca^{2+}

En las células endoteliales, las principales proteínas que son reconocidas por las integrinas se denominan *ICAM* (*intercellular cell adhesión molecules*) o *VCAM* (*vascular cell adhesion molecules*). Estas proteínas son miembros de otra antigua gran familia de moléculas de superficie celular: la **superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig)**. Estas proteínas tienen uno o más dominios del tipo Ig, los cuales son característicos de las moléculas de anticuerpo (se describe en el Capítulo 25), pero tienen muchas otras funciones fuera del sistema inmunológico que no están relacionadas con la defensa inmunológica.

Mientras que las ICAM y las VCAM de las células endoteliales median la unión heterofílica a integrinas, parece que otros miembros de la superfamilia Ig median uniones homofílicas. Un ejemplo de ello se encuentra en la *molécula de adhesión de células neurales* (*NCAM*: *neural-cell adhesion molecule*), la cual se expresa en varios tipos celulares, incluyendo la mayoría de células nerviosas, y puede presentar diferentes formas dependiendo de la maduración alternativa del transcrito de RNA producido por un solo gen (**Figura 19–20**). Algunas formas de NCAM tienen una extraordinaria cantidad de ácido siálico (con cadenas

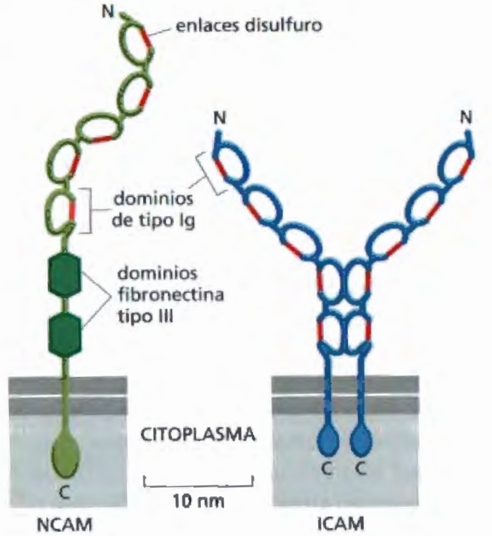


Figura 19–20 Dos moléculas de adhesión intercelular de la familia de las Ig. La NCAM se expresa en neuronas y en otros tipos celulares, y media uniones homofílicas. En este esquema se muestra sólo la columna central de la NCAM, la cual presenta cadenas de ácido siálico (un polisacárido) covalentemente unidas a ella, que dificultan así su adhesión. La ICAM se expresa en células endoteliales y en otros tipos celulares, y se une de manera heterofílica a una integrina localizada en los leucocitos.

que contienen cientos de residuos de ácido siálico). En virtud de su carga negativa, estas largas cadenas de ácido siálico dificultan la adhesión celular, ya que cargas del mismo signo se repelen mutuamente. Así, las NCAM con alto contenido en ácido siálico podrían incluso inhibir la adhesión, más que favorecerla.

Por lo general un determinado tipo celular utiliza varias proteínas de adhesión diferentes para interactuar con otras células, de la misma forma que cada célula utiliza varios receptores diferentes que reconocen a varias moléculas solubles extracelulares, como las hormonas y los factores de crecimiento del medio. A pesar de que a menudo las cadherinas y los miembros de la familia de las Ig se expresan en las mismas células, las adhesiones mediadas por las cadherinas son mucho más fuertes y son las principales responsables del mantenimiento de la unión entre células, lo que permite la segregación de grupos celulares dentro de tejidos específicos manteniendo, al mismo tiempo, la integridad de estos tejidos. Por su parte, las NCAM estarían implicadas en la regulación fina de las interacciones adhesivas durante el desarrollo y la regeneración, participando en varios fenómenos específicos de adhesión. Así, mientras que los ratones mutantes que no tienen N-cadherina mueren en los primeros estadios de desarrollo, los que no tienen NCAM presentan un desarrollo relativamente normal, aunque muestran defectos en el desarrollo de determinados tejidos, incluyendo regiones del sistema nervioso.

En la formación de una sinapsis actúan numerosos tipos de moléculas de adhesión en paralelo

Las células del sistema nervioso guían el crecimiento axonal y establecen conexiones nerviosas específicas gracias a sistemas complejos de moléculas de adhesión, de la quimiotaxis y de factores de señalización solubles (tratado en el Capítulo 22). Las proteínas de adhesión de la superfamilia Ig, junto con muchas otras clases de moléculas de adhesión y de señalización, desempeñan un importante papel en estos procesos. Por ejemplo, en moscas que presentan una mutación en *Fasciclina2*, relacionada con la NCAM, algunos axones siguen vías aberrantes y no alcanzan sus objetivos correctos.

Otro miembro de la superfamilia Ig, la *Fasciclina3*, permite a los conos de crecimiento axonal reconocer sus dianas correctas una vez establecen contacto con ellas. Esta proteína se expresa de forma temporal en algunas neuronas motoras en *Drosophila*, así como en las células musculares que inerva. Si la Fasciclina3 se retira genéticamente de estas neuronas motoras, éstas no reconocen sus dianas musculares ni establecen sinapsis con ellas. En cambio, si mediante un experimento se consigue que las neuronas motoras que por lo general no expresan Fasciclina3 la expresen, establecerán sinapsis con aquellas células musculares que expresan esta molécula, a las que normalmente no se conectarían. Parece ser que la Fasciclina3 media el establecimiento de estas conexiones sinápticas a través de un mecanismo homofílico de tipo "apareamiento". Las proteínas de la superfamilia Ig tienen funciones similares en vertebrados. Así, por ejemplo las proteínas de la subfamilia *Sidekicks* median la adhesión homofílica y diferentes Sidekicks se expresan en distintas capas de la retina formando sinapsis entre grupos de células de la retina que expresan el mismo miembro de la familia de estas proteínas. Cuando el patrón de expresión de las proteínas se altera de manera artificial, el patrón de conexiones sinápticas cambia de forma consecuente.

Estos miembros de la superfamilia de las Ig no son las únicas moléculas de adhesión implicadas en la iniciación de la formación de sinapsis. La carencia de otras proteínas de adhesión sináptica, que no guardan relación con ninguno de los tipos mencionados, puede incluso producir que los conos de crecimiento formen sinapsis sobre células no neuronales a las que normalmente nunca inervarían. Así, si se provoca que células no neuronales expresen *neuroligina*, una proteína transmembrana relacionada desde un punto de vista evoluti-

vo con la enzima acetilcolinesterasa, las neuronas formarían contactos sinápticos con ellas mediante la unión de neuroligina a una proteína llamada *neurexina* ubicada en la membrana de la neurona presináptica.

Las proteínas de armazón organizan los complejos de unión

Para establecer una sinapsis, las células presinápticas y postsinápticas tienen que hacer algo más que reconocer a la otra célula y adherirse a ella: tienen que construir un complejo sistema de receptores de señal, canales iónicos, vesículas sinápticas, proteínas de acoplamiento y otros componentes, como se describe en el Capítulo 11. Este aparato de señalización sináptica no podría existir sin moléculas de adhesión celular que unan firmemente las membranas pre- y postsinápticas y faciliten el mantenimiento de todos los componentes de la maquinaria de señalización en su posición adecuada. Generalmente las cadherinas se localizan y se concentran en el entorno de la sinapsis y dentro de ella, así como las Ig y otros tipos de moléculas de adhesión. De hecho, en el sistema nervioso de los vertebrados se expresan alrededor de 20 cadherinas clásicas diferentes en diferentes combinaciones dependiendo de los subgrupos de neuronas de que se trate y es probable que las uniones específicas de estas moléculas también desempeñen un papel importante en asegurar que las neuronas establezcan sinapsis con sus dianas correctas.

Pero ¿de qué forma las moléculas de adhesión reclutan al resto de los componentes de la sinapsis y los mantienen en su lugar? Parece que las **proteínas de armazón** tienen un papel importante en este proceso. Estas moléculas intracelulares consisten en cadenas de dominios de unión a proteína entre los que se incluyen los **dominios PDZ**, segmentos de 70 aminoácidos que reconocen y se unen a las colas intercelulares C-terminal de determinadas moléculas transmembrana (**Figura 19–21**). Por ejemplo, un dominio de una proteína de armazón puede unirse a una proteína de adhesión intercelular mientras que otro puede unirse a canales iónicos unidos a ligando, e incluso otro dominio puede unirse a proteínas reguladoras de la exocitosis o la endocitosis o de unión al citoesqueleto. Además, una molécula de armazón puede unirse a otra, por lo que la célula puede reunir un conjunto de proteínas con todos los componentes necesarios para formar la sinapsis (**Figura 19–22**). Centenares de diferentes tipos de proteínas participan en esta compleja estructura. Mutaciones en proteínas sinápticas de armazón modifican el tamaño y la estructura de las sinapsis y pueden ocasionar graves disfunciones en el sistema nervioso. Entre otras cosas, tales mutaciones pueden dañar el mecanismo molecular implicado en el aprendizaje y la memoria, los cuales dependen de la capacidad que tiene la actividad eléctrica para plasmar una señal prolongada en forma de alteraciones en la arquitectura sináptica.

Las proteínas de armazón, junto con sus proteínas asociadas, participan en la organización de otras estructuras y funciones además de la sinapsis y de la señalización sináptica. La proteína *Discs-large* (*Dlg*) en *Drosophila* constituye un buen ejemplo (véase Figura 19–21). La proteína Dlg es necesaria para la construcción de una sinapsis normal pero junto a un grupo de otras proteínas relacionadas a las proteínas de armazón también desempeña un

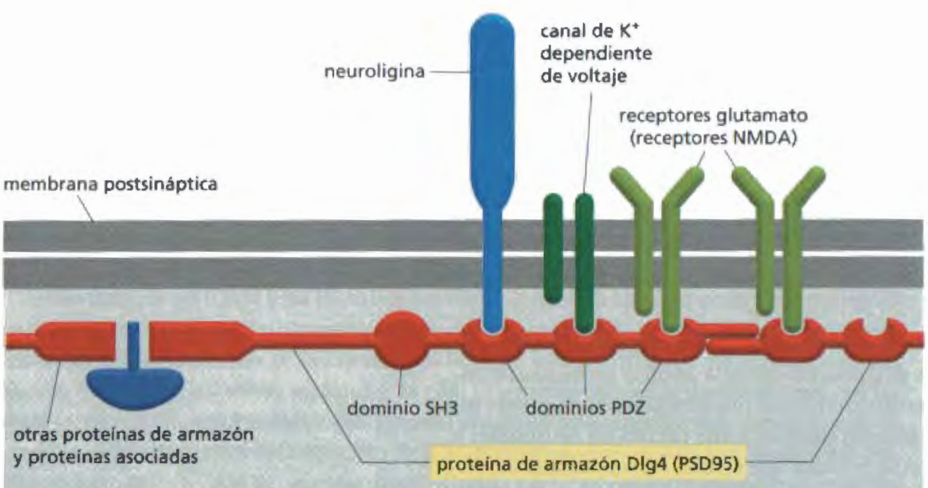
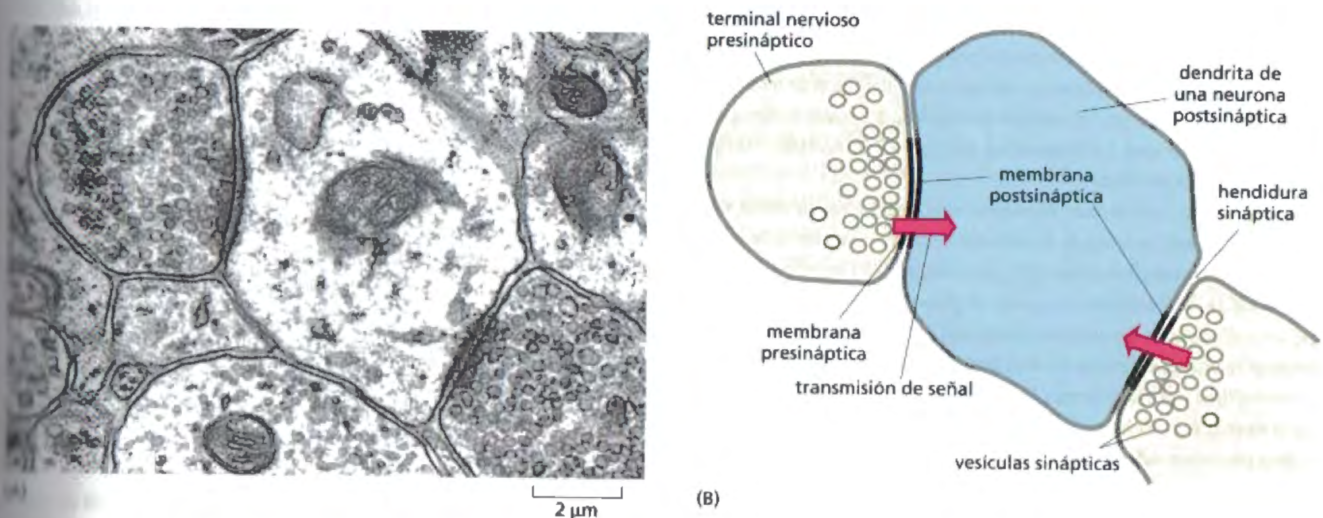


Figura 19–21 Una proteína de armazón. En este diagrama se muestra la organización de los dominios de Dlg4, un homólogo en mamíferos de la proteína Discs-large de *Drosophila*, con algunos de sus patrones de unión. Dlg4 se localiza debajo de la membrana postsináptica en la sinapsis y recibe también el nombre de proteína de densidad postsináptica 95 o PSD95. Con sus numerosos dominios de unión a proteínas la PSD95 puede enlazar diferentes componentes de la sinapsis. Una molécula de Dlg4 puede unirse a otra igual o a moléculas de armazón de distinto tipo, generando así una extensa red que mantiene unidos a todos los componentes de la sinapsis. Las proteínas de armazón también desempeñan papeles importantes en otras uniones celulares.



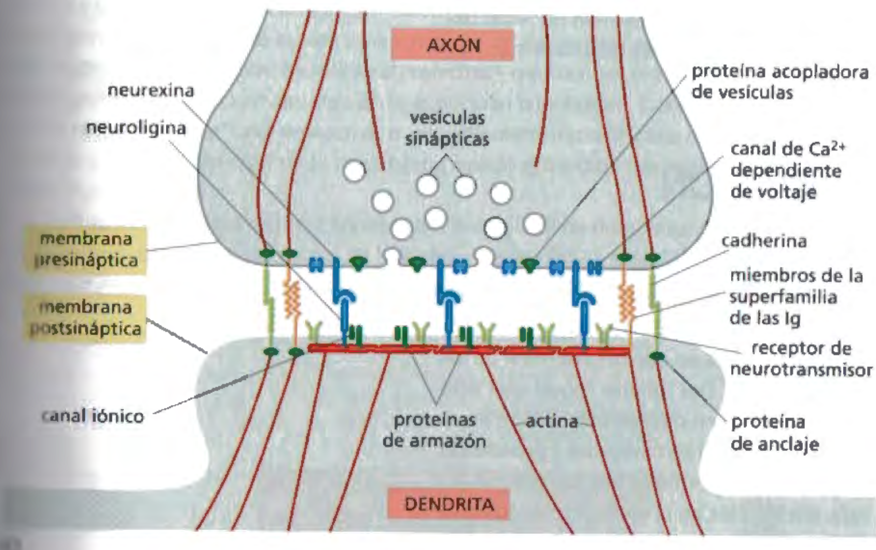


Figura 19-22 Organización de la sinapsis. (A) Electromicrografía y (B) su esquema correspondiente de la sección transversal de dos terminaciones nerviosas estableciendo sinapsis en una dendrita de cerebro de mamífero. Se observan las vesículas sinápticas en ambos terminales sinápticos y el material teñido de oscuro asociado con las membranas presinápticas y postsinápticas. (C) Esquema de varios componentes sinápticos unidos a estas regiones. Las moléculas de adhesión celular, incluyendo las cadherinas, las neroliginas y las neurexinas, mantienen las membranas presinápticas y postsinápticas unidas. Las proteínas de armazón ayudan a formar un entramado (correspondiente al material oscuro de la Figura A) que une las moléculas de adhesión por su cola intracelular a los componentes de la maquinaria de señalización sináptica, tales como los canales iónicos y los receptores de transmisores. La estructura de este complejo y gran entramado multiproteico no se conoce en detalle. Esta estructura incluye regiones de anclaje para cientos de componentes adicionales (no representadas) como las moléculas del citoesqueleto y varias quinasas y fosfatasas reguladoras. (A, por cortesía de Cedric Raine.)

papel esencial en casi todos los aspectos de la organización de los epitelios, incluida la formación de las uniones oclusivas entre las células, el control de la polaridad celular e incluso el control de la proliferación celular. Todos estos procesos dependen de la misma maquinaria, no sólo en moscas sino también en vertebrados.

Resumen

Tanto en los epitelios como en otros tipos de tejido, las células se unen de forma directa entre sí a través de fuertes adhesiones célula-célula mediadas por proteínas transmembrana que están ancladas intracelularmente al citoesqueleto. En las uniones adherentes, el anclaje se produce en los filamentos de actina, mientras que en los desmosomas, se produce en los filamentos intermedios. En ambas estructuras y en otras muchas uniones intercelulares menos intensas, las proteínas transmembrana de adhesión pertenecen a la superfamilia de las cadherinas. Por lo general estas proteínas se unen a otras de manera homofílica: la cabeza de una molécula de cadherina se une a la cabeza de otra cadherina similar de una célula adyacente. Esta especificidad permite que las poblaciones de células de diferentes tipos se dispongan de acuerdo a las cadherinas específicas que expresan, lo que ayuda a controlar la reorganización de las células durante el desarrollo, cuando diferentes tipos de cadherinas presentan patrones de expresión complejos y cambiantes. Cambios en la expresión de las cadherinas pueden someter a las células a transiciones entre un estado epitelial cohesivo y un estado mesenquimático de células libres, un fenómeno importante en el tratamiento del cáncer y en el desarrollo embrionario.

Las cadherinas "clásicas" están unidas al citoesqueleto a través de proteínas intracelulares llamadas cateninas, las cuales forman un complejo de anclaje en el dominio intracelular de la molécula cadherina y están implicadas no sólo en el anclaje físico sino también en la formación de señales intracelulares. A la inversa, las señales intracelulares pueden regular la formación de adhesiones mediadas por cadherinas. La β-catenina, por ejemplo, también es un componente clave en la vía de señalización celular de Wnt.

Además de las cadherinas, al menos otras tres clases de moléculas transmembrana también son importantes mediadoras de la adhesión intercelular: las selectinas, los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) y las integrinas. Las selectinas se expresan en leucocitos, plaquetas y células endoteliales y se unen de forma heterofílica a grupos glucídicos de la superficie celular, atrapando a los leucocitos circulantes en los lugares de inflamación. Las Ig también participan en esta captura, así como en muchos otros procesos de adhesión; algunas de ellas se unen de forma homofílica y otras de forma heterofílica. Las integrinas actúan principalmente fijando las células a la matriz extracelular, pero también pueden mediar las adhesiones intercelulares mediante su unión a proteínas de tipo Ig.

Diferentes Ig, las cadherinas y otras moléculas de adhesión intercelular intervienen en la formación de las conexiones neuronales y mantienen unidas las membranas en las sinapsis. En estas estructuras complejas, así como en otros tipos de uniones intercelulares, las proteínas intracelulares de armazón, que contienen varios dominios PDZ de unión a proteínas, desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la disposición correcta de las diferentes moléculas de adhesión y señalización.

UNIONES ESTRECHAS Y ORGANIZACIÓN DE LOS EPITELIOS

Podría parecer que las láminas epiteliales, con sus células unidas entre sí lateralmente y situadas sobre una lámina basal, son estructuras muy especializadas. Sin embargo, constituyen una parte importante de los animales pluricelulares. Tanto es así que más del 60% de los tipos celulares del cuerpo de los vertebrados son epiteliales. Del mismo modo que una membrana celular se invagina para dividir una célula eucariota en dos, los epitelios se invaginan y parten el cuerpo de un vertebrado, revistiendo las superficies y cavidades y generando compartimientos internos en los que tienen lugar procesos específicos. Por lo tanto, el revestimiento epitelial sería uno de los caracteres más ancestrales en la evolución de los animales, el cual se diversificaría de diferentes maneras (como se explicará en el Capítulo 23), pero que en la mayoría de epitelios mantendría una organización basada en un conjunto de mecanismos moleculares conservados.

Esencialmente todos los epitelios están anclados a otros tejidos, por la **cara basal**, y son libres por la cara opuesta, la **cara apical**. La lámina basal está localizada en la interfase entre el epitelio y el tejido adyacente mediando esta unión, mientras que la cara superficial del epitelio generalmente está bañada por un fluido extracelular (aunque a veces esta cara está cubierta por un material que secretan las mismas células epiteliales por su cara apical). Por lo tanto, se considera que todos los epitelios son estructuras **polarizadas**, igual que sus propias células: la cara basal de la célula está unida por debajo a la lámina basal, mientras que la cara apical está expuesta por encima a un medio extracelular.

De forma correspondiente, todos los epitelios tienen como mínimo una importante función en común: constituir barreras de permeabilidad selectiva que separan fluidos de diferente composición química. Esta función de barrera requiere que las células adyacentes estén unidas mediante **uniones oclusivas** con el fin de que las moléculas no puedan filtrarse libremente a través de la lámina epitelial. En esta sección, veremos cómo se forman las uniones oclusivas y cómo se mantiene la arquitectura polarizada del epitelio, dos aspectos fundamentales y ligados entre sí, ya que son las uniones las que tienen un papel crucial en la organización y mantenimiento de la polaridad de las células en la lámina epitelial.

Las uniones estrechas sellan las células entre sí y forman una barrera entre los dominios de membrana

Las uniones oclusivas de los epitelios de los vertebrados se denominan **uniones estrechas**. En el epitelio del intestino delgado encontramos un buen ejemplo de su estructura y de su

función (véase Figura 19–3). Este epitelio tiene una estructura *columnar simple*, es decir, una capa única de células altas o columnares. Estas células son de diferentes tipos aunque la mayoría de ellas corresponden a células absorbentes especializadas en la captación de nutrientes desde la luz intestinal o *lumen*.

Las células absorbentes transportan, de manera selectiva, nutrientes a través del epitelio, desde la luz intestinal hacia el líquido extracelular que baña el tejido conjuntivo subyacente. Desde aquí, estos nutrientes difunden hacia los capilares sanguíneos que los distribuirán al organismo. Este *transporte transcelular* depende de dos grupos de proteínas transportadoras localizadas en la membrana plasmática. Uno de ellos se encuentra en la superficie apical de la célula epitelial (la región membranosa que está en contacto con la luz intestinal) y transporta de forma activa y selectiva determinadas moléculas desde la luz del intestino hasta el interior de la célula. El otro grupo de proteínas está situado en la *superficie basolateral* (basal y lateral) y permite que estas mismas moléculas abandonen la célula mediante difusión facilitada hacia el líquido extracelular situado en la otra cara del epitelio. Para que esta actividad de transporte sea efectiva, los espacios situados entre las células epiteliales tienen que estar sellados herméticamente, de forma que las moléculas transportadas no puedan difundir de forma pasiva a la luz intestinal a través de estos espacios (**Figura 19–23**). Además, las proteínas que forman estas bombas y canales tienen que estar distribuidas de forma correcta en las membranas celulares. En efecto, el grupo de proteínas apicales de transporte activo tiene que situarse en la cara más apical (tal como se trató en el Capítulo 13), evitando que migren a la superficie basolateral, mientras que las proteínas que forman canales tienen que situarse exclusivamente en la superficie basolateral. Las uniones estrechas funcionan como "barreras" que separan dominios de membrana de cada célula impidiendo que las proteínas (y los lípidos) de la membrana apical difundan a la región basal y viceversa (véase Figura 19–23).

La función selladora de las uniones estrechas es fácil de demostrar de modo experimental: cuando se inyecta un marcador de bajo peso molecular en una de las caras del epitelio, el marcador no atravesará las uniones estrechas (**Figura 19–24**). Sin embargo, este sellado no es

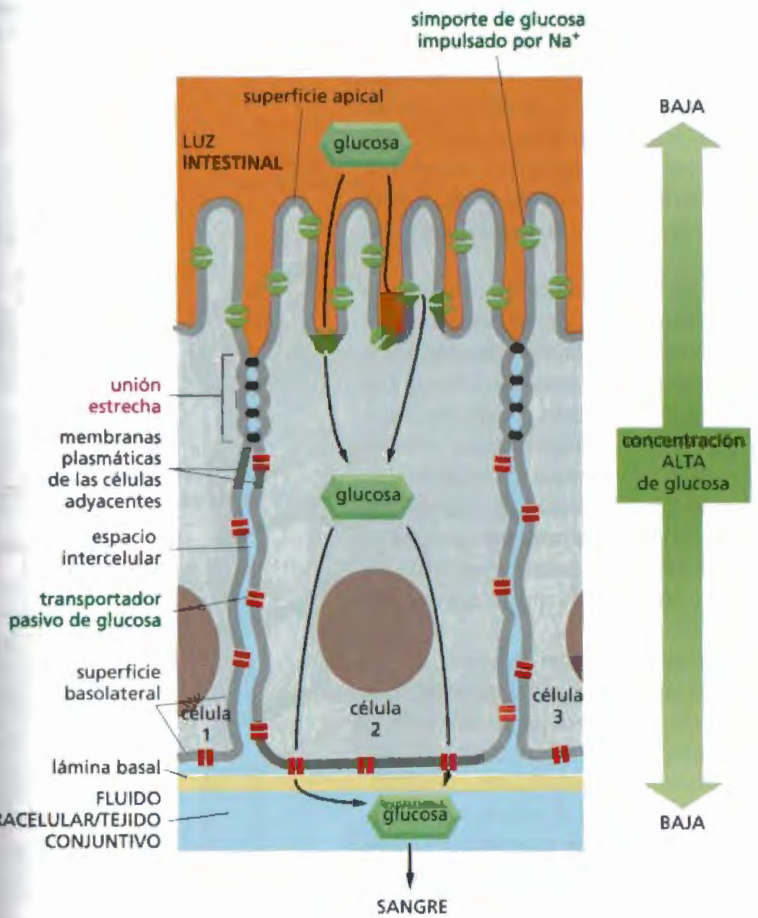


Figura 19–23 Papel de las uniones estrechas en el transporte transcelular. En las células epiteliales del intestino delgado, las proteínas transportadoras se hallan confinadas en diferentes regiones de la membrana plasmática. Esta segregación permite una transferencia vectorial de nutrientes desde la luz intestinal hasta la sangre a través del epitelio. En el ejemplo que se muestra, el transporte activo de glucosa hacia el interior de la célula se realiza mediante un mecanismo de simporte impulsado por Na^+, situado en la membrana apical, teniendo lugar posteriormente la difusión de la glucosa hacia el espacio extracelular por un mecanismo de difusión facilitada mediado por transportadores localizados en la membrana basolateral. Se supone que las uniones estrechas confinan las proteínas de transporte en sus dominios de membrana apropiados y actuan como barreras en el seno de la bicapa lipídica de la membrana plasmática. Estas uniones también bloquean la difusión de glucosa desde la cara basal del epitelio hacia la luz intestinal.

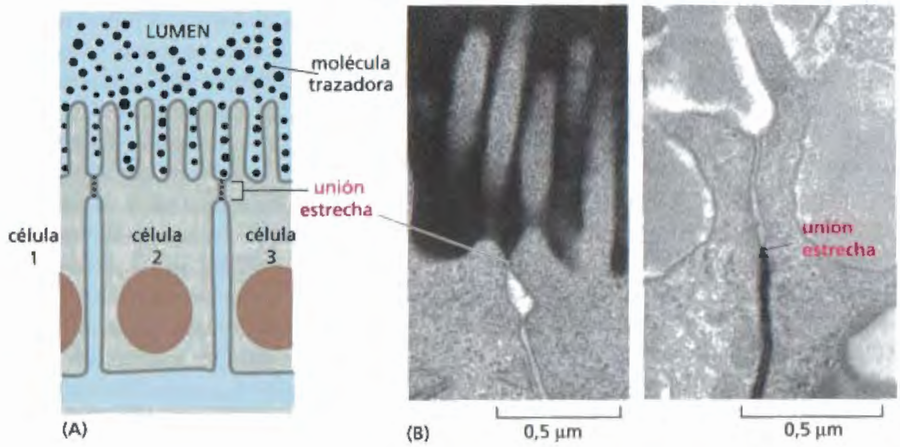


Figura 19–24 Las uniones estrechas permiten a los epitelios actuar como barreras en la difusión de solutos. (A) Esquema que muestra cómo una pequeña molécula trazadora extracelular depositada en una de las caras de un epitelio no puede pasar a través de las uniones estrechas que sellan las células adyacentes. (B) Imágenes de microscopía electrónica correspondientes a células epiteliales en las que se ha depositado en el exterior de la célula, ya sea en la cara apical (a la *izquierda*) o en la cara basolateral (a la *derecha*), una pequeña molécula trazadora electrodensa; en ambos casos el trazador es detenido por la unión estrecha. (B, cortesía de Daniel Friend.)

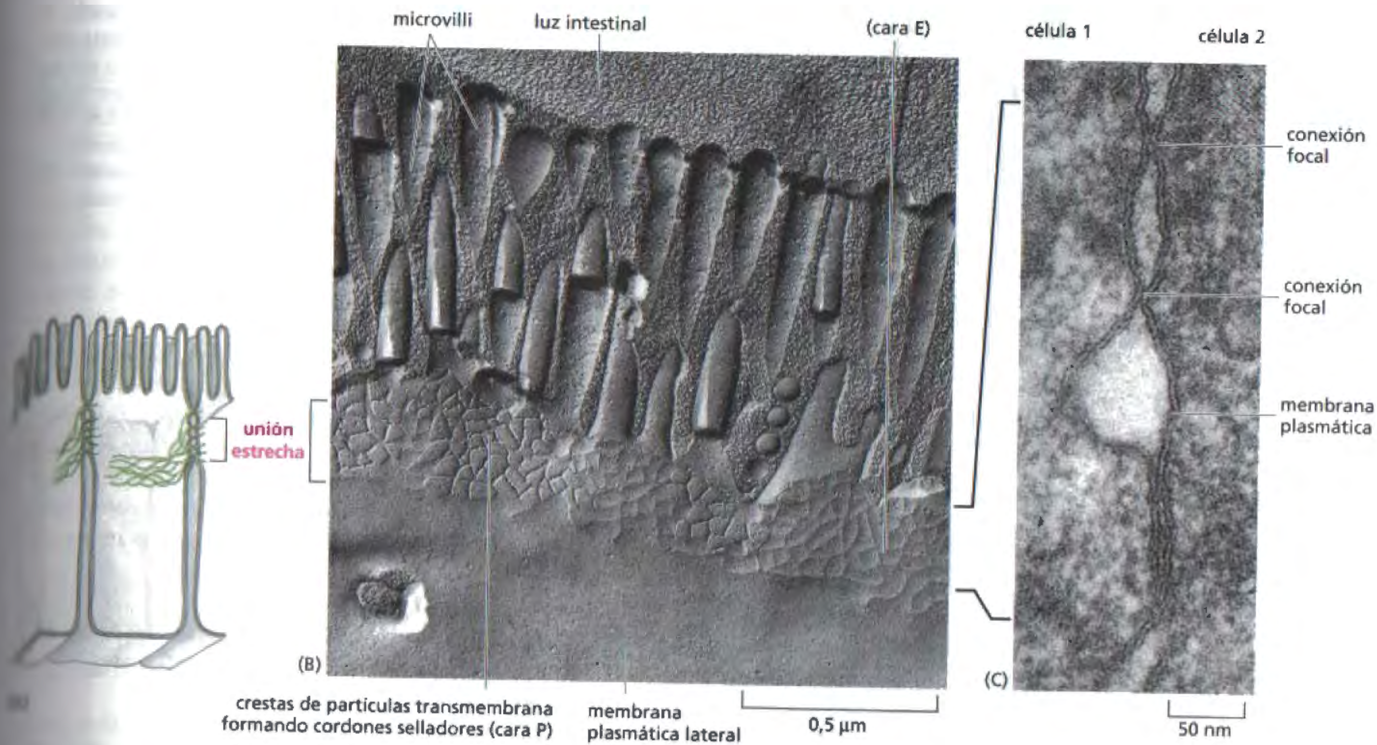
en absoluto universal. En efecto, aunque todas las uniones estrechas son impermeables al paso de macromoléculas, cuando consideramos moléculas de pequeño tamaño, su permeabilidad varía mucho entre diversos epitelios. Por ejemplo, las uniones estrechas que se encuentran en el epitelio que tapiza el intestino delgado son 10.000 veces más permeables a iones inorgánicos, tales como el Na^+, que las que tapizan la vejiga urinaria. Estas diferencias son el reflejo de la existencia de distintas proteínas formadoras de uniones estrechas.

Las células epiteliales pueden modificar transitoriamente sus uniones estrechas permitiendo un aumento del flujo de solutos y de agua a través de la barrera que forman las uniones oclusivas. Este *transporte paracelular* es sobre todo importante en la absorción de aminoácidos y monosacáridos desde la luz intestinal, donde su concentración tras la ingesta puede incrementarse lo suficiente como para impulsar su transporte pasivo en el sentido adecuado.

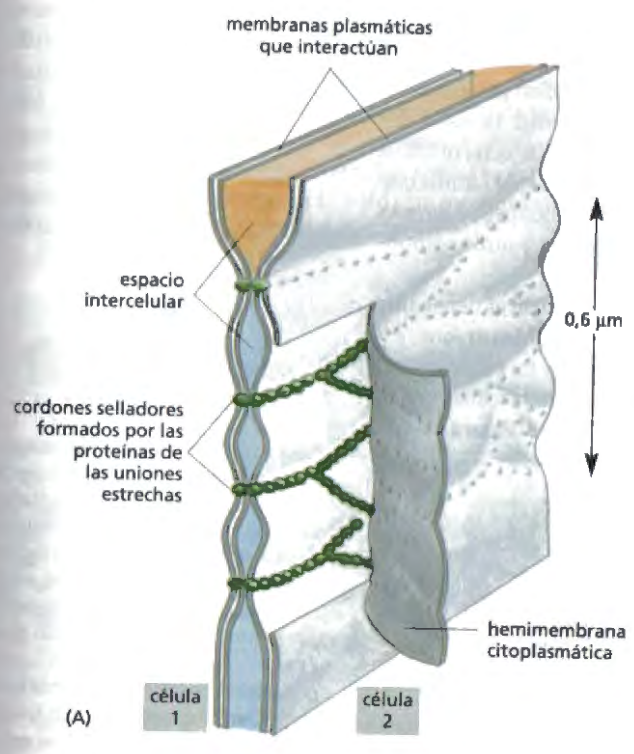
Cuando las uniones estrechas son procesadas por criofractura y observadas mediante el microscopio electrónico, parece que están compuestas por una red de *cordones selladores* que rodea por completo la zona apical de cada célula epitelial (**Figura 19–25**A y B). Mediante microscopía electrónica de transmisión convencional se observa que esos cordones selladores se localizan en los lugares en los que se produce la aposición entre las dos hemimembranas externas de células adyacentes (Figura 19–25C). Cada cordón sellador de la unión estrecha se compone de una hilera de proteínas transmembrana de adhesión, situadas en cada una de las dos membranas plasmáticas que interaccionan. Los dominios extracelulares de estas proteínas interaccionan entre sí de forma directa y se produce la oclusión del espacio intercelular (**Figura 19–26**).

Las principales proteínas transmembrana presentes en estos cordones son las *claudinas*, las cuales son esenciales para la formación y función de estas uniones estrechas. Por ejemplo, los ratones mutantes para el gen *claudina-1* no forman uniones estrechas entre las células epiteliales de la piel, por lo que cuando nacen pierden rápidamente agua por evaporación a través de la piel y mueren a los pocos días. Por el contrario, si se provoca que células no epiteliales como los fibroblastos expresen genes de claudina, formarán uniones estrechas entre ellas. Las uniones estrechas normales también presentan un segundo tipo de proteínas transmembrana denominada *ocludina*, cuya función todavía es incierta y no parece ser tan esencial como las claudinas. Es necesaria una tercera proteína transmembrana, la *tricelulina* (relacionada con la ocludina) para sellar las membranas celulares entre sí y prevenir el trasvase transepitelial en aquellos puntos en los que se encuentran tres células.

La familia de las claudinas está formada por varios miembros (24 en humanos) que se expresan en diferentes combinaciones en las células epiteliales confiriendo propiedades de permeabilidad específicas en la cara epitelial. Parece que forman *poros paracelulares*, esto es, canales selectivos que permiten el paso de iones a través de las barreras de uniones estrechas desde un espacio extracelular a otro. Se ha observado, por ejemplo, que una claudina específica de células epiteliales de riñón es necesaria para permitir el paso de Mg^{2+} entre las células del epitelio de forma que este catión sea reabsorbido desde la orina a la sangre. Una mutación que afecte al gen que codifica esta claudina provocará una pérdida excesiva de Mg^{2+} por la orina.



ra 19-25 **Estructura de una unión estrecha localizada entre las células epiteliales del intestino delgado.** Las uniones estrechas se muestran matizadas en (A) y observadas mediante criofractura en (B) o mediante microscopía electrónica de transmisión en (C). Debe tenerse en cuenta que lulas están dispuestas de manera que la región apical está orientada hacia la parte inferior. En (B), el plano de la electromicrografía es paralelo al plano membrana y la unión estrecha aparece como una banda de cordones selladores anastomosados rodeando cada célula epitelial. Los cordones selladores ervan como crestas formadas por partículas intramembrana, situadas en la cara citoplasmática de la fractura (cara P) o sus depresiones lementarias en la cara externa de la fractura (cara E) (véase la Figura 19-26A). En (C), las uniones se observan como series de conexiones focales entre mimembranas externas de las dos membranas plasmáticas que interactúan; cada conexión corresponde a un cordón sellador observado en sección ersal. (B y C, de N.B. Gilula, en Cell Communication [R.P. Cox, ed.], pp. 1-29. New York: Wiley, 1974.)



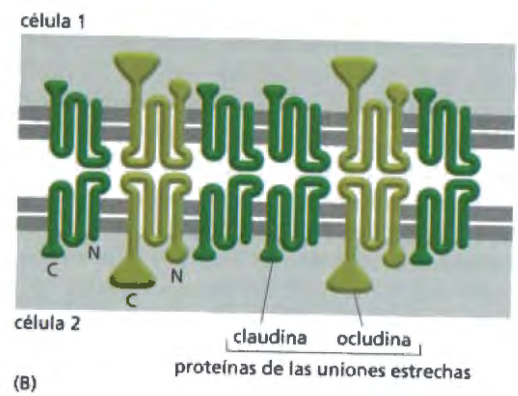


Figura 19-26 **Modelo de unión estrecha.** (A) El esquema muestra cómo los cordones selladores mantienen unidas las membranas plasmáticas adyacentes. Estos cordones están constituidos por proteínas transmembrana, las cuales establecen contacto a través del espacio intercelular, dando lugar a su sellado. (B) Composición molecular de un cordón sellador. Las claudinas son los principales componentes funcionales; la función de las ocludinas es incierta.

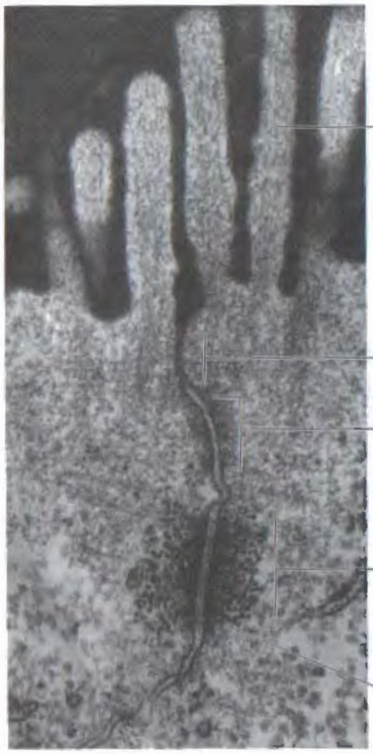


Figura 19–27 Complejo de unión entre células epiteliales en el revestimiento del intestino delgado. En la región más apical se encuentra una unión estrecha, por debajo una unión adherente y, más abajo, una unión desmosomal. Este ejemplo corresponde a un vertebrado; los insectos presentan una disposición diferente. (Por cortesía de Daniel S. Friend.)

Las proteínas de armazón de los complejos de unión desempeñan un papel importante en el control de la proliferación celular

Las claudinas y las ocludinas tienen que mantenerse en la posición correcta dentro de la célula con el fin de formar los cordones selladores de la red de uniones estrechas. Por lo general esta red se sitúa justo por encima de las uniones adherentes y de los desmosomas, los cuales unen las células mecánicamente; el conjunto de estas estructuras se denomina *complejo de unión* (**Figura 19–27**). Los componentes de este complejo de unión dependen unos de los otros para su formación. Por ejemplo, anticuerpos contra cadherina bloquean tanto la formación de uniones adherentes como de uniones estrechas. El posicionamiento y la organización de las uniones estrechas en relación con estas otras estructuras que forman el complejo de unión podría depender de proteínas intracelulares de agregación pertenecientes a la familia de las proteínas de unión estrecha *Tjp* (*tight junction proteins*), también denominadas *proteínas ZO* (las uniones estrechas también reciben el nombre de zona oclusiva o *zonula occludens*). Las proteínas Tjp de los vertebrados pertenecen a la misma familia que las proteínas Discs-large, mencionadas anteriormente cuando se trató la sinapsis, y forman uniones de anclaje entre los cordones selladores de las uniones estrechas y otros componentes tales como el citoesqueleto de actina.

En invertebrados tales como los insectos y los moluscos, las uniones oclusivas tienen una morfología diferente y se denominan **uniones septadas**. Del mismo modo que las uniones estrechas, estas uniones forman una banda continua alrededor de cada una de las células epiteliales, pero la estructura es más regular y las membranas plasmáticas que interaccionan están unidas por proteínas dispuestas en hileras paralelas espaciadas regularmente (**Figura 19–28**).

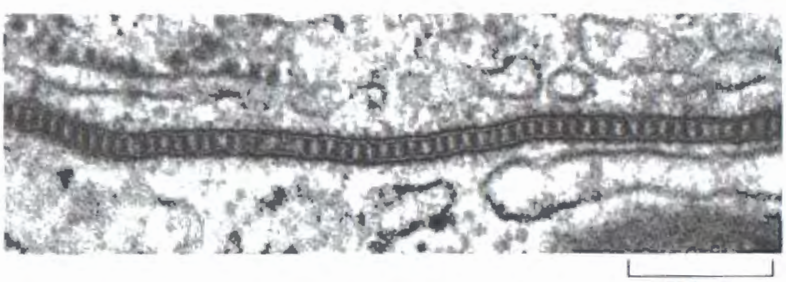


Figura 19–28 Unión septada. Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión de una unión septada localizada entre dos células epiteliales de un molusco. Mediante una sección transversal se puede observar que las membranas plasmáticas están conectadas por hileras paralelas de proteínas de unión. Estas hileras, que muestran una cierta periodicidad, se pueden observar como barras densas o septos. (De N.B. Gilula, en Cell Communication [R.P. Cox, ed.], pp. 1-29. New York: Wiley, 1974.)

Las uniones septadas están basadas en proteínas homólogas a las claudinas de los vertebrados y también dependen de proteínas de armazón, incluidas las proteínas Discs-large, que también están presentes en las sinapsis. Moscas mutantes que no expresan Discs-large presentan uniones septadas deficientes.

Sorprendentemente, estos mutantes también desarrollan tumores epiteliales causados por un crecimiento excesivo de los discos marginales, estructuras larvarias de las que deriva la mayor parte del cuerpo de la mosca adulta (como se describe en el Capítulo 22). El gen recibe su nombre de este efecto, que depende de la presencia de regiones de unión para reguladores de crecimiento en la proteína Discs-large. Pero ¿cómo puede estar ligado este aparato de unión intercelular al control de la proliferación celular? Esta relación parece ser fundamental: como en los vertebrados, los genes homólogos a *Discs-large* tienen ambas funciones. Una posibilidad es que este hecho refleje un mecanismo básico de reparación y mantenimiento del epitelio. Si una célula epitelial es privada de contactos de adhesión con otras células adyacentes, su programa de crecimiento y proliferación se activa generando nuevas células que reconstruyen una lámina pluricelular continua. De hecho, diferentes evidencias indican que los complejos de unión son regiones importantes que intervienen en la señalización intercelular mediada por Discs-large o por otros componentes de este complejo, como es el caso de las cadherinas.

Las uniones intercelulares y la lámina basal gobiernan la polaridad apicobasal en los epitelios

La mayoría de células de los tejidos animales presentan una clara polarización, con regiones anterior y posterior, o superior e inferior, bien diferenciadas. Encontramos ejemplos de esta polaridad celular en casi todas las células epiteliales, en neuronas con polaridad dendrita-axón, en fibroblastos que migran y en leucocitos (con una región motora anterior y una región posterior que es arrastrada), así como en células embrionarias cuando se preparan para dividirse asimétricamente dando lugar a células hijas diferentes. En todos estos casos, existe un conjunto de componentes que se encarga de proporcionar esta polaridad, desde los gusanos y las moscas hasta los mamíferos.

En el caso de las células epiteliales, los generadores de polaridad tienen que establecer las diferencias entre los polos apical y basal, y tienen que hacerlo de una manera orientada en concordancia con las células próximas. El fenómeno básico que acontece se puede observar en una línea celular epitelial en cultivo: las células MDCK (**Figura 19–29**A). Estas células pueden ser disgregadas y cultivadas en suspensión en una matriz de colágena. Una única célula aislada en estas circunstancias no muestra polaridad aparente, pero puede dividirse formando una pequeña colonia de células que se organizarán formando una vesícula epitelial con una luz central donde se hace aparente la polaridad de cada célula. Estas vesículas se envolverán de una lámina basal y todas las células se orientarán del mismo modo, con moléculas específicas revistiendo la luz. Como es evidente, las células MDKC tienen una tendencia espontánea a polarizarse, pero este mecanismo es cooperativo y depende de los contactos con las células adyacentes.

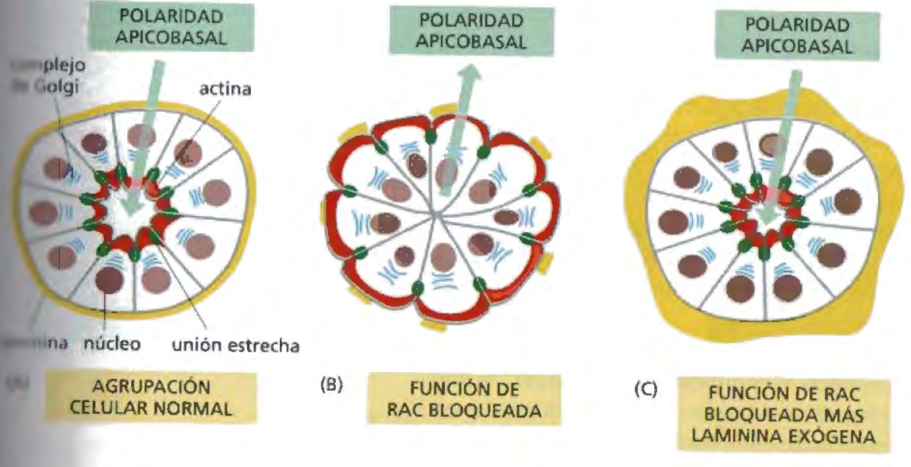


Figura 19–29 Polarización cooperativa de grupos de células epiteliales en cultivo y su dependencia de Rac y de laminina. Cuando células de la línea MDCK, las cuales derivan de epitelio renal de perro, son aisladas y envueltas en una matriz de colágena dejando intacta su capacidad proliferativa, forman pequeñas colonias aisladas, tal como se muestra en este esquema de una sección transversal. (A) Las células de esta colonia se organizan espontáneamente en un epitelio que envuelve una luz central. Si se tiñen la actina (que marca los microvilli apicales), la proteína ZO1 (una proteína de unión estrecha), el complejo de Golgi y la laminina (un componente de la lámina basal), se demuestra que las células cooperan consiguiendo la polarización, de manera que los componentes apicales están en contacto con la luz interna y los componentes basales en contacto con el gel de colágena que envuelve la colonia. (B) Cuando se bloquea la función de Rac mediante la expresión de un dominante negativo de la proteína, las células presentan una polaridad invertida, no forman los típicos cestos con la cavidad central y dejan de depositar laminina de forma correcta alrededor del conjunto de células. (C) Cuando la colonia es embebida en una matriz rica en laminina exógena, se restablece casi por completo la polaridad incluso cuando se mantiene bloqueada la función de Rac. (Basado en L.E. O'Brien et al., *Nat. Cell Biol.* 3:831-838, 2001. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

Para descubrir cómo funciona este mecanismo molecular, el primer paso consiste en identificar sus componentes. Estudios en el gusano *C. elegans* y en *Drosophila* proporcionan información sobre estos componentes. En el gusano, gracias a una batería de mutaciones que alteran la organización celular en los embriones se ha descrito un conjunto de genes esenciales para la formación de la polaridad celular y la asimetría de la división celular (como se describe en el Capítulo 22). Existen al menos seis de estos genes, los llamados genes *Par* (producen *defectos en la partición*) que, en todas las especies estudiadas y junto a sus genes homólogos (otros genes en *Drosophila* y en vertebrados), tienen un papel importante no sólo en la división celular asimétrica en embriones sino también en otros procesos de polarización celular como los que ocurren en células epiteliales. Por ejemplo, el gen *Par4* en *C. elegans* es homólogo al gen *Lkb1* en mamíferos y en *Drosophila*, y codifica una serina/treonina quinasa. En moscas, las mutaciones en este gen impiden la polaridad del huevo y de las células epiteliales. En humanos estas mutaciones provocan el *síndrome Peutz-Jeghers*, caracterizado por crecimientos anómalos y desorganizados del revestimiento del intestino y predisposición a ciertos tipos de cáncer. La privación de la expresión de LKB1 en células epiteliales cultivadas de colon humano produce un error en el proceso de polarización. Más aún, cuando estas células cultivadas son inducidas a expresar artificialmente grandes niveles de LKB1, pueden polarizarse de forma individual, incluso en condiciones aisladas del resto de células y rodeadas de un medio uniforme (**Figura 19–30**). Este resultado sugiere que la polaridad epitelial normal depende de dos mecanismos: uno que dota a las células individuales de polarización autónoma; otro que orienta sus ejes de polaridad en relación a su entorno y a la lámina basal. Este último mecanismo podría ser mucho más general y actuar en otros tipos de células polarizadas.

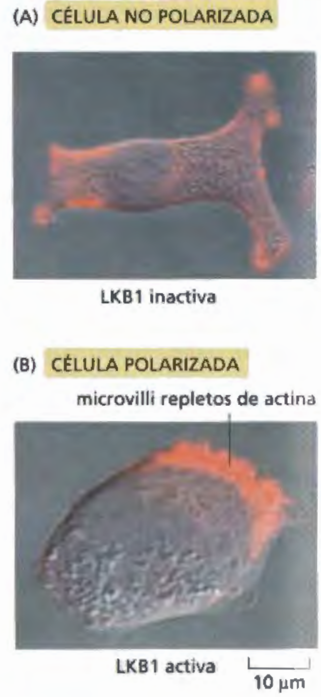


Figura 19–30 Desarrollo de la polaridad en una célula epitelial aislada. Se transfectaron células de una línea que deriva del epitelio, con construcciones de DNA que codifican componentes reguladores a través de los cuales se puede controlar la actividad de la proteína LKB1 si se cambia la composición del medio de cultivo. Cuando la actividad de LKB1 es baja, las células no presentan polarización; en cambio, cuando es alta, las células se polarizan. Su polarización se manifiesta en la distribución de proteínas de uniones estrechas (ZO1) y de uniones adherentes (p120-catenina), ya que se acumulan en una cara de la célula, alrededor de microvilli llenos de actina, incluso cuando las células se mantienen aisladas y no establecen contactos con otras. Esta polarización autónoma sucede incluso cuando las células se cultivan en suspensión sin contacto con ningún sustrato que les guía en estos procesos. (De A.F. Baas et al., *Cell* 116:457-466, 2004. Con la autorización de Elsevier.)

Las moléculas necesarias para los procesos de polaridad epitelial se pueden clasificar en relación a estos dos mecanismos. Si nos centramos en la polaridad de células individuales animales, se han descrito tres proteínas asociadas a membrana: **Par3**, **Par6** y la **proteína quinasa C atípica** (**aPKC**: *atypical protein kinase C*). Par3 y Par6 son proteínas de armazón con dominios PDZ y se unen entre sí y a aPKC. El complejo formado por estos tres componentes también dispone de regiones de unión a otros tipos de moléculas como son las pequeñas GTPasas Rac y Cdc42, las cuales desempeñan un papel crucial en este proceso. Así, por ejemplo, cuando se bloquea la función de Rac en un conjunto de células MDCK, se desarrollan con una polaridad invertida (véase Figura 19–29B). Rac y Cdc42 son piezas clave en la formación de filamentos de actina, tal como se describe en el Capítulo 16 y parece que es mediante estas piezas que la incorporación del complejo Par3-Par6-aPKC en una región específica de la corteza celular está relacionada con la polarización del citoesqueleto a lo largo de esa región.

El proceso de reclutamiento de este complejo es evidentemente cooperativo e intervienen otro tipo de señales positivas y espaciales. Un pequeño grupo inicial de estos componentes es capaz de reclutar en esa región otros grupos del mismo tipo y, a su vez, inhibir el agrupamiento de los mismos componentes en otras regiones de la célula. Una de las fuentes de estas señales positivas puede encontrarse en el comportamiento de Cdc42 y de Rac: una gran actividad de estas moléculas en una región específica que, mediante la organización del citoesqueleto, podría dirigir el transporte intracelular para reclutar en el mismo lugar más Cdc42, Rac, u otros de sus activadores. Parece que ésta es una parte esencial en los mecanismos de polarización en células de levadura, y podría ser el mecanismo por el cual, por ejemplo, los fibroblastos en migración establecen las diferencias entre la zona locomotora anterior y el resto de su periferia. Por lo tanto, este mecanismo podría ser el núcleo de la polarización celular en eucariotas, al menos en términos de evolución.

Parece que el complejo Par3-Par6-aPKC, combinado con Cdc42 o Ras, podría controlar la organización de otras proteínas asociadas a la cara interna de la membrana plasmática. En particular, en células epiteliales, esta combinación formaría el *complejo Crumbs*, que se mantiene unido gracias a las proteínas de agregación de dominio PDZ Discs-lost y Stardust, localizadas en la región apical de la célula, mientras que un tercer complejo, denominado *complejo Scribble*, se mantiene unido por las proteínas de agregación Scribble y Discs-large y está localizado en zonas más basales (**Figura 19–31**). Estos tres complejos de proteínas interaccionan entre sí y con otros componentes celulares mediante mecanismos que todavía se desconocen.

Pero ¿de qué forma se orienta correctamente todo este sistema tan elaborado en relación a las células de los alrededores? En un epitelio, el complejo Par3-Par6-aPKC se une a las adhesiones intercelulares (uniones estrechas en vertebrados y uniones adherentes en *Drosophila*) gracias a que las proteínas de agregación del complejo se unen a las colas de al-

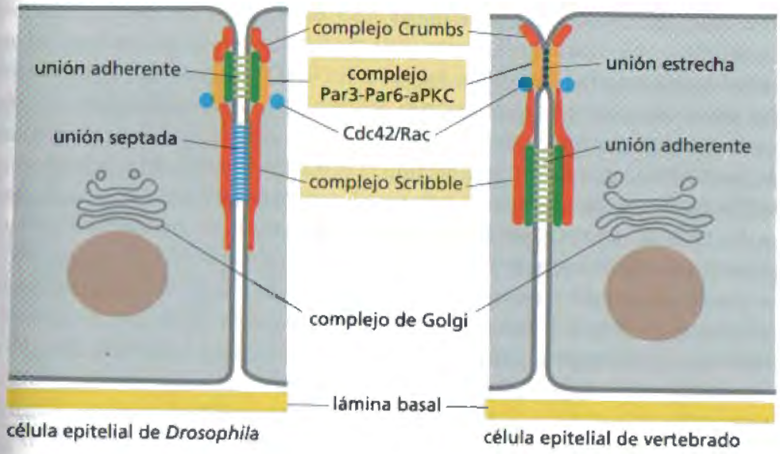


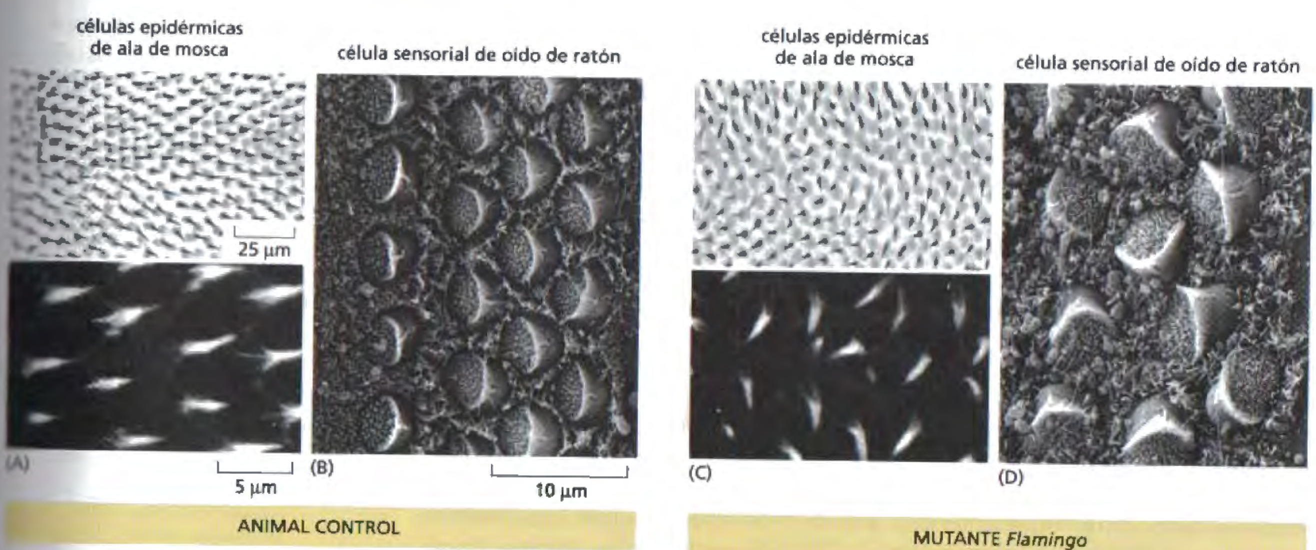
Figura 19–31 La organización coordinada de tres complejos de proteínas asociadas a membrana parece ser crítica en la polaridad epitelial. A la izquierda, se muestra un esquema de una célula epitelial de *Drosophila* y a la derecha el de una célula epitelial de vertebrado. Los tres complejos –los complejos Par3-Par6-aPkc, Crumbs y Scribble– están organizados alrededor de proteínas de agregación que contienen dominios PDZ. La distribución detallada de los complejos varía según el tipo celular.

algunas proteínas transmembrana de adhesión de esas uniones. Mientras, el citoesqueleto, bajo la influencia de Rac o de sus moléculas asociadas, dirige el reparto de los componentes de la lámina basal a la región opuesta de la célula. Estas moléculas de matriz extracelular responden confiriendo a esa región un carácter basal (véase Figura 19–29C). De este modo, la polaridad de la célula está asociada con su orientación en la lámina epitelial y con su relación con la lámina basal.

Un sistema de señalización distinto controla la polaridad celular planar

La polaridad apicobasal es una característica universal en los epitelios, pero las células de algunos epitelios muestran una polaridad adicional perpendicular a este eje apico basal; es como si tuvieran una flecha colocada en ellos apuntando a un sentido específico en el plano del epitelio. Este tipo de polaridad se denomina **polaridad celular planar** (**Figura 19–32**A y B). En el ala de las moscas, por ejemplo, cada célula epitelial presenta una pequeña proyección asimétrica en forma de pelo en la superficie, llamada queta, que apunta hacia la punta del ala. De modo similar, en el oído interno de algunos vertebrados cada célula mecanosensorial presenta un haz de estereocilios (protuberancias en forma de bastón rellenas de actina) sobresaliendo de su superficie apical. En estas células, la inclinación de los estereocilios en un sentido provoca la apertura de canales de iones y la subyacente estimulación eléctrica de la célula, mientras que la inclinación en sentido contrario produce el efecto opuesto. Para que el oído funcione estas células tienen que estar orientadas de forma correcta. La polaridad celular planar es importante también en el tracto respiratorio, donde

Figura 19–32 Polaridad celular planar. (A) Quetas en el ala de una mosca. Cada célula del epitelio del ala forma una de estas pequeñas protuberancias o "quetas" en su parte apical, y todos los pelos se dirigen en el mismo sentido, hacia la punta del ala, reflejando una polaridad planar en la estructura de cada célula. (B) Células sensoriales del oído interno de ratón con polaridad celular planar, manifestada por el patrón orientado de los estereocilios (protuberancias llenas de actina) en su superficie. La detección del sonido depende de una correcta y coordinada orientación de estas células sensoriales. (C) Una mutación del gen *Flamingo*, que codifica una cadherina no clásica en *Drosophila*, interrumpe el patrón de la polaridad celular planar en el ala. (D) Una mutación en un homólogo a *Flamingo* en ratón orienta de manera aleatoria el vector de la polaridad celular planar en las células sensoriales del oído. Estos animales padecen defectos auditivos. (A y C, de J. Chae et al., *Development* 126:5421-5429, 1999. Con la autorización de The company of Biologists; B y D, de J.A. Curtin et al., *Curr. Biol.* 13:1129-1133, 2003. Con la autorización de Elsevier.)



cada célula ciliada tiene que orientar el movimiento de sus cilios para conducir la mucosidad fuera de los pulmones y no dentro de ellos (véase Capítulo 23).

Una serie de mutantes con quetas desordenadas en *Drosophila* han permitido identificar un conjunto de genes cruciales para la polaridad celular planar en moscas. Algunos de ellos, como los genes *Frizzled (rizado)* y *Dishevelled (despeinado)*, codifican proteínas que ya fueron descritas como componentes de la vía de señalización Wnt (tratada en el Capítulo 15). Otros dos genes, el *Flamingo* (véase Figura 19–32C) y el *Dachsous*, codifican miembros de la superfamilia de las cadherinas. Otros son más difíciles de clasificar desde un punto de vista funcional pero está claro que su maquinaria organiza la polaridad celular planar y que están localizados en uniones intercelulares permitiendo que la polarización pueda propagarse de una célula a otra. Esencialmente, este mismo sistema es el que controla la polaridad celular planar en vertebrados. Así, por ejemplo, ratones que presentan mutaciones en un homólogo de *Flamingo* presentan los pelos celulares del oído interno desorganizados por completo (entre otros defectos) y padecen sordera (véase Figura 19–32D).

Resumen

Las uniones oclusivas –uniones estrechas en vertebrados y uniones septadas en insectos y moluscos– sellan los espacios intercelulares de los epitelios generando una barrera que impide la difusión de moléculas a través de la lámina epitelial. Estas uniones también suponen un obstáculo para la difusión de proteínas a lo largo de la membrana y ayudan a mantener la diferencia entre la población de proteínas del dominio apical y la del dominio basolateral de la membrana en células epiteliales. Las principales proteínas que forman las uniones oclusivas son las claudinas. Diferentes miembros de la familia de las claudinas se expresan en distintos tejidos confiriendo diferentes propiedades de permeabilidad en cada uno de las láminas epiteliales.

Las proteínas intracelulares de armazón se adhieren a componentes transmembrana en las uniones oclusivas coordinándolas con uniones de anclaje basadas en claudinas y formando complejos de unión. Las proteínas de armazón ejercen al menos dos funciones adicionales importantes: participan en el control de la proliferación celular y, en conjunción con otras moléculas reguladoras como Rac y Cdc42, organizan la polaridad celular. Las células epiteliales tienen una tendencia intrínseca a desarrollar una polarización apicobasal. La orientación de este eje de polarización en relación al de las células adyacentes de la misma lámina epitelial depende tanto de los complejos de proteínas de agregación situados en las uniones intercelulares como de la polarización citoesquelética controlada por Rac/Cdc42 y de influencias de la lámina basal.

Las células de algunos epitelios presentan una polaridad adicional en el plano del epitelio en disposición perpendicular a los ejes apicobasales. Otro conjunto de proteínas conservadas filogenéticamente actúan de manera similar en vertebrados e insectos gobernando esta polaridad celular planar a través de mecanismos todavía poco conocidos pero que están basados en las uniones intercelulares.

CANALES INTERCELULARES: UNIONES DE TIPO GAP Y PLASMODESMOS

Las uniones estrechas bloquean la difusión entre los espacios intercelulares y evitan el paso de moléculas de una cara del epitelio a la otra. Otro tipo de unión ejerce una función radicalmente distinta: construye canales entre células adyacentes generando un transporte directo desde el citoplasma de una célula al de otra célula. Estos canales pueden ser de distintas formas en los tejidos animales –donde reciben el nombre de *uniones de tipo gap*– y en vegetales –denominados *plasmodesmos*. Sin embargo, en ambos casos su función es similar: permitir el intercambio de pequeñas moléculas (en algunos tipos de plasmodesmos pueden permitir el paso de macromoléculas) entre células adyacentes. Algunas de las implicaciones de este acoplamiento intercelular son todavía desconocidas.

Las uniones de tipo gap acoplan las células, eléctrica y metabólicamente

Las uniones de tipo gap están presentes en la mayoría de los tejidos animales, incluyendo los tejidos conjuntivos y epiteliales, permitiendo a las células conectarse con sus vecinas. En mi-

croscopía electrónica de transmisión, cada unión de tipo gap se observa como un parche en el que las membranas de dos células adyacentes están separadas por un espacio uniforme de unos 2 a 4 nm de amplitud. Este espacio está constituido por proteínas formadoras de canales, las cuales pertenecen a dos familias distintas: las *conexinas* y las *inexinas*. Estas proteínas no presentan una secuencia parecida pero se asemejan en cuanto a forma y función. En vertebrados están presentes las dos proteínas pero predominan las conexinas, con 21 miembros de esta familia en humanos. En *Drosophila* y en *C. elegans* sólo aparecen las inexinas, con 15 miembros de esta familia en moscas y 25 en gusanos.

Los canales formados por las proteínas de unión de tipo gap permiten el paso directo de iones inorgánicos y de otras moléculas hidrosolubles de pequeño tamaño desde el citoplasma de una célula al de la célula adyacente, de manera que se forma un acoplamiento eléctrico y metabólico entre ambas células. Por tanto, cuando se inyecta un colorante dentro de una célula, difunde directamente a la célula adyacente sin escapar al espacio extracelular. Del mismo modo, si se aplica una corriente eléctrica a una célula a través de un microelectrodo, se observa una alteración eléctrica casi instantánea en la célula adyacente debido al flujo de iones cargados eléctricamente a través de la unión de tipo gap. Si se insertan electrodos en ambas células, es fácil seguir el efecto y medir las propiedades eléctricas de la unión de tipo gap, tales como la resistencia eléctrica, y las vías por las que el acoplamiento cambia cuando las condiciones varían. De hecho, una de las primeras evidencias de la existencia de las uniones de tipo gap procede de experimentos electrofisiológicos que demostraron un acoplamiento eléctrico rápido y directo entre algunos tipos de neuronas. Se han utilizado otros métodos para identificar a las conexinas como las proteínas que median las uniones comunicativas de tipo gap: cuando se inyecta mRNA de conexina en oocitos de rana o en una línea celular deficiente en estas uniones, puede demostrarse, electrofisiológicamente, la aparición de canales típicos de uniones de tipo gap donde las células entran en contacto.

Experimentos basados en la inyección de colorantes de diferentes tamaños, sugieren que esos canales de conexión presentan un diámetro funcional máximo de alrededor de 1,5 nm, lo cual implica que las células acopladas comparten las moléculas pequeñas (iones inorgánicos, azúcares, aminoácidos, nucleótidos, vitaminas y los mediadores intracelulares AMP cíclico e inositol trisfosfato), pero no las macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos) (**Figura 19–33**).

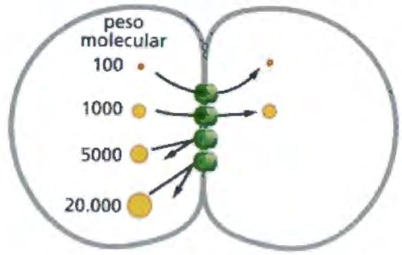


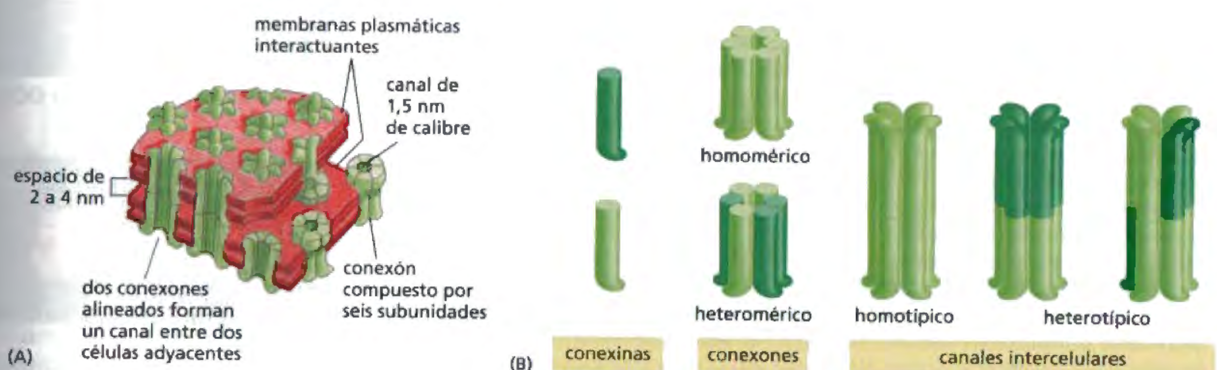
Figura 19–33 Determinación del calibre del canal de una unión de tipo gap. Cuando se inyectan moléculas de diversos tamaños en una célula de una pareja de células acopladas mediante una unión de tipo gap, las moléculas célula de pesos inferiores a unos 1000 daltons pueden pasar a la célula adyacente, pero no las moléculas de mayor tamaño.

Un conexón de uniones de tipo gap está compuesto por seis subunidades transmembrana de tipo conexina

Las **conexinas** son proteínas que contienen cuatro hélices transmembrana que se ensamblan de seis en seis formando un *hemicanal* o **conexón**. Cuando los conexones situados en las membranas plasmáticas de dos células adyacentes están alineados, forman un canal acuoso continuo que conecta ambos citoplasmas (**Figura 19–34**A y **Figura 19–35**). Una unión de tipo gap consiste en varios pares de estos conexones dispuestos en paralelo que forman un conjunto de coladores moleculares. Los conexones mantienen separadas las membranas plasmáticas a una distancia fija; por este motivo, se denominan gap (separación o hueco).

Las uniones de tipo gap localizadas en los diferentes tejidos pueden tener propiedades diferentes, ya que están formadas por diferentes combinaciones de conexinas, dando lugar

Figura 19–34 Uniones de tipo gap. (A) Esquema tridimensional que muestra la interacción de las membranas plasmáticas de dos células adyacentes conectadas por uniones de tipo gap. Las bicapas lipídicas opuestas (*rojo*) son atravesadas por complejos proteicos, denominados conexones (*verde*), cada uno de los cuales está formado por seis subunidades de conexina. Dos conexones unidos a través del espacio intercelular forman un canal acuoso continuo entre ambas células. (B) Organización de las conexinas en conexones y formación de canales. Los conexones pueden ser homoméricos o heteroméricos, mientras que los canales pueden ser homotípicos o heterotípicos.



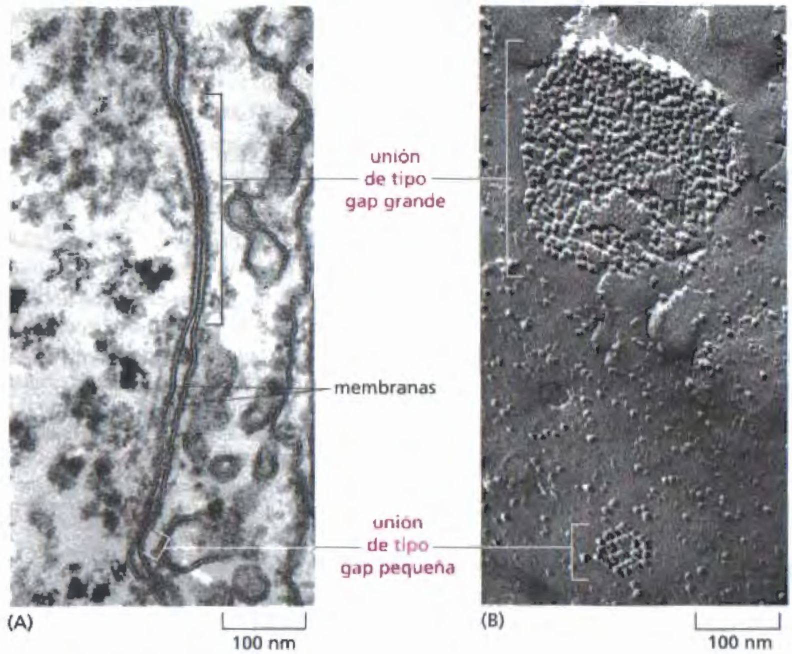


Figura 19–35 Uniones de tipo gap observadas mediante microscopía electrónica. Sección ultrafina (A) y réplica de criofractura (B) de dos uniones de tipo gap, una grande y otra pequeña, localizadas en fibroblastos en cultivo. En (B), cada unión se observa como un agregado de partículas intramembranosas homogéneas. Cada partícula intramembranosa corresponde a un conexón. (De N.B. Gilula, en Cell Communication [R.P. Cox, ed.] pp. 1-29. New York: Wiley, 1974.)

a canales de distinta permeabilidad. La mayoría de tipos celulares expresan más de un tipo de conexina y dos conexinas distintas pueden unirse formando un conexón heteromérico con propiedades características. Además, células adyacentes que expresen diferentes conexinas pueden formar canales intercelulares en los que cada hemicanal participante sea diferente (Figura 19–34B).

Cada placa de unión de tipo gap es una estructura dinámica que se puede formar, deshacer o remodelar con rapidez y que puede contener desde pocos hasta miles de conexones (véase la Figura 19–35B). La utilización de conexinas marcadas por fluorescencia en células vivas demuestra que continuamente se van añadiendo nuevos conexones en la periferia de una placa de unión ya existente, mientras que los conexones antiguos son extraídos del medio de la placa y son destruidos (**Figura 19–36**). Esta renovación es rápida, ya que las moléculas de conexina tienen una vida media de pocas horas.

Los mecanismos de renovación de los conexones viejos del medio de la placa todavía no se conocen, pero la ruta de distribución de los nuevos conexones a su periferia parece clara: estos conexones son insertados en la membrana plasmática por exocitosis, como ocurre con otras proteínas integrales de membrana, y entonces difunden en el plano de la membrana hasta chocar con la periferia de la placa y son atrapados por ella. Este mecanismo supone



Figura 19–36 Reciclaje de conexina en una unión de tipo gap. Las células fueron transfectadas con un gen de conexina ligeramente modificado, que codifica una conexina con un aminoácido corto marcado que contiene cuatro cisteínas en la secuencia Cys-Cys-X-X-Cys-Cys (X representa un aminoácido cualquiera). Este *marcaje con tetracisteína* puede unirse fuertemente a algunas moléculas fluorescentes que, al ser añadidas al medio de cultivo, pueden entrar con rapidez dentro de las células por difusión a través de la membrana plasmática. En el experimento que se muestra, primero se añadió un marcador fluorescente verde y las células fueron entonces lavadas y se incubaron durante 4 u 8 horas. Al cabo de este tiempo, se añadió un marcador rojo, se lavaron otra vez las células y se fijaron. Las moléculas de conexina presentes desde el principio del experimento están marcadas de verde (y no incorporan marca roja porque su marcaje de tetracisteínas está ya saturado de marcador verde), mientras que las conexinas que se sintetizaron posteriormente, durante las 4 a 8 horas de incubación, se tiñeron de rojo. Las imágenes de fluorescencia muestran secciones ópticas de uniones de tipo gap entre pares de células preparadas de este modo. La parte central de una placa de unión de tipo gap es *verde*, por lo que está constituida de moléculas viejas de conexina, mientras que la periferia es *roja*, indicando que ésta contiene conexinas sintetizadas durante las siguientes 4 a 8 horas. Cuanto mayor sea el tiempo de incubación más pequeño será el parche central verde de moléculas viejas y más grande será el anillo periférico con moléculas nuevas que han sido reclutadas para reemplazar las viejas. (De G. Gaietta et al., *Science* 296:503-507, 2002. Con la autorización de AAAS.)

que la membrana plasmática del exterior de la placa de unión tiene que contener conexones o hemicanales, que no estén emparejados con otros de células adyacentes. Se sugiere que estos hemicanales desaparejados presentan una configuración cerrada previniendo que la célula pierda sus moléculas pequeñas hacia el exterior. Sin embargo, existen evidencias de que en ciertas circunstancias fisiológicas estos hemicanales pueden abrirse y actuar como canales de liberación de moléculas pequeñas (como el neurotransmisor glutamato) hacia el exterior o de entrada de otras moléculas hacia el interior celular.

Las uniones de tipo gap tienen diversas funciones

En los tejidos que tienen células excitables eléctricamente, el acoplamiento intercelular mediante uniones de tipo gap tiene una función obvia. Por ejemplo, el acoplamiento eléctrico entre células nerviosas permite el transporte rápido de los potenciales de acción de una célula a otra sin el retraso impuesto por la sinapsis química. Este fenómeno es especialmente ventajoso en situaciones en las que la velocidad y la fiabilidad son cruciales, como sucede en algunas respuestas de escape que presentan peces e insectos o cuando un conjunto de neuronas necesita actuar en sincronía. De manera similar, en vertebrados superiores el acoplamiento eléctrico sincroniza las contracciones de las fibras musculares cardíacas o de las fibras musculares lisas responsables del movimiento peristáltico del intestino.

Las uniones de tipo gap también se localizan en numerosos tejidos en cuya composición no intervienen células excitables eléctricamente. En principio, el compartir pequeños metabolitos e iones constituye un mecanismo de coordinación de las actividades de las células que forman aquellos tejidos y de amortiguación de las fluctuaciones en la concentración de moléculas pequeñas que se presentan de forma aleatoria entre diferentes células. Así, por ejemplo, las uniones de tipo gap son necesarias en el hígado para coordinar la respuesta de los hepatocitos a señales de los terminales nerviosos que contactan sólo una parte de esta población celular (véase Figura 15–7). El desarrollo normal de los folículos ováricos también depende de la comunicación intercelular mediada por estas uniones, aunque en este caso establecidas entre los oocitos y las células foliculares de la capa granulosa. La mutación del gen que codifica la conexina que habitualmente acopla estos dos tipos celulares produce esterilidad.

Mutaciones en las conexinas, sobre todo en la conexina-26, son las causas más comunes de sordera congénita, ya que provocan la muerte celular en el órgano de Corti, probablemente porque interrumpen vías importantes del flujo intercelular de iones en las células de este epitelio sensorial de gran actividad eléctrica. Las mutaciones en conexinas son las responsables de otras muchas enfermedades, que abarcan desde la formación de cataratas en el cristalino hasta la desmielinización de nervios periféricos.

Parece que el acoplamiento celular mediante estas uniones también desempeña un papel importante durante la embriogénesis. A partir de los estadios embrionarios iniciales de los vertebrados, que en el caso del ratón se sitúa en las postrimerías del estadio de 8 células, la mayor parte de las células están acopladas eléctricamente entre sí. Por lo general cuando algunos grupos de células embrionarias empiezan a desarrollar sus características específicas e inician su diferenciación, se desacoplan del tejido circundante. Así, por ejemplo, cuando la placa neural se pliega formando el tubo neural (véase Figura 19–16), sus células se desacoplan del ectodermo. Mientras las células de ambos tejidos permanecen acopladas, exhiben un comportamiento cooperativo y siguen una misma vía de desarrollo de manera coordinada.

Las células pueden regular la permeabilidad de sus uniones de tipo gap

Como los canales iónicos convencionales (tratados en el Capítulo 11), los canales de las uniones de tipo gap no permanecen abiertos continuamente sino que alternan estados abiertos con cerrados. Además, la permeabilidad de las uniones de tipo gap puede disminuir de manera rápida (en cuestión de segundos) y de forma reversible, mediante manipulaciones experimentales que impliquen un descenso del pH celular o un incremento importante en la concentración del Ca^{2+} libre citoplasmático.

Se desconoce el papel fisiológico que tiene la regulación dependiente del pH. Sin embargo, existe un caso en el que parece claro el control ejercido por el Ca^{2+}. Cuando una célu-

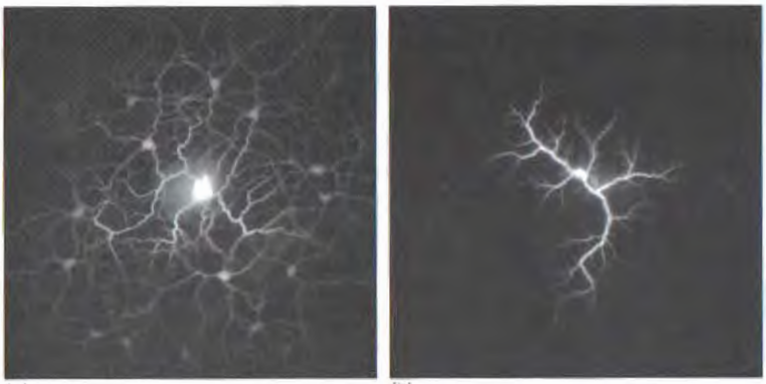


Figura 19–37 Regulación del acoplamiento celular dependiente de uniones gap mediante un neurotransmisor. (A) Tras la inyección del fluorocromo Lucifer amarillo en una neurona de la retina de conejo, se puede observar cómo éste pasa a través de las uniones de tipo gap y marca otras neuronas del mismo tipo que se encuentran unidas a la neurona inyectada. (B) La retina ha sido tratada con el neurotransmisor dopamina con anterioridad a la inyección del fluorocromo. Tal como puede observarse, este tratamiento disminuye en gran manera la permeabilidad de las uniones de tipo gap. El mecanismo de acción del neurotransmisor produce un incremento en los niveles intracelulares de AMP cíclico. (Cortesía de David Vaney.)

la es dañada, su membrana plasmática se hace permeable. De este modo, entran en la célula algunos iones que alcanzan elevadas concentraciones en el medio extracelular, como el Ca^{2+} y el Na^{+}, mientras que otros metabolitos importantes salen de ella. Si la célula afectada continua estando acoplada a otras no dañadas, éstas pueden sufrir peligrosos cambios en su medio interno. Sin embargo, la entrada masiva de Ca^{2+} en la célula dañada provoca el cierre inmediato de los canales de las uniones de tipo gap, aislando eficazmente a la célula y previniendo, de este modo, la propagación de la anomalía hacia otras células.

Por otra parte, la comunicación mediante uniones de tipo gap también puede ser regulada por señales extracelulares. Por ejemplo, el neurotransmisor *dopamina* reduce la comunicación entre ciertas neuronas de la retina como respuesta a un incremento en la intensidad luminosa (**Figura 19–37**). Esta reducción en la permeabilidad de las uniones de tipo gap favorece la transición funcional entre fotorreceptores, pasando del tipo bastón –que es un buen detector a bajas intensidades de luz– al tipo cono –que detecta colores y discrimina los detalles finos de los objetos en condiciones de luz brillante.

En los vegetales, los plasmodesmos realizan muchas de las funciones de las uniones de tipo gap

Los tejidos vegetales se organizan bajo principios diferentes a los de los animales. Esto se debe a que las células vegetales están atrapadas dentro de *paredes celulares* duras, constituidas por una matriz extracelular rica en celulosa, tal como se describirá más adelante. Las paredes están sólidamente cementadas entre las células vecinas, lo que elimina la necesidad de uniones adherentes para mantenerlas en una posición correcta, aunque persiste la necesidad de una comunicación intercelular directa. Así, en contraste con las células animales, las vegetales sólo disponen de una clase de uniones intercelulares, los **plasmodesmos**, que, como las uniones de tipo gap, conectan de forma directa el citoplasma de las células adyacentes.

En los vegetales, el grosor de la pared entre células adyacentes es por lo menos de 0,1 µm, de modo que se requiere una estructura muy diferente a las uniones de tipo gap para mediar la comunicación entre ellas. Los plasmodesmos solucionan este problema. Con pocas excepciones, cada célula de una planta superior está conectada a su vecina mediante plasmodesmos, los cuales forman unos finos canales citoplasmáticos a través de las paredes celulares. Como se muestra en la **Figura 19–38**A, la membrana plasmática de una célula continúa con la de la vecina en cada uno de los plasmodesmos, los cuales conectan los citoplasmas de las dos células por un canal de unos 20 a 40 nm de diámetro.

El centro del canal está atravesado por una delgada estructura cilíndrica, el *desmotúbulo*, que es la continuación de los elementos del retículo endoplasmático liso en cada una de las células conectadas (Figura 19–38B–D). Entre el desmotúbulo y la cara interna del canal que forma la membrana plasmática existe un anillo citosólico a través del cual pueden pasar de una célula a otra las moléculas de pequeño tamaño. Durante la citocinesis, cuando se forma la nueva pared celular, los plasmodesmos ya quedan incluidos en ella. Se forman alrededor de elementos del retículo endoplasmático liso y quedan atrapados en la placa celular en formación (tratada en el Capítulo 17), aunque también pueden insertarse *de novo* en paredes celulares preexistentes formando agrupaciones denominadas *campos de poros*. Cuando los plasmodesmos ya no son necesarios, son eliminados fácilmente.

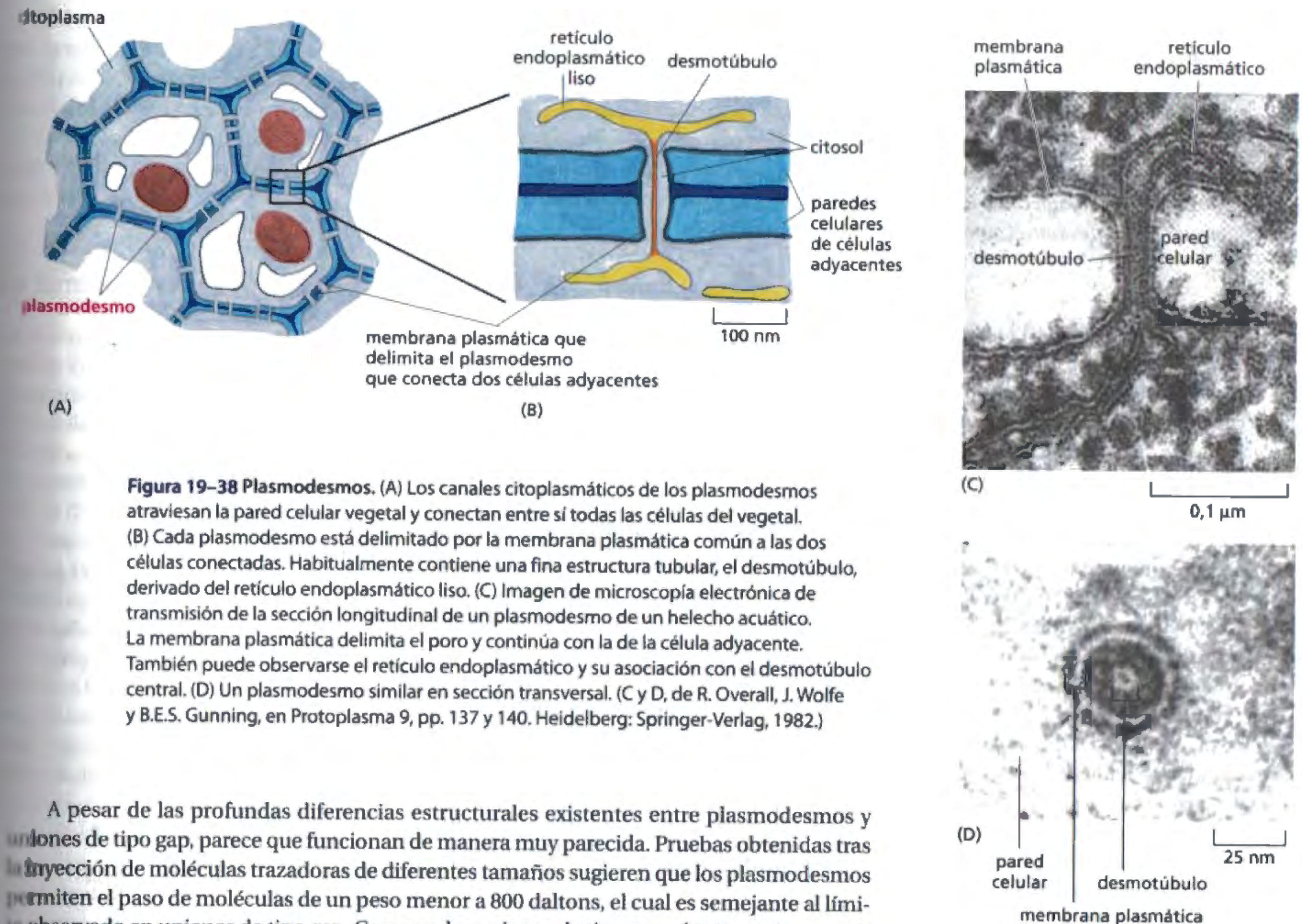


Figura 19–38 Plasmodesmos. (A) Los canales citoplasmáticos de los plasmodesmos atraviesan la pared celular vegetal y conectan entre sí todas las células del vegetal. (B) Cada plasmodesmo está delimitado por la membrana plasmática común a las dos células conectadas. Habitualmente contiene una fina estructura tubular, el desmotúbulo, derivado del retículo endoplasmático liso. (C) Imagen de microscopía electrónica de transmisión de la sección longitudinal de un plasmodesmo de un helecho acuático. La membrana plasmática delimita el poro y continúa con la de la célula adyacente. También puede observarse el retículo endoplasmático y su asociación con el desmotúbulo central. (D) Un plasmodesmo similar en sección transversal. (C y D, de R. Overall, J. Wolfe y B.E.S. Gunning, en Protoplasma 9, pp. 137 y 140. Heidelberg: Springer-Verlag, 1982.)

A pesar de las profundas diferencias estructurales existentes entre plasmodesmos y uniones de tipo gap, parece que funcionan de manera muy parecida. Pruebas obtenidas tras la inyección de moléculas trazadoras de diferentes tamaños sugieren que los plasmodesmos permiten el paso de moléculas de un peso menor a 800 daltons, el cual es semejante al límite observado en uniones de tipo gap. Como en las uniones de tipo gap, el transporte a través de los plasmodesmos está regulado. Por ejemplo, experimentos realizados mediante la inyección de colorantes demuestran que pueden constituir barreras reguladoras del transporte de moléculas, incluidas las de bajo peso molecular, entre células o grupos de ellas conectadas por plasmodesmos. Sin embargo, se desconocen los mecanismos que restringen la comunicación en estos casos.

Durante el desarrollo vegetal, grupos de células de los meristemos de raíz y vástago emiten señales que resultan necesarias en el proceso de definición del futuro destino de esas células (tratado en el Capítulo 22). Parte de las señales implicadas en este proceso de determinación celular, como son las proteínas de regulación génica, pasan de una célula a otra a través de los plasmodesmos. Este transporte lo realizan uniéndose a determinados componentes de las uniones, lo que les permite superar el mecanismo de exclusión por tamaño que, de haberse unido, les impediría su paso. Incluso en algunos casos, hasta el mRNA que codifica estas proteínas es transportado de igual manera. Algunos virus vegetales también aprovechan esta vía, facilitando el paso de una célula a otra de RNA vírico o incluso de la partícula vírica completa. Así, estos virus sintetizan proteínas que se unen a componentes de los plasmodesmos e incrementan notablemente el calibre efectivo del canal. Los componentes funcionales que median este efecto son desconocidos y también se desconoce cómo las macromoléculas, ya sean endógenas o virales, regulan las propiedades del transporte por el canal para poder pasar a su través.

Resumen

Las células de algunos tejidos animales, tanto epiteliales como no epiteliales, se acoplan mediante uniones formadoras de canal llamadas uniones de tipo gap. Éstas consisten en placas de conexones agrupados que a menudo permiten el paso directo de moléculas más pequeñas de 1000 daltons desde el interior de una célula a otra. Las células pueden regular la permeabilidad de estas uniones. Las uniones de tipo gap son estructuras dinámicas ya que continuamente se reclutan conexones nuevos hacia la periferia de la placa mientras que los viejos son extraídos de su centro.

Las células conectadas a través de estas uniones comparten la mayoría de iones inorgánicos así como otras pequeñas moléculas, por lo que están acopladas química y eléctricamente. Las uniones de tipo gap son importantes en la coordinación de las actividades de las células eléctricamente activas y desempeñan en otros grupos celulares un papel de coordinación similar. En vegetales, las células están unidas por uniones comunicantes denominadas plasmodesmos. Aunque en términos estructural son diferentes a las uniones de tipo gap y pueden transportar macromoléculas portadoras de información, funcionan como las de tipo gap permitiendo el paso de pequeñas moléculas de una célula a otra y bloqueando el paso de moléculas de mayor tamaño.

LA LÁMINA BASAL

Los tejidos no sólo están formados por células. Una parte de su volumen –algunas veces una gran parte de él– lo constituye el *espacio extracelular*, que está ocupado por una red macromolecular que constituye la *matriz extracelular*. Esta matriz está compuesta por diversos polisacáridos y proteínas secretados y ensamblados localmente formando una compleja red que se encuentra en íntima asociación con las superficies de las células que la produce.

En nuestro organismo, las formas más llamativas de matriz extracelular se encuentran en los tejidos conjuntivos –como el hueso y el tendón– y en la capa dérmica de la piel. Sin embargo, en los animales en general, desde un punto de vista evolutivo, adquiere importancia un tipo de matriz extracelular que forma una estructura no tan evidente: es la llamada **lámina basal** (también denominada **membrana basal**). Esta delgada, resistente y flexible lámina de moléculas de matriz es esencial para el sostenimiento de los epitelios y, a pesar de su pequeño volumen, desempeña un papel crucial en la arquitectura del cuerpo. Como las cadherinas, parece que la lámina basal es una de las características comunes que definen a los animales pluricelulares. Otras formas de matriz extracelular son más variables de un filum animal a otro, tanto en su composición como en su abundancia.

En esta sección trataremos de la lámina basal propiamente dicha y en la siguiente cómo interactúan las células epiteliales y la lámina basal entre sí a través de *integrinas* localizadas en las membranas de las células epiteliales; las integrinas están presentes en otros tipos celulares mediando sus interacciones con los diferentes tipos de matriz extracelular de los tejidos conjuntivos. Estas otras formas de matriz extracelular se describirán en detalle más adelante.

Las láminas basales subyacen a todos los epitelios y envuelven algunos tipos celulares no epiteliales

Las láminas basales tienen por lo general un grosor de entre 40 y 120 nm. La capa de lámina basal no sólo subyace a todos los epitelios sino que también envuelve individualmente a células musculares, adipocitos y células de Schwann (que se enrollan alrededor de los nervios periféricos formando la vaina de mielina). De esta manera, las láminas basales separan las células y epitelios de los tejidos conjuntivos subyacentes o periféricos y forman la conexión mecánica entre ellos. En otras localizaciones, como en el glomérulo renal, la lámina basal se sitúa entre dos capas celulares y actúa como un filtro selectivo (**Figura 19–39**). Sin embargo, la lámina basal ejerce otras funciones además de las estructurales y de filtrado, ya que también puede determinar la polaridad celular, influir en el metabolismo celular, organizar las proteínas de las membranas plasmáticas adyacentes, promover la supervivencia, proliferación y diferenciación celulares, y actuar como vía específica para la migración celular.



Figura 19–39 Tres modelos de organización de la lámina basal. Las láminas basales (*amarillo*) rodean algunos tipos celulares (como las fibras musculares), se sitúan en la región basal de los epitelios y se interponen entre dos capas celulares (como en el glomérulo renal). En el glomérulo renal, ambas capas epiteliales presentan espacios y la lámina basal ejerce una función tanto de soporte como de filtración, determinando qué moléculas pasarán de la sangre a la orina. La filtración también depende de otras estructuras proteicas, llamadas *diafragmas de hendidura*, que cubren los espacios intercelulares de la lámina epitelial.

No obstante, su función mecánica es esencial. Por ejemplo, la capa más externa de la piel, la epidermis, depende de la resistencia de la lámina basal para poder continuar unida al tejido conjuntivo subyacente o dermis. Las personas que tienen defectos genéticos en proteínas de la lámina basal o en ciertos tipos de colágena que unen la lámina basal al tejido conjuntivo subyacente, presentan una epidermis separada de la dermis. Este hecho causa la *epidermolisis bullosa juntural*, un grave trastorno que cursa con vesículas en la piel que en ocasiones es letal.

La laminina es el principal componente de la lámina basal

La lámina basal se sintetiza por las células que se encuentran en cada una de sus caras: las células epiteliales sintetizan un grupo de componentes mientras que las células del tejido conjuntivo subyacente (llamado *estroma*, palabra griega que significa "cama") contribuyen a la síntesis de otros componentes (**Figura 19–40**). Como otras matrices extracelulares de los tejidos animales, la lámina basal consiste en dos clases de macromoléculas extracelulares: (1) proteínas fibrosas (glucoproteínas con una cadena corta de oligosacáridos adherida a ellas) y (2) cadenas de polisacáridos del tipo *glucosaminoglucanos* (*GAG*), que por lo general se encuentran unidos covalentemente a *proteínas centrales* formando *proteoglucanos* (**Figura 19–41**). Más adelante se describen con mayor detalle estos dos tipos de moléculas de matriz; en esta sección se mencionan debido a que son un grupo de proteínas localizadas en las láminas basales.

Aunque su composición exacta varía de un tejido a otro e incluso de una región a otra en la misma lámina, la mayoría de láminas basales maduras contienen *colágena de tipo IV*, proteoglucano del tipo heparán sulfato denominado *perlecano* y glucoproteínas como la *laminina* y el *nidógeno*. Junto a todos estos componentes presentes en las láminas basales de la mayoría de los animales, desde las medusas a los mamíferos, las láminas basales incluyen en su interior, o están estrechamente asociadas a ellas, otras moléculas como la *colágena de tipo XVIII* (típico miembro de la familia de las colágenas que forma el núcleo proteico de los proteoglucanos) y la *fibronectina*, una proteína fibrosa que participa en la adhesión de las células a la matriz extracelular en el tejido conjuntivo.

Parece que la laminina es el organizador primario de la estructura laminar, ya que se ha descrito que en los primeros estadios del desarrollo la lámina basal está constituida mayoritariamente por esta molécula. La **laminina-1** (laminina clásica) es una proteína grande y flexible que se compone de tres cadenas polipeptídicas muy largas (α, β y γ) unidas entre sí por enlaces disulfuro y organizadas en forma de ramillete asimétrico parecido a un ramo de tres

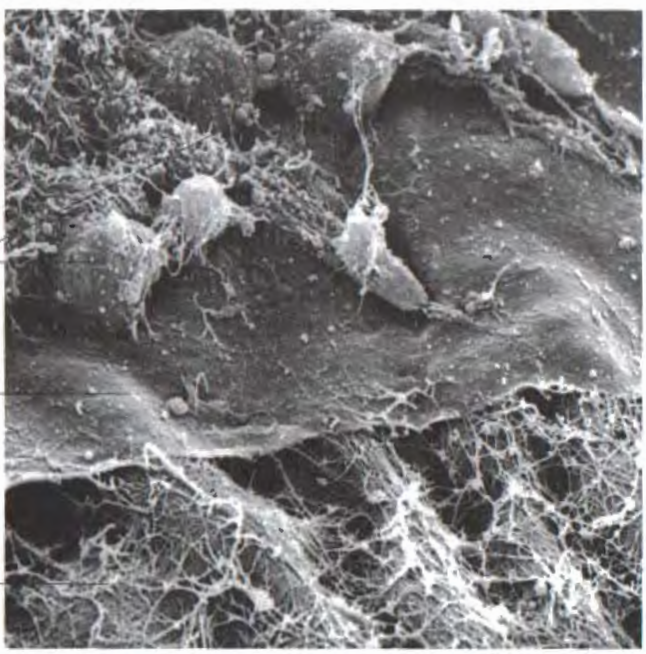


Figura 19–40 Lámina basal de la córnea de un embrión de pollo. En esta imagen, obtenida mediante microscopía electrónica de barrido, se han retirado algunas de las células epiteliales para que quede expuesta la cara superior de la lámina basal. La red de fibrillas de colágena del tejido conjuntivo subyacente interactúa con la cara inferior de la lámina. (Cortesía de Robert Trelstad.)

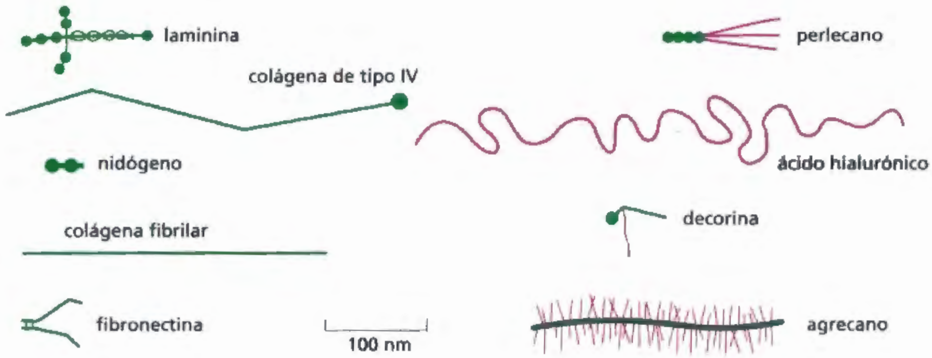


Figura 19–41 Esquema comparativo de las formas y tamaños de algunas de las principales macromoléculas de la matriz extracelular. La proteína está representada en *verde* y el glucosaminoglucano en *rojo*.

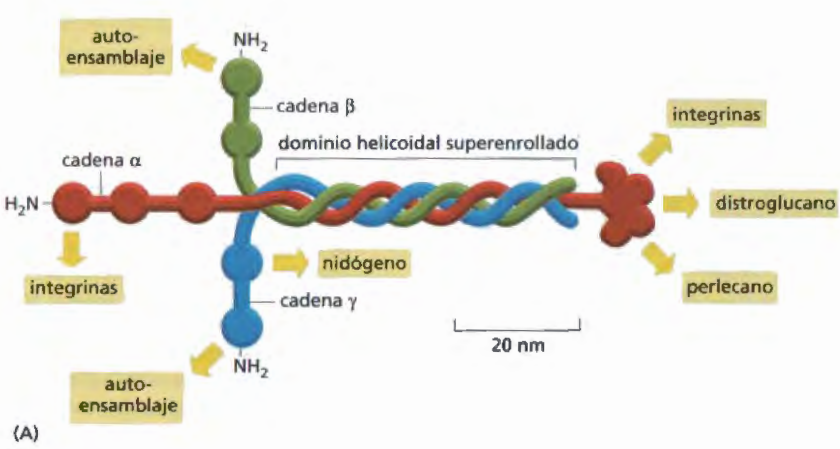
flores cuyos troncos están enrollados entre sí en la base pero separados en el extremo superior (**Figura 19–42**). Estos heterotrímeros pueden ensamblarse por sí solos *in vitro* formando una red debido a las interacciones entre sus cabezas, aunque para organizar de manera ordenada esta red formando una lámina se requiere la interacción con las células. Dado que de cada tipo de cadena existen diversas isoformas y que estas isoformas pueden asociarse en distintas combinaciones, se pueden constituir diferentes lamininas y generar así láminas basales con propiedades distintas. Sin embargo, la cadena de la laminina γ-1 es uno de los componentes de la mayoría de heterotrímeros de laminina; los animales que son deficientes en ella mueren durante la embriogénesis, ya que no son capaces de formar láminas basales.

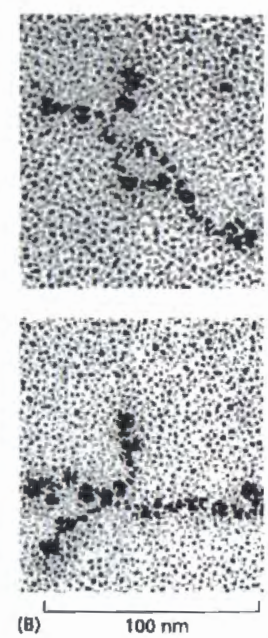
Las colágenas de tipo IV confieren a la lámina basal resistencia a la tracción

Las **colágenas de tipo IV** son el segundo componente esencial de las láminas basales maduras y también se presentan en diferentes isoformas. Como las *colágenas fibrilares* que constituyen el grueso de proteínas en tejidos conjuntivos como el hueso y el tendón (descritos más adelante), las colágenas de tipo IV son moléculas constituidas por tres cadenas proteicas largas, sintetizadas por separado y que se enrollan entre sí formando una superhélice en forma de cuerda. Sin embargo, y a diferencia de las colágenas fibrilares, esta estructura helicoidal triple se ve interrumpida en más de 20 regiones formando múltiples puntos por los que se dobla. Las moléculas de colágena de tipo IV interaccionan mediante sus dominios terminales formando un red extracelular flexible y proporcionando a la lámina basal resistencia a la tracción.

Pero ¿de qué forma estas redes de laminina y colágena de tipo IV se unen entre sí y a las superficies celulares que se apoyan en la lámina basal? ¿Por qué forman una lámina bidimensional y no un gel tridimensional? Las moléculas de laminina presentan varios dominios funcionales, incluyendo el que se une al proteoglucano perlecano, que a su vez se une a nidógeno, y los dos o más que se unen a proteínas receptoras de laminina en las superficies celulares. La colágena de tipo IV también presenta dominios que se unen a nidógeno y perlecano. Por tanto, se supone que el nidógeno y el perlecano actúan como enlaces que

Figura 19–42 Estructura de la laminina. (A) Subunidades de una molécula de laminina-1 y lugares de unión a otras moléculas (*recuadros amarillos*). La laminina es una glucoproteína multidominio formada por tres polipéptidos (α, β y γ) que se hallan unidas mediante enlaces disulfuro dando lugar a una estructura asimétrica en forma de cruz. Cada una de las cadenas polipeptídicas está constituida por más de 1500 residuos de aminoácido. Se han identificado cinco tipos de cadenas α, tres tipos de cadenas β y tres tipos de cadenas γ, las cuales pueden asociarse formando 45 (5 × 3 × 3) isoformas diferentes de laminina. Algunas de ellas han sido caracterizadas y presentan una distribución tisular característica. A través de sus dominios de unión a otras proteínas, las moléculas de laminina tienen un papel central en la organización del ensamblaje de las láminas basales y en el anclaje de éstas a las células. (B) Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión de moléculas de fibronectina tras haber sido sombreadas con platino. (B, de J. Engel et al., *J. Mol. Biol.* 150:97-120, 1981. Con la autorización de Academic Press.)





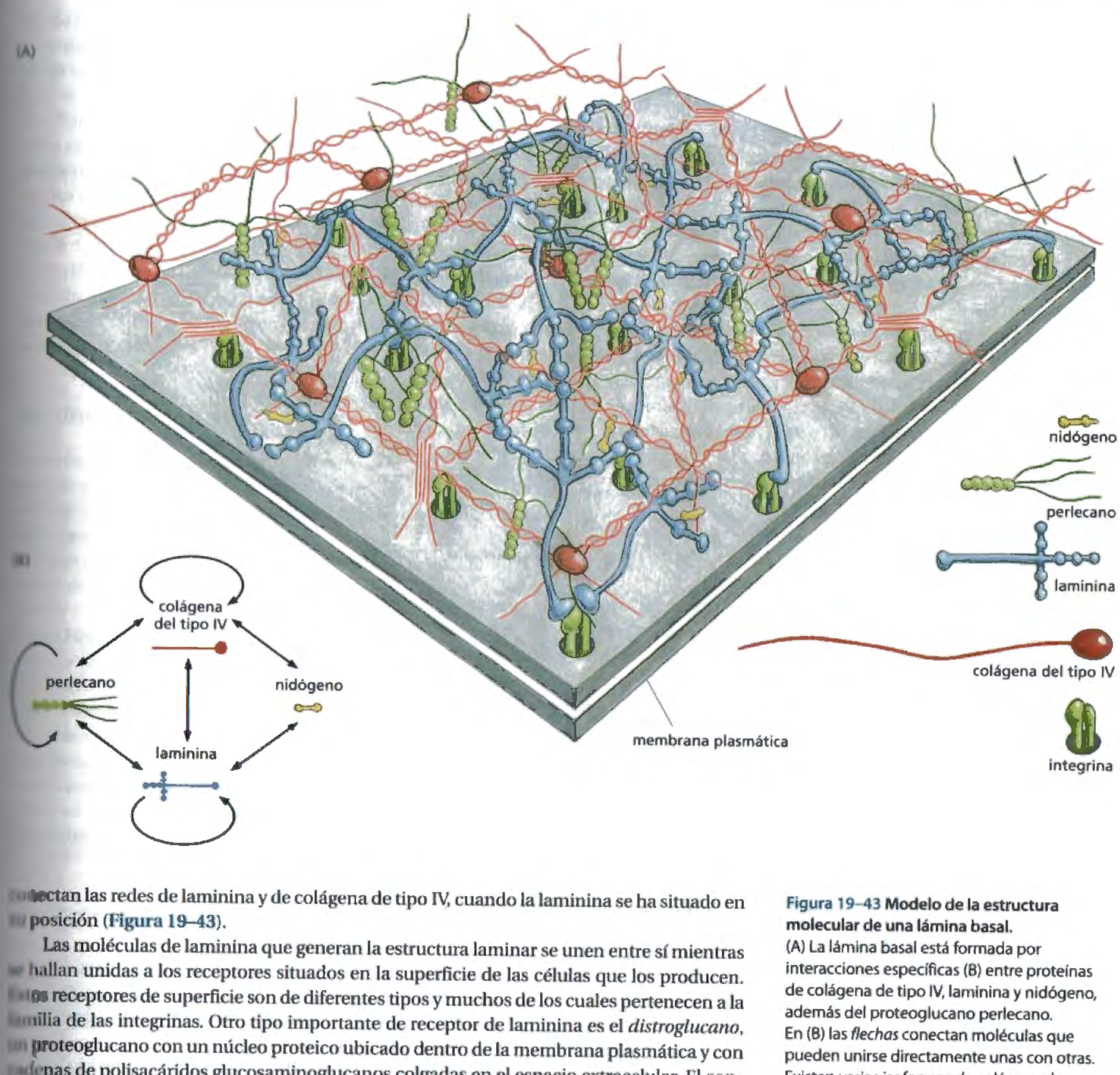


Figura 19–43 Modelo de la estructura molecular de una lámina basal. (A) La lámina basal está formada por interacciones específicas (B) entre proteínas de colágena de tipo IV, laminina y nidógeno, además del proteoglucano perlecano. En (B) las *flechas* conectan moléculas que pueden unirse directamente unas con otras. Existen varias isoformas de colágena de tipo IV y laminina, cada una de las cuales presentan una distribución tisular específica. Se supone que los receptores transmembrana para la laminina (integrinas y distroglucano, aunque sólo se muestran las primeras) organizan el ensamblaje de la lámina basal en la membrana de la célula. (Basado en H. Colognato y P.D. Yurchenco *Dev. Dynamics* 218:213-234, 2000. Con la autorización de Wiley-Liss.)

conectan las redes de laminina y de colágena de tipo IV, cuando la laminina se ha situado en su posición (Figura 19–43).

Las moléculas de laminina que generan la estructura laminar se unen entre sí mientras se hallan unidas a los receptores situados en la superficie de las células que los producen. Estos receptores de superficie son de diferentes tipos y muchos de los cuales pertenecen a la familia de las integrinas. Otro tipo importante de receptor de laminina es el *distroglucano*, un proteoglucano con un núcleo proteico ubicado dentro de la membrana plasmática y con cadenas de polisacáridos glucosaminoglucanos colgadas en el espacio extracelular. El conjunto de estos receptores organiza el ensamblaje de la lámina basal sujetando las moléculas de laminina por sus dominios basales y dejando los dominios apicales libres para interaccionar y formar así una red bidimensional que, seguramente, coordina, a su vez, el ensamblaje de otros componentes de la lámina basal.

Las láminas basales realizan diversas funciones

Como ya se ha mencionado, una lámina basal extraordinariamente gruesa, localizada en el glomérulo renal, actúa como un filtro molecular regulando el paso de macromoléculas desde la sangre hasta la orina a medida que ésta se va formando (véase la Figura 19–39). Los proteoglucanos de la lámina basal parecen desempeñar un papel importante en esta función ya que, cuando las cadenas de GAG son degradadas mediante enzimas específicas, desaparecen las propiedades filtrantes de la lámina. La colágena de tipo IV también desempeña una función en esta lámina basal, ya que mutaciones que afectan a los genes que la codifican provocan el trastorno renal humano hereditario conocido como *síndrome de Alport*, que consiste en una disfunción del filtro glomerular por un aumento desmesurado de su tamaño. Las mutaciones en genes que codifican laminina también pueden alterar

la función del filtro renal pero de distinta manera: la ausencia de laminina interfiere en la diferenciación de las células que sostienen dichos filtros.

La lámina basal puede actuar como una barrera selectiva para la migración de las células y como filtro para determinadas moléculas. Por ejemplo, la lámina sobre la que se apoya un epitelio impide que los fibroblastos del tejido conjuntivo establezcan contacto con las células epiteliales. Sin embargo no es obstáculo para el paso de células tales como macrófagos, linfocitos o terminales nerviosos, que usan enzimas proteasas específicas que para atravesarla abren huecos en ella. La lámina basal también constituye un elemento importante para la regeneración de tejidos dañados. Cuando se produce un daño o muerte celular en tejidos como el muscular, el nervioso o el epitelial, la lámina basal se mantiene, proporcionando un entramado a través del cual las células regeneradas pueden migrar, lo cual facilita la reconstrucción de la arquitectura del tejido original.

Un ejemplo muy interesante de la importancia que tiene la lámina basal en la regeneración tisular lo proporciona el estudio de la *unión neuromuscular*, donde los terminales nerviosos de la neurona motora forman una *sinapsis* química con la fibra muscular (tratado en el Capítulo 11). En vertebrados la lámina basal que rodea a la fibra muscular separa las membranas plasmáticas del nervio y de la fibra muscular en la zona de la sinapsis. Esta región sináptica de la lámina basal presenta una composición molecular característica, ya que incorpora isoformas especiales de colágena de tipo IV y laminina, así como un proteoglicano denominado *agrina*.

Esta región sináptica de la lámina basal desempeña un papel central en la reconstrucción de la sinapsis después de una lesión del nervio o del músculo. Si un músculo de rana y su nervio motor son destruidos, la lámina basal que rodea cada una de las fibras musculares permanece intacta, de forma que pueden reconocerse los lugares en los que se localizaban las antiguas uniones neuromusculares. Si se permite que el nervio motor se regenere pero el músculo no, los axones nerviosos buscan la localización de las sinapsis originales en la lámina basal ahora vacía, diferenciándose finalmente como terminales nerviosos que presentan una apariencia normal. Así, la lámina basal puede por sí misma guiar la regeneración de los terminales de los nervios motores.

Experimentos similares muestran que la lámina basal también controla la localización de los receptores de acetilcolina que se agrupan en la membrana plasmática de la fibra muscular de la unión neuromuscular. Si el músculo y el nervio son destruidos y, posteriormente, se permite que el músculo se regenere pero el nervio no, los receptores para acetilcolina expresados por el músculo regenerado se localizan sobre todo en la región de las antiguas uniones, a pesar de que el nervio esté ausente (**Figura 19–44**). Parece que la lámina basal de unión coordina la organización espacial local de los componentes que en cada

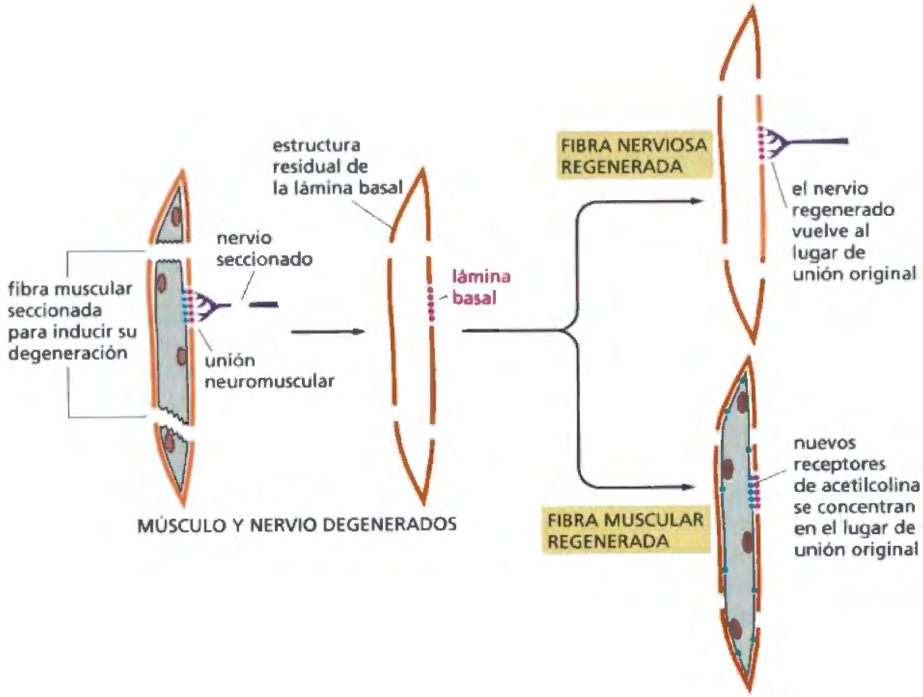


Figura 19–44 Experimentos de regeneración que indican el carácter especial adquirido por la lámina basal en una unión neuromuscular. Cuando el nervio se regenera pero el músculo no, tras haber sido dañados ambos (parte *superior* de la figura), la lámina basal dirige el nervio regenerante hacia el lugar que ocupaba la sinapsis original. Cuando se regenera el músculo pero no el nervio (parte *inferior* de la figura), la lámina basal induce una nueva síntesis de receptores de acetilcolina (*azul*) que se acumulan en el lugar donde se localizaba la sinapsis original. El músculo se regenera a partir de las células satélite (serán tratadas en el Capítulo 23) que se localizan entre la lámina basal y la célula muscular original, la cual no está representada. Estos experimentos muestran que la lámina basal controla la localización de los componentes sinápticos en ambos lados de la lámina.

una de las dos células forman la unión neuromuscular. Se han identificado algunas de las proteínas que forman esta matriz. Así, por ejemplo, los axones de las neuronas motoras secretan en la región de la unión neuromuscular la agrina, la cual desencadenará el ensamblaje de los receptores de acetilcolina y de otras proteínas en la membrana plasmática de la fibra muscular. A la inversa, en esta misma región, las fibras musculares secretan una isoforma específica de laminina; se tienen evidencias de que ésta se uniría de forma directa al dominio extracelular de canales de voltaje dependientes de Ca^{2+} en la membrana presináptica de la terminación nerviosa, facilitando así que estos canales se mantengan donde sean necesarios. Tanto las agrinas como la isoforma sináptica de laminina son esenciales para la formación de una unión neuromuscular funcional. Defectos en los componentes de una lámina basal o en las proteínas que sujetan los componentes de las fibras musculares a ella en la sinapsis son los responsables de muchas de las formas de distrofia muscular, donde los músculos se desarrollan normalmente al principio pero degeneran en los últimos años de vida.

Resumen

La lámina basal es una lámina fina y resistente de matriz extracelular que subyace a los epitelios en todos los animales pluricelulares. También envuelve otros tipos celulares como las fibras musculares. Todas las láminas basales están organizadas en un entramado de moléculas de laminina unidas entre sí por sus brazos laterales y se agarran a las caras basales de las células epiteliales por debajo mediante sus uniones con integrinas y otros receptores localizados en la membrana plasmática basal. Dentro de esta estructura, también se localizan moléculas de colágena de tipo IV ensambladas en una red laminar que será un componente esencial de las láminas basales maduras. En estas membranas basales maduras, las redes de colágena y de laminina están unidas por nidógeno y por perlecano, un proteoglucano del tipo heparán sulfato.

Las láminas basales confieren un soporte mecánico a los epitelios, forman la interfase y la unión entre epitelios y tejido conjuntivo, actúan de filtro en el riñón, como barreras que mantienen a las células en su compartimiento adecuado, influyen en la polaridad y diferenciación celulares, guían las migraciones celulares y algunas moléculas incrustadas en ellas participan en la organización de estructuras complejas como las sinapsis neuromusculares. Cuando las células sufren un daño o mueren, a menudo las láminas basales sobreviven y guían la posterior regeneración tisular.

INTEGRINAS Y ADHESIÓN CÉLULA-MATRIZ

Las células sintetizan, organizan y degradan la matriz extracelular y ésta, a su vez, ejerce una gran influencia sobre las células. Estas influencias son ejercidas principalmente a través de proteínas transmembrana de adhesión celular que actúan como *receptores de matriz*. Este tipo de proteínas enlazan la matriz extracelular al citoesqueleto intracelular, pero su función va más allá de ser una simple unión mecánica pasiva. A través de ellas, los componentes de la matriz pueden influir en la mayoría de los aspectos del comportamiento celular. Los receptores de membrana ejercen un papel importante en las células epiteliales, al mediar las interacciones de éstas con la lámina basal subyacente, y en las células del tejido conjuntivo, al mediar sus interacciones con la matriz que les rodea.

Diversos tipos de moléculas, entre las que se encuentran los proteoglucanos transmembrana, pueden actuar como receptores o como correceptores de matriz. Pero los principales receptores en células animales son las **integrinas**, que se unen a la mayoría de las proteínas de la matriz extracelular. Como ocurre con las cadherinas y con los componentes clave de la lámina basal, las integrinas son unas de las herramientas arquitectónicas fundamentales que caracterizan a los animales pluricelulares. Los miembros de esta gran familia de moléculas transmembrana de adhesión poseen la habilidad de transmitir señales en ambos sentidos a través de la membrana celular. La unión de un componente de matriz a una integrina puede enviar un mensaje al interior de la célula y, a su vez, ciertas condiciones en el interior celular pueden enviar una señal hacia el exterior controlando la unión de la integrina a la matriz (o en algunos casos a una molécula de superficie de otra célula, tal como se describió en el caso de las células sanguíneas unidas a las células endoteliales). La tensión aplicada sobre la integrina puede estrechar sus uniones a estructuras intra o extracelulares; la pérdida de tensión puede provocar la pérdida de estas uniones y los complejos de

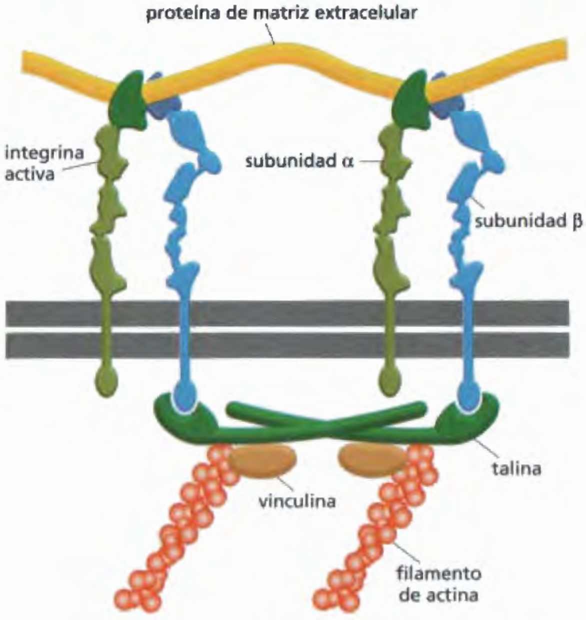


Figura 19–45 Estructura de una molécula de integrina activa que enlaza la matriz extracelular con el citoesqueleto de actina. La cabeza de la molécula de integrina se une directamente a una proteína extracelular como la fibronectina mientras que la cola intracelular se une a talina. Otras proteínas intracelulares de anclaje, incluidas la α-actinina, la filamina y la vinculina, ayudan a reforzar este enlace.

señalización molecular desaparecen en cada una de las dos caras de la membrana. En este sentido, las integrinas pueden actuar no sólo transmitiendo señales mecánicas y moleculares sino convirtiendo un tipo de señal en otro. Los estudios sobre la estructura de la molécula de integrina han empezado a desvelar cómo realiza estas funciones.

Las integrinas son heterodímeros transmembrana que se unen al citoesqueleto

Existe una gran variedad de integrinas –por lo menos 24 en humanos– pero todas ellas siguen un mismo patrón. Una molécula de integrina está constituida por dos subunidades transmembrana glucoproteicas unidas entre sí de forma no-covalente, denominadas α y β. Ambas subunidades se localizan en la membrana celular y presentan pequeñas colas intracelulares C-terminales y largos dominios extracelulares N-terminales. La porción extracelular de un dímero de integrina se une específicamente a secuencias de aminoácidos de proteínas de matriz extracelular, tales como las lamininas o las fibronectinas, o en algunos casos a ligandos localizados en las superficies de otras células. La porción intracelular se une a un complejo de proteínas que forman la unión con el citoesqueleto.

En todas menos una de las 24 variedades de integrinas humanas, esta unión intracelular a filamentos de actina se lleva a cabo mediante *talina* y un grupo de otras proteínas de anclaje intracelular (**Figura 19–45**). Como veremos más adelante, parece que la talina es un componente clave de este enlace. Como ocurre con las uniones intercelulares mediadas por cadherinas, las uniones célula-matriz asociadas a actina y formadas por integrinas pueden ser pequeñas, discretas y transitorias, o bien grandes, prominentes y duraderas. Ejemplos de estas últimas los encontramos en las *adhesiones focales* que se forman cuando los fibroblastos disponen del tiempo suficiente para formar fuertes uniones a la superficie rígida de una placa de cultivo, o en las *uniones miotendinosas* que unen las fibras musculares con sus tendones.

En los epitelios, las regiones de unión célula-matriz más prominentes son los hemidesmosomas, en los que un tipo específico de integrina (la $\alpha_6\beta_4$) ancla las células a la laminina de la lámina basal. En este caso único, el enlace intracelular se realiza con filamentos de queratina mediante proteínas de anclaje intracelular como la plectina y la distonina (**Figura 19–46**).

Las integrinas pueden cambiar de una conformación activa a otra inactiva

Una célula que migra por un tejido –por ejemplo un fibroblasto o un macrófago, o una célula epitelial que migra a lo largo de la lámina basal– tiene que ser capaz de formar y romper

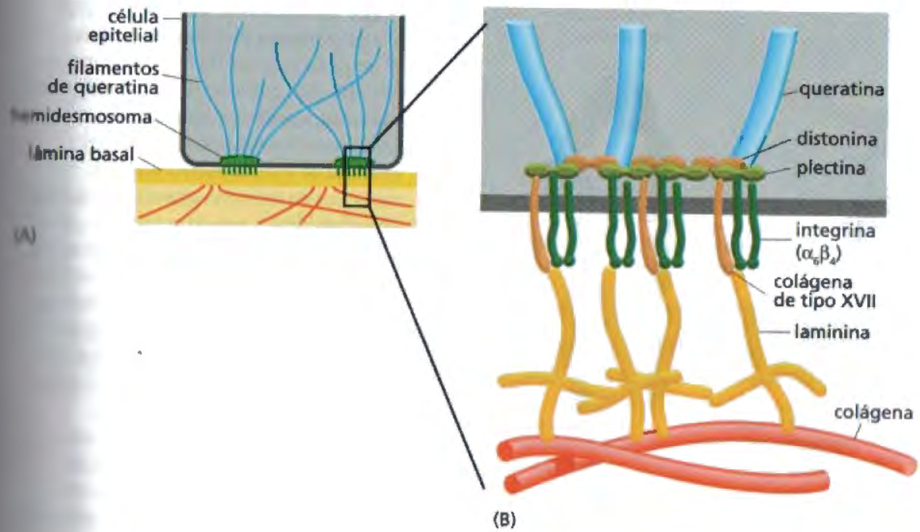


Figura 19–46 Hemidesmosomas. (A) Los hemidesmosomas anclan las células epiteliales a la lámina basal, enlazando la laminina extracelular a los filamentos de queratina intracelulares. (B) Componentes moleculares de un hemidesmosoma. Una integrina especializada (la integrina $\alpha_6\beta_4$) se extiende por la membrana uniéndose a filamentos de queratina intracelulares por proteínas de anclaje llamadas plectina y distonina, y a laminina en el exterior de la célula. Este complejo de adhesión también contiene, en paralelo a la integrina, la colágena de tipo XVII, un miembro poco habitual de la familia de las colágenas que presenta un dominio transmembrana unido a una porción extracelular de tipo colágena. Defectos en cualquiera de estos componentes pueden producir enfermedades relacionadas con formación de ampollas en la piel.

uniones a la matriz; cuanto más rápido lo haga, más rápido migrará. <TGAT> De manera similar, un leucocito circulante tiene que ser capaz de activar y desactivar su capacidad de unión a las células endoteliales con el fin de abandonar el vaso sanguíneo en los lugares donde haya inflamación y en las circunstancias propicias. Además, si la fuerza es aplicada donde es necesaria, en todos estos casos la formación y la destrucción de las uniones extracelulares tiene que estar asociada al repentino ensamblaje y desensamblaje de las uniones intracelulares del citoesqueleto. Las moléculas de integrina localizadas en membrana y que median las uniones no pueden ser simples objetos rígidos y pasivos con regiones de adhesión en sus dos extremos, sino que tienen que ser capaces de cambiar de un estado activo –cuando forman uniones– a un estado inactivo –cuando no las forman– y la unión a sus ligandos en una cara de la membrana tiene que alterar su predisposición a unirse a otros grupos de ligandos en la cara opuesta.

La base para estos fenómenos dinámicos es la regulación alostérica: en el momento en que una integrina se une o se separa de sus ligandos se producen cambios conformacionales que afectan a los terminales intra y extracelulares de la molécula. Un cambio estructural en uno de los dominios terminales se asocia a un cambio en el otro extremo por lo que la señal puede ser transmitida hacia cualquier sentido a través de la membrana celular. Las pinzas de madera que los leñadores utilizan para asir pequeños troncos de madera serían una sencilla analogía mecánica de este sistema (**Figura 19–47**).

Los cambios estructurales en las integrinas se pueden demostrar mediante el análisis por microscopía electrónica de una preparación purificada de estas moléculas. Si se mantienen las integrinas en un medio enriquecido en calcio similar al fluido extracelular normal, pero con algún ligando extracelular y, a continuación, rápidamente son procesadas para microscopía, aparecen como objetos perfectamente doblados en forma de "V". Pero si al medio se le añade un pequeño péptido sintético que contenga una secuencia que imita el dominio de unión a integrina de una proteína de matriz extracelular, las integrinas se unen a esta molécula y cambian de conformación, con dos extremos separados como si fueran patas que aguantan una cabeza superior (**Figura 19–48A**). Este par de estructuras se pueden analizar con más detalle mediante cristalografía de rayos X, la cual pone de manifiesto que las dos patas corresponden a cadenas α y β de integrina. La cabeza en la que coinciden ambas cadenas contiene la región de unión a los ligandos extracelulares. Así, la unión de un ligando distorsionaría esta región de modo que la molécula adopta la conformación extendida, es decir, la conformación "activa". La adopción de la conformación extendida genera



Figura 19–47 Tenazas para troncos de madera. Si se acercan las dos asas de las tenazas se consigue agarrar el tronco, y si, por el otro extremo, se acercan las puntas, también se provoca que se junten las asas. Además, cuanto mayor sea la fuerza con que se cogen las pinzas, más se aprieta en ambos extremos. En una molécula de integrina, los detalles de la unión son diferentes pero los principios mecánicos son similares: los cambios conformacionales de ambos extremos están acoplados, apretando cuando se acercan las asas.

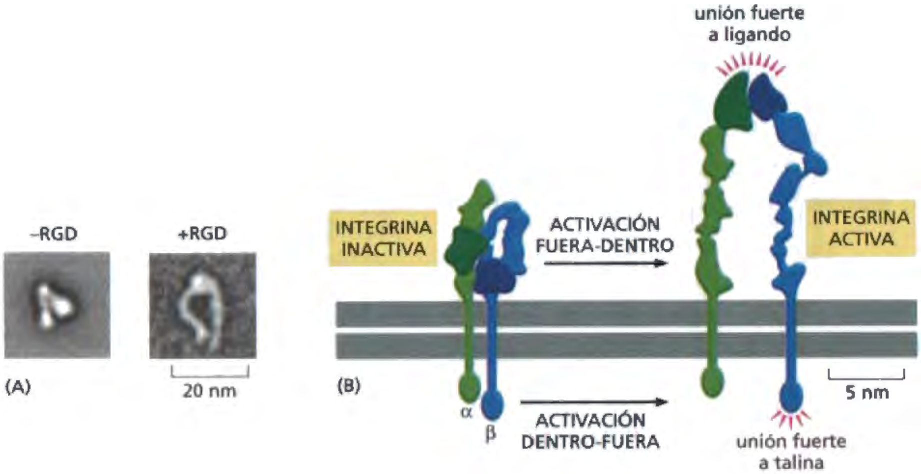


Figura 19–48 Cambio de conformación en una molécula de integrina cuando se une a su ligando. (A) Estas imágenes se han obtenido con la información de muchas electromicrografías, alineadas de forma similar, de moléculas de integrina. En ausencia de ligando extracelular, las moléculas de integrina aparecen pequeñas y muy plegadas. Cuando se incuban con un péptido RGD, las integrinas se despliegan y dejan al descubierto dos extremos en forma de patas. (B) Estructuras activa (extendida) e inactiva (plegada) de una molécula de integrina basadas en datos obtenidos por cristalografía con rayos X. Aunque es difícil cristalizar la molécula intacta en sus conformaciones naturales, unida o no a ligando, la cristalografía con rayos X de fragmentos moleculares concretos, nos proporciona una visión fiable de la estructura completa de la integrina. (A, de J. Takagi et al., *Cell* 110:599-611, 2002. Con autorización de Elsevier; B, basado en T. Xiao et al., *Nature* 432:59-67, 2004. Con autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

una región de unión más favorable que tenga una mayor afinidad con sus ligandos (Figura 19–48B).

Pero, ¿cómo se relacionan estos cambios de la región extracelular de la integrina con lo que sucede en su dominio intracelular? En su forma plegada, o estado inactivo, los dominios intracelulares de sus cadenas α y β permanecen juntos y se adhieren entre sí. Cuando el dominio extracelular se despliega, este contacto se rompe y las zonas intracelulares (y también las zonas transmembrana) de estas cadenas se separan. Como resultado de ello, en la cola de la cadena β queda expuesta una región de unión a talina. Esta unión a talina provoca el ensamblaje de filamentos de actina en el extremo intracelular de la molécula de integrina (véase Figura 19–45). De esta manera, cuando una integrina se une a su ligando fuera de la célula, reacciona uniendo su citoesqueleto a la molécula de integrina, por lo que puede aplicar una fuerza en el punto de fijación. Este mecanismo se conoce como "activación de fuera hacia dentro".

Esta cadena causa-efecto puede funcionar a la inversa, de dentro hacia fuera. La talina compite con las cadenas α de integrina por la unión a las cadenas β. Así, cuando la talina se une a una cadena β, impide la unión α-β, con lo que las dos patas de la molécula permanecen separadas. Este fenómeno conlleva que la porción extracelular de la integrina cambie a la forma extendida o activa.

Esta activación de "dentro a fuera" se desencadena por la acción de moléculas reguladoras intracelulares, entre las que se encuentran el fosfoinositidil PIP_2 (tratado en el Capítulo 15), el cual parece que es capaz de activar la talina para que ésta se una fuertemente a la cadena β de integrina. De este modo, una señal generada dentro de la célula puede desencadenar que la integrina encuentre y se una a sus ligandos extracelulares.

Moléculas de señal como el PIP_2 se producen en respuesta a señales recibidas desde el exterior de la célula a través de otros tipos de receptores de superficie celular tales como los receptores acoplados a proteína G o los receptores tirosina quinasa, los cuales controlarían así la activación de la integrina (**Figura 19–49**). Por el contrario, la activación de integrinas por su unión a la matriz puede influir en la recepción de señales por otras vías. El intercambio entre estas vías de comunicación, transmitiendo señales en ambas direcciones a través de la membrana celular, permite la generación de interacciones complejas entre las células y su entorno físico y químico.

Defectos en la integrina son los responsables de numerosas enfermedades genéticas

Los 24 tipos de integrina descritos en humanos están codificados por 8 genes distintos de la cadena α y 18 genes distintos de la cadena β, que dimerizan en diferentes combinaciones. Cada tipo de integrina tiene diferentes propiedades y funciones. Además, debido a que una misma molécula de integrina puede presentar diferentes afinidades por el ligando, se supone que otros factores específicos de la célula interactúan con las integrinas modulando su actividad. La unión de las integrinas a sus ligandos depende de los cationes divalentes extracelulares Ca^{2+} y Mg^{2+}, lo cual se refleja en la presencia de dominios de unión a estos ca-

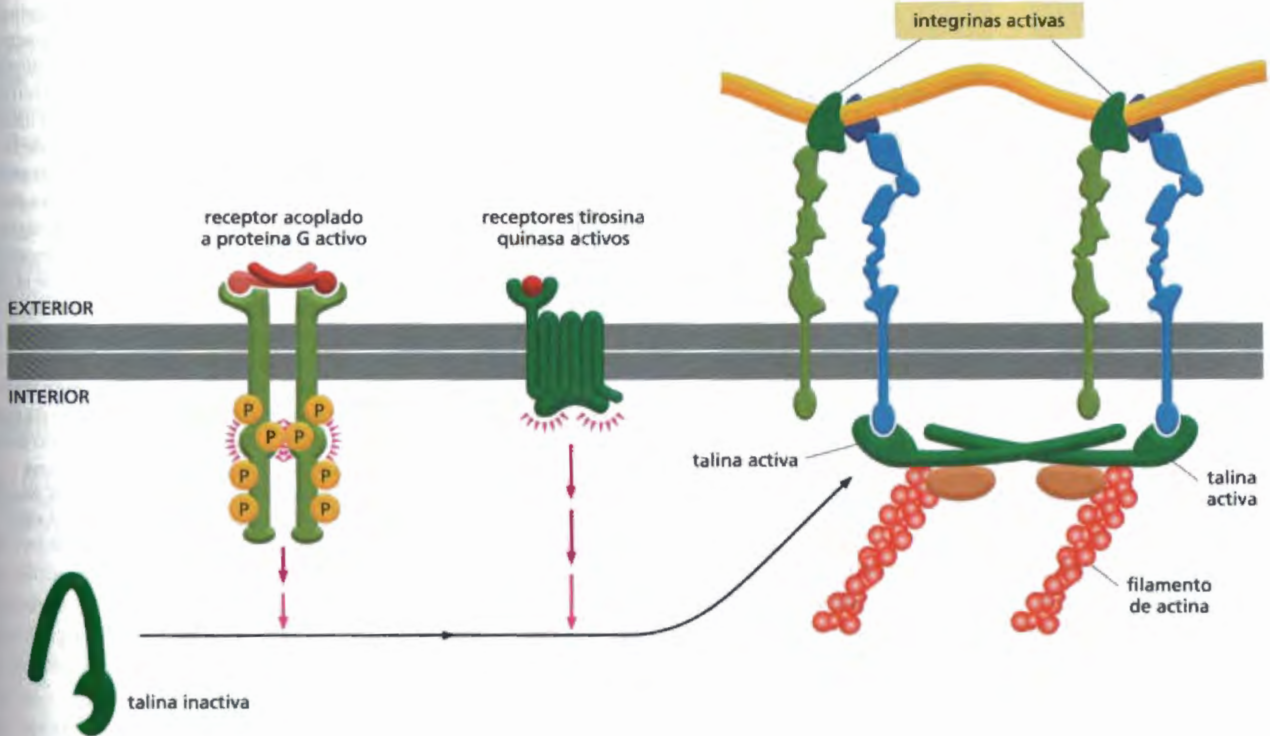


Figura 19–49 **Activación de las integrinas mediante la interacción con otras vías de señalización.** Las señales recibidas desde el exterior de la célula por otros tipos de receptores de superficie, tales como los receptores acoplados a proteína G y los receptores tirosina quinasa, pueden alterar la conformación de talina y, por tanto, activar la integrina celular.

iones en la región extracelular de las subunidades α y β. El tipo de cationes divalentes puede influir tanto en la afinidad como en la especificidad de la unión de una integrina a sus ligandos.

A pesar de que existe un solapamiento en las actividades de las diferentes integrinas –por ejemplo, al menos cinco de ellas se unen a laminina–, hay que destacar la diversidad de funciones de las integrinas. En la **Tabla 19–4** se refleja un listado de las variedades de integrinas y los problemas que causa la eliminación de sus cadenas α y β.

Las subunidades β_1, que forman dímeros con al menos 12 subunidades α distintas, se han localizado en casi todas las células de vertebrados. Así, por ejemplo, $\alpha_5\beta_1$ es un receptor de la fibronectina, mientras que $\alpha_6\beta_1$ es un receptor para la laminina en numerosos tipos celulares. Los ratones mutantes que no pueden expresar la subunidad β_1 mueren en el momento de su implantación, mientras que aquellos que no expresan α_7 (la subunidad que forma pareja con β_1 en el músculo) sobreviven, aunque desarrollan una distrofia muscular, ya

Tabla 19–4 Algunos tipos de integrinas

INTEGRINA	LIGANDO*	DISTRIBUCIÓN	FENOTIPO CON LA SUBUNIDAD α ALTERADA	FENOTIPO CON LA SUBUNIDAD β ALTERADA
$\alpha_5\beta_1$	fibronectina	ubicuo	muerte de embriones; vasos sanguíneos, somitas y cresta neural defectuosos	muerte prematura en embriones (en la implantación)
$\alpha_6\beta_1$	laminina	ubicuo	grave trastorno que produce vesículas en la piel; alteraciones en otros epitelios	muerte prematura en embriones (en la implantación)
$\alpha_7\beta_1$	laminina	músculo	distrofia muscular; uniones miotendinosas defectuosas	muerte prematura en embriones (en la implantación)
$\alpha_L\beta_2$ (LFA1)	contrarreceptores pertenecientes a la superfamilia Ig (ICAM)	leucocitos	reclutamiento de leucocitos alterado	deficiencia en la adhesión de leucocitos (LAD); respuesta inflamatoria defectuosa; infecciones mortales recurrentes
$\alpha_{IIb}\beta_3$	fibrinógeno	plaquetas	hemorragia; no agregación de plaquetas (enfermedad de Glanzmann)	hemorragia; no agregación de plaquetas (enfermedad de Glanzmann); leve osteopetrosis
$\alpha_6\beta_4$	laminina	hemidesmosomas epiteliales	formación de ampollas en la piel; alteraciones en otros epitelios	formación de ampollas en la piel; alteraciones en otros epitelios

*No se citan todos los ligandos.

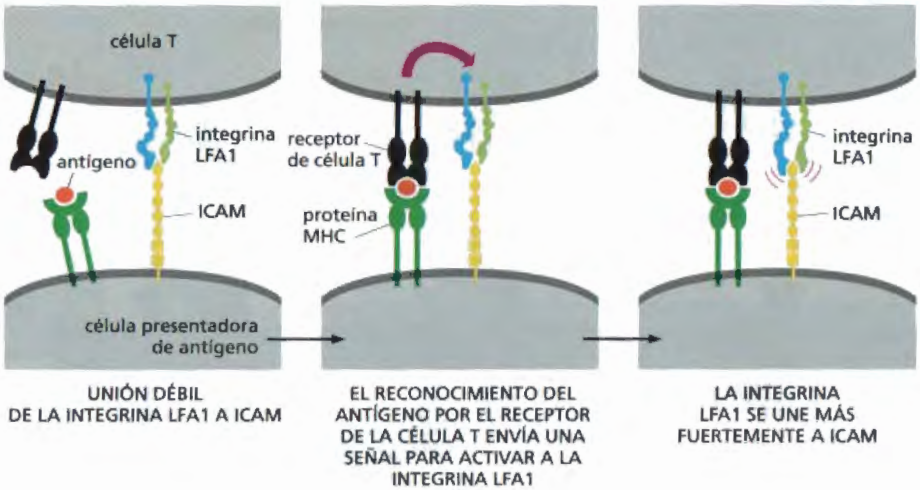


Figura 19–50 Activación de la integrina cuando un linfocito T entra en contacto con una célula presentadora de antígeno. Al principio, las dos células se adhieren de forma débil mediante la unión de la integrina LFA1 de la célula T con la molécula de la superfamilia de las IgG ICAM situada en la membrana de la célula presentadora de antígeno. Si al mismo tiempo, el receptor de la célula T reconoce a su antígeno específico presentado por la molécula MHC de la célula presentadora de antígeno, se genera una respuesta intracelular desde el receptor de la célula T que activa la integrina LFA1. Como consecuencia de ello, LFA1 se une más fuerte y persistentemente a ICAM, lo que da tiempo a la célula presentadora de antígeno a activar la célula T y, por tanto, a provocar una respuesta inmune. (Adaptado de K. Murphy et al., Janeway's Immunobiology, 7.ª ed. New York: Garland Science, 2008.)

que los ratones no pueden expresar el receptor para la laminina (como ocurre en ratones que no pueden expresar el ligando laminina de la integrina $\alpha_7\beta_1$).

Las subunidades β_2 forman dímeros con al menos cuatro subunidades α. Se expresan exclusivamente en la superficie de los leucocitos, donde desempeñan un papel esencial facilitando que estas células combatan las infecciones. Las integrinas β_2 median principalmente la unión célula-célula (no entre las células y la matriz) uniéndose a ligandos específicos de otra célula, como las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Los ligandos, a veces denominados *contrarreceptores*, son miembros de la familia de las inmunoglobulinas de adhesión celular que tratamos anteriormente. Por ejemplo, las integrinas $\alpha L\beta_2$, también llamadas LFA1, facilitan a los leucocitos la unión firme a las proteínas ICAM de la familia de las Ig de las células endoteliales en los lugares de infección y, mediante esta unión, la migración a través del endotelio hacia los lugares infectados (véase Figura 19–19B). Las personas que padecen la enfermedad genética denominada *deficiencia en la adhesión leucocitaria* no pueden sintetizar subunidades β_2 funcionales. Como consecuencia de ello, sus leucocitos son deficientes en todos los receptores del grupo β_2, por lo que padecen infecciones bacterianas repetidas.

Las integrinas β_3, que han sido localizadas en diversos tipos celulares como las plaquetas sanguíneas, permiten reconocer diversas proteínas de la matriz, entre ellas el *fibrinógeno*. Dado que las plaquetas interactúan con el fibrinógeno durante la coagulación sanguínea, los individuos que son deficientes genéticamente en integrinas β_3 (*enfermedad de Glanzmann*), sangran en exceso.

Tanto en leucocitos como en plaquetas, la capacidad de regular la actividad de la integrina mediante una señal dentro hacia fuera es importante. La adhesión regulada permite a las células circular libremente hasta que son activadas por un estímulo apropiado. Ya que las integrinas no tienen que ser sintetizadas *de novo*, la respuesta de adhesión puede ser muy rápida. Las plaquetas, por ejemplo, responden al contacto con la pared vascular dañada o a varias moléculas solubles de señal, ocasionando la activación de la subunidad β_3 en su membrana celular. Este hecho conlleva la unión de las plaquetas a fibrinógeno y, por tanto, la coagulación plaquetaria, la cual evita el derrame de la sangre. De manera similar, la unión del linfocito T a su antígeno específico en la superficie de las células presentadoras de antígeno (tratadas en el Capítulo 25) provoca un cambio intracelular en la célula T que conlleva la activación de las integrinas β_2 (**Figura 19–50**). Esas integrinas activadas permiten al linfocito T adherirse con fuerza a la célula presentadora de antígeno y permanece unido hasta que es estimulado completamente, que es cuando las integrinas vuelven a su estado inactivo y permiten la desadhesión del linfocito T.

Las integrinas se agrupan formando fuertes adhesiones celulares

Las integrinas, como otras moléculas de adhesión, difieren de los receptores de hormonas de la superficie celular y de otras moléculas de señalización solubles en que habitualmente se unen a sus ligandos con una afinidad menor y, además, en que se expresan en la superficie celular a concentraciones que son del orden de entre 10 y 100 veces superiores. Éste es otro

ejemplo del "principio Velcro" comentado anteriormente. La fuerza de la unión depende del agrupamiento de integrinas generando una placa a la cual están anclados numerosos filamentos del citoesqueleto, como ocurre con los hemidesmosomas de la epidermis o en las adhesiones focales de un fibroblasto unido a la placa de cultivo. En las adhesiones focales, y es probable que en otras adhesiones entre célula y matriz dependientes de actina formadas por las células en un tejido normal, la activación de la pequeña GTPasa Rho participa en la maduración del complejo de unión promoviendo el agrupamiento de los filamentos de actina y de integrinas en la región de contacto. Las integrinas mutantes que carecen de su cola intracelular no pueden conectar con filamentos del citoesqueleto, ni agruparse ni formar adhesiones fuertes.

Las uniones a la matriz extracelular actúan a través de las integrinas controlando la proliferación y la supervivencia celulares

Como ocurre con otras proteínas de adhesión, las integrinas hacen algo más que generar anclajes. También activan vías de señalización intracelular que permiten el control de casi todos los aspectos del comportamiento celular según la naturaleza de la matriz que envuelve la célula y del estado de la unión entre ellas.

Estudios *in vitro* muestran que algunas células no pueden crecer ni proliferar a menos que estén unidas a la matriz extracelular, aunque hayan nutrientes y factores de crecimiento en el medio de cultivo. Algunos tipos celulares, entre los cuales se incluyen las células epiteliales, endoteliales y las fibras musculares, dependen incluso de esta unión a la matriz para poder sobrevivir. Cuando estas células pierden el contacto con la matriz, sufren una muerte celular programada o apoptosis. Esta dependencia de unión a sustrato para que la célula pueda crecer y sobrevivir se conoce como **dependencia de anclaje**, la cual está mediada principalmente por integrinas y por las señales intracelulares que éstas generan. Parece que esta dependencia de anclaje asegura que cada célula sobreviva y prolifere sólo cuando se encuentre en una situación apropiada. Las mutaciones que interrumpen o anulan esta forma de control, provocando que las células escapen de la dependencia de anclaje, son las que se observan en células cancerígenas y son las principales causantes de su carácter invasivo.

La extensión física de una célula sobre la matriz también ejerce una fuerte influencia sobre los eventos intracelulares. Las células que son obligadas a extenderse a lo largo de una gran área, mediante la formación de muchas adherencias en sitios muy separados entre sí, sobreviven mejor y proliferan más rápido que las células que no están tan extendidas (Figura 19–51). El efecto que estimula a una célula a extenderse facilita la regeneración de los tejidos después de una lesión. Por ejemplo, si se produce una pérdida de células en un epitelio, la propagación de las restantes células dentro del espacio dejado vacante ayudará a estas supervivientes a proliferarse hasta llenar el vacío. No está claro de qué forma una célula detecta que está extendida y ajusta su comportamiento según este grado de extensión, pero la capacidad de extenderse depende de las integrinas y las señales generadas por éstas en las regiones de adhesión deben participar en estos mecanismos.

Lo que conocemos sobre la dependencia de anclaje y de los efectos de la extensión celular procede sobre todo de estudios realizados sobre células vivas en placas de cultivo recubiertas de una matriz. Para el caso de células de tejido conjuntivo, que normalmente están

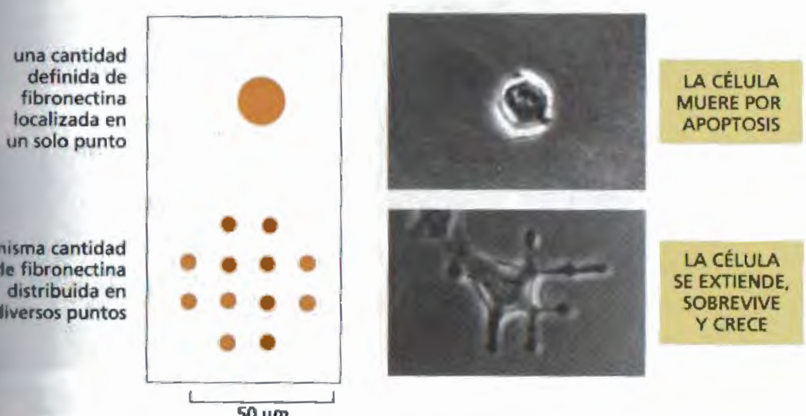


Figura 19–51 Importancia de la extensión de las células. En este experimento se muestra que el grado de extensión sobre el sustrato que alcanza una célula es más importante para su crecimiento y supervivencia que el hecho de estar anclada en el sustrato o que el número de moléculas de matriz con las que entra en contacto. (Basado en C.S. Chen et al. *Science* 276:1425-1428, 1997. Con autorización de la AAAS.)

recubiertas de matriz por todas partes, este sistema se aleja de lo que ocurre *in vivo*, ya que no es lo mismo andar sobre una llanura que trepar por una jungla. El tipo de contactos que establecen las células sobre un sustrato rígido no son los mismos que los que establecen en una red deformable de matriz extracelular y existen notables diferencias de comportamiento celular entre estos dos contextos. No obstante, es probable que en ambos casos se trate de los mismos principios básicos. Tanto *in vitro* como *in vivo*, las señales intracelulares generadas en las regiones de adhesión célula-matriz mediadas por complejos moleculares organizados alrededor de las integrinas son cruciales para la proliferación y la supervivencia celulares.

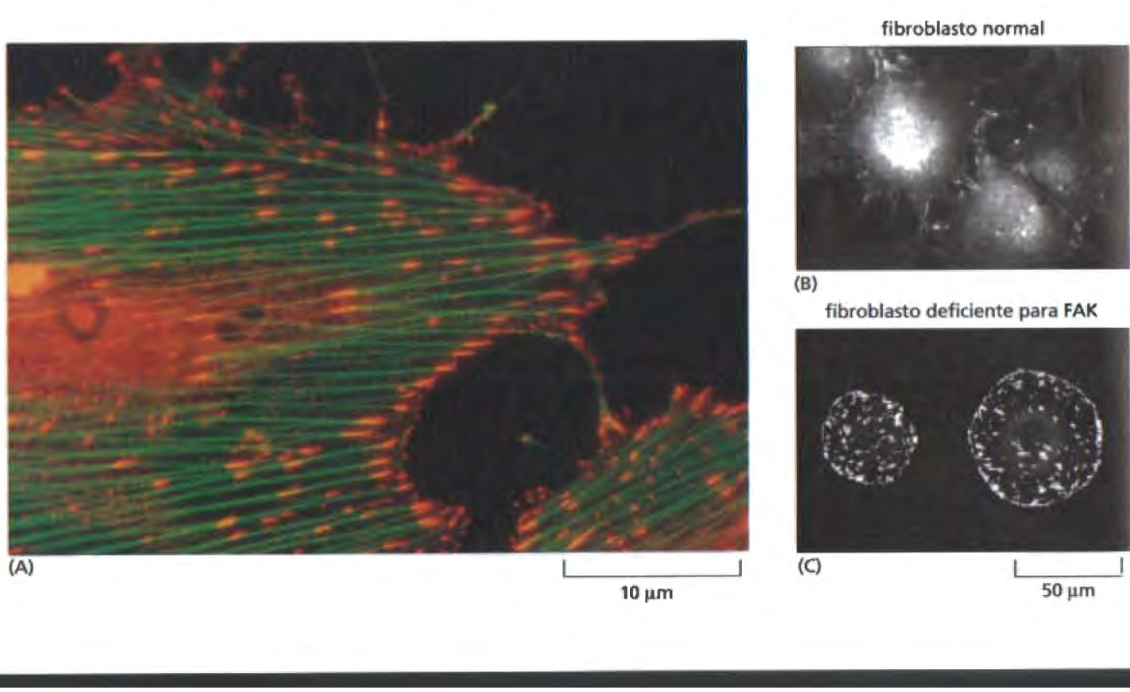
Las integrinas reclutan proteínas de señalización intracelular en regiones de adhesión célula-sustrato

Los mecanismos por los cuales las integrinas envían la señal hacia el interior de la célula son complejos y diversos. Además, las integrinas y los receptores de señalización a menudo influyen uno sobre el otro y pueden actuar conjuntamente regulando el comportamiento de la célula, como ya hemos indicado. Por ejemplo, la vía Ras/MAP-quinasa (véase Figura 15–61) puede ser activada tanto por receptores de señalización convencionales como por integrinas, pero a menudo las células requieren ambos tipos de estimulación simultáneamente para que se induzca su proliferación. Las integrinas y los receptores de señalización convencionales también cooperan en la activación de vías similares que promueven la supervivencia celular (tratado en los Capítulos 15 y 17).

Una de las formas de señalización mejor estudiadas de la integrina es la que depende de una proteína quinasa citoplasmática denominada **quinasa de las adhesiones focales** (**FAK**: ***f**ocal **a**dhesion **k**inase*). A menudo, en las células en cultivo, estas adhesiones focales constituyen los principales lugares de fosforilación de residuos de tirosina (véase la **Figura 19–52**A); la FAK es una de las proteínas más fosforiladas en estos residuos. Simultáneamente a la agrupación de integrinas en los lugares de contacto entre la célula y la matriz, FAK es reclutada en las adhesiones focales mediante proteínas intracelulares de anclaje como la talina (que se une a la subunidad β de la integrina) o la *paxilina* (que se une a un tipo de subunidad α de la integrina). Una vez reclutadas, las moléculas FAK se autofosforilan en un residuo específico de tirosina y generan un lugar en el que se puedan anclar proteínas de la familia Src de tirosina quinasas citoplasmáticas. Estas quinasas fosforilan nuevos residuos de tirosina tanto en FAK como en otras proteínas de las adhesiones focales generando nuevos puntos de reconocimiento para numerosas proteínas señalizadoras citoplasmáticas. De esta manera, la señal se transmite al interior celular (como se describió en el Capítulo 15).

Una manera de estudiar la función de FAK es analizar las adhesiones focales en células de ratones mutantes que no presentan esta proteína. Los fibroblastos de estos ratones siguen siendo capaces de adherirse a la fibronectina y furmar adhesiones focales pero, de

Figura 19–52 Adhesiones focales y papel de la quinasa de adhesión focal (FAK). (A) Un fibroblasto cultivado en un sustrato recubierto de fibronectina y marcado con anticuerpos fluorescentes: en *verde* se marcan los filamentos de actina; en *rojo* las proteínas activadas que contienen fosfotirosina, y en *naranja* las localizaciones donde ambos componentes coinciden. Los filamentos de actina terminan en las adhesiones focales, donde las células se adhieren al sustrato mediante integrinas. Las proteínas que contienen fosfotirosina también se concentran en estos puntos, lo cual refleja una activación local de FAK y de otras proteínas quinasa. Las señales generadas en estos puntos de unión participan en la regulación de la división celular, en el crecimiento y en la supervivencia. (B, C) La influencia de FAK en la formación de las adhesiones focales se demuestra comparando fibroblastos normales con deficientes en FAK y mediante el uso de anticuerpos contra vinculina para detectar las adhesiones focales. (B) Los fibroblastos normales presentan un menor número de adhesiones focales y se extienden tras 2 horas en cultivo. (C) En el mismo punto, los fibroblastos deficientes en FAK muestran más adhesiones focales y no están extendidos. (A, por cortesía de Keith Burridge; B, C, de D. Ilic et al., *Nature* 377: 539-544, 1995. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)



forma sorprendente, el número de estas adhesiones es más bien elevado, con lo que se reduce el estiramiento de las células y su migración (Figura 19–52B y C). Este inesperado resultado indica que FAK está involucrada habitualmente en la desorganización de las adhesiones focales, función que resulta decisiva para la migración celular. Numerosos tipos de células cancerosas presentan elevados niveles de FAK, lo que explicaría por qué son más móviles que sus homólogas no cancerosas.

Las integrinas pueden producir efectos intracelulares localizados

A través de FAK o por otras vías, las integrinas activadas, al igual que otros receptores de señal, pueden inducir respuestas generales entre las que a menudo se incluye la expresión génica. Pero las integrinas están especialmente habilitadas para estimular cambios locales en el citoplasma cerca del contacto célula-matriz. Ya se mencionó un ejemplo importante al describir la polaridad celular epitelial: la lámina basal dirige la organización apicobasal de las células epiteliales a través de las integrinas.

Los efectos locales intracelulares pueden ser un rasgo común de la señalización mediada por proteínas transmembrana de adhesión celular en general. Por ejemplo, durante el desarrollo del sistema nervioso, los conos de crecimiento de un axón están guiados principalmente por respuestas locales a señales de atracción (y repulsión) del entorno, las cuales son reconocidas por proteínas transmembrana de adhesión celular, tal como se describe en el Capítulo 22. Parece que los efectos primarios de las proteínas de adhesión se deben a la activación de vías de señalización intracelular que actúan de forma local en el cono de crecimiento más que a través de la misma adhesión intercelular o por señales dirigidas al cuerpo celular. Por ejemplo, a través de la activación local de la Rho (véase los Capítulos 15 y 16), las proteínas transmembrana de adhesión pueden controlar la motilidad y guiar el desplazamiento. En esta y en otras vías, casi todas las clases de moléculas de adhesión intercelular y célula-matriz mencionadas, entre las que se encuentra la integrina, son utilizadas para la guía del crecimiento axónico en el desarrollo del sistema nervioso.

La **Tabla 19–5** resume las categorías de moléculas de adhesión que se han tratado en este capítulo. En la siguiente sección, volveremos a las moléculas de adhesión de membrana celular para describir en detalle la matriz extracelular que envuelve a los tejidos conjuntivos.

Tabla 19–5 Familias de moléculas de adhesión

	ALGUNOS REPRESENTANTES DE LA FAMILIA	DEPENDENCIA DE Ca^{2+} O Mg^{2+}	HOMOFÍLICO O HETEROFÍLICO	ASOCIACIONES CON EL CITOESQUELETO	UNIONES CELULARES ASOCIADAS
Adhesión célula-célula					
Cadherinas clásicas	E, N, P, VE	sí	homofílico	filamentos de actina (vía cateninas)	uniones adherentes, sinapsis
Cadherinas desmosomales	desmogleína, desmocolina	sí	homofílico	filamentos intermedios (vía desmoplaquina, placoglobina y placofilina)	desmosomas
Miembros de la familia Ig	N-CAM, ICAM	no	ambos	desconocida	sinapsis neuronales e inmunológicas
Selectinas (exclusivamente células sanguíneas y células endoteliales)	L-, E- y P-selectina	sí	heterofílico	filamentos de actina	(ninguna estructura de unión prominente)
Integrinas de las células sanguíneas	$\alpha L\beta_2$ (LFA1)	sí	heterofílico	filamentos de actina	sinapsis inmunológicas
Adhesión célula-matriz					
Integrinas	muchos tipos	sí	heterofílico	filamentos de actina (vía talina, paxilina, filamina, α-actinina y vinculina)	adhesiones focales
	$\alpha_6\beta_4$	sí	heterofílico	filamentos intermedios (vía plectina y distonina)	hemidesmosomas
Proteoglucanos transmembrana	sindecanos	no	heterofílico	filamentos de actina	(ninguna estructura de unión prominente)

Resumen

Las integrinas son los receptores principales que utilizan las células animales para adherirse a la matriz extracelular. Actúan como conectores transmembrana entre la matriz extracelular y el citoesqueleto, normalmente uniéndose a actina aunque también pueden unirse a filamentos intermedios en el caso de integrinas especializadas localizadas en los hemidesmosomas. Las integrinas son moléculas heterodiméricas cuya unión al ligando está asociada a cambios sustanciales en su conformación. Este fenómeno genera una asociación alostérica entre la unión a matriz en el exterior de la célula y la unión al citoesqueleto en el interior, permitiendo a la integrina transmitir la señal en ambos sentidos a través de la membrana plasmática, tanto de dentro a fuera como de fuera a dentro de la célula. La unión de talina, una proteína intracelular de anclaje, a la cola de una molécula de integrina produce que esta última pase a una conformación extendida, incrementando así su afinidad para ligandos extracelulares. Por el contrario, la unión a un ligando extracelular mediante el mismo cambio conformacional, induce a la unión a talina y, por tanto, a la unión al citoesqueleto de actina. Se organizan complejos agrupamientos de proteínas alrededor de las colas intracelulares de las integrinas que producen señales que pueden influir en casi todos los aspectos del comportamiento celular, desde la proliferación y supervivencia celulares, como es el caso del fenómeno de dependencia de anclaje, hasta la polaridad celular y la guía en los diversos procesos de la migración celular.

MATRIZ EXTRACELULAR DE LOS TEJIDOS CONJUNTIVOS ANIMALES

Como se ha indicado, la lámina basal es el ejemplo que sirve de arquetipo de la matriz extracelular, común en la mayoría de animales pluricelulares y una característica esencial de los tejidos epiteliales. En esta sección trataremos las variadas formas de matriz extracelular que se encuentran en los tejidos conjuntivos (**Figura 19–53**). En estos tejidos, la matriz suele ser más abundante que las células, a las que rodea completamente y determina las propiedades físicas del tejido.

No existen muchas diferencias en cuanto a las clases de macromoléculas que constituyen la matriz de los tejidos animales, ni en la lámina basal ni en otras formas de la matriz. Sin embargo, si consideramos las cantidades relativas de cada una de estas clases de macromoléculas o sus patrones de organización en el contexto de la matriz extracelular, existe una sorprendente diversidad de materiales. La matriz puede calcificarse, formando estructuras duras como en el hueso o el diente, ser una sustancia transparente, como sucede en la córnea, o constituir organizaciones semejantes a tensores, las cuales dan a los tendones su enorme resistencia a la tracción. Así, la matriz extracelular es la que forma la gelatina de las medusas o el caparazón duro de un escarabajo o de una langosta. Más aún, la matriz extracelular es más que un mero armazón que confiere un soporte físico, ejerce un papel activo y complejo en la regulación del comportamiento de las células que están en contacto con ella, que habitan en ella o incluso que circulan en ella, influyendo en su supervivencia, desarrollo, migración, proliferación, forma y función.

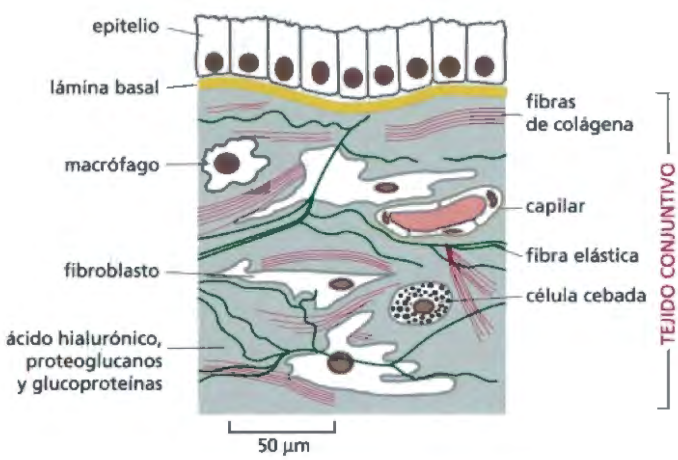


Figura 19–53 Tejido conjuntivo subyacente a un epitelio. Este tejido contiene diversas células y componentes de la matriz. El tipo celular predominante es el fibroblasto, el cual secreta una matriz extracelular abundante.

Esta sección se centrará en el estudio de la matriz extracelular de los tejidos conjuntivos de los vertebrados, pero todas las diferentes formas de la matriz tienen un papel importante en la mayoría de los organismos pluricelulares. Como ejemplos podríamos citar las cutículas de los gusanos y de los insectos, las conchas de los moluscos, las paredes celulares de los hongos y, como describiremos más adelante, las paredes celulares de los vegetales.

La matriz extracelular está producida y orientada por las células incluidas en ella

En general, las macromoléculas que constituyen la matriz extracelular son producidas localmente por las células incluidas en la matriz. Tal como se analizará más adelante, estas células también contribuyen a organizar la matriz, ya que la orientación de su citoesqueleto controlará la orientación de la matriz que éstas produzcan. En la mayor parte de los diferentes tipos de tejido conjuntivo, estas macromoléculas son secretadas sobre todo por los **fibroblastos** (**Figura 19–54**). Sin embargo, en algunos tejidos conjuntivos especializados, tales como el cartílago y el hueso, son secretadas por células emparentadas con los fibroblastos pero que reciben denominaciones específicas, como son los *condroblastos* en el caso del cartílago y los *osteoblastos* en el hueso.

Como en el caso de la lámina basal, las dos principales clases de macromoléculas que constituyen la matriz en los tejidos conjuntivos son: (1) cadenas de polisacáridos del tipo de los glucosaminoglucanos (GAG), los cuales normalmente se hallan unidos a proteínas mediante enlaces covalentes formando *proteoglucanos*, y (2) proteínas fibrosas, entre las que se encuentra la colágena. Más adelante comprobaremos que todos los componentes de ambas clases presentan una gran variedad de formas y tamaños.

En el tejido conjuntivo, por lo general las moléculas de proteoglucanos forman una "sustancia fundamental" altamente hidratada y parecida a un gel, en la que están embebidas las proteínas fibrosas. El gel de polisacárido opone resistencia a las fuerzas de compresión que afectan a la matriz, al tiempo que facilita la rápida difusión de nutrientes, metabolitos y hormonas entre la sangre y las células que forman los tejidos. Por su parte, las fibras de colágena refuerzan la matriz y colaboran en su organización, mientras que otras proteínas fibrosas como la *elastina* le confieren elasticidad. Finalmente, hay que señalar que muchas proteínas de la matriz facilitan la migración, el anclaje y la diferenciación celulares en las localizaciones adecuadas.

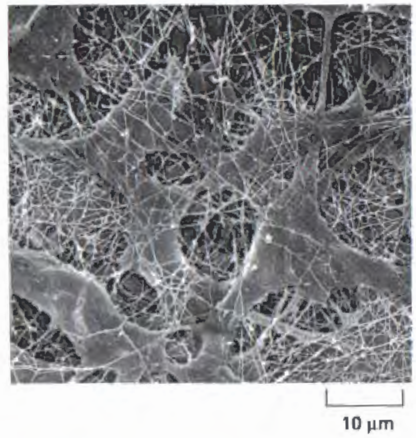


Figura 19–54 Fibroblastos en el tejido conjuntivo. Esta imagen de microscopía electrónica de barrido muestra el tejido constituyente de la córnea de rata. La matriz extracelular que rodea los fibroblastos se compone mayoritariamente de fibrillas de colágena. Las glucoproteínas, el ácido hialurónico y los proteoglucanos, que por lo general forman un gel hidratado que ocupa los intersticios de la red fibrosa, son digeridos mediante tratamientos enzimáticos y soluciones ácidas. (De T. Nishida et al. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29:1887-1890, 1988. Con autorización de la Association for Research in Vision and Ophthalmology.)

Las cadenas de glucosaminoglucanos (GAG) forman geles hidratados y ocupan grandes volúmenes

Los **glucosaminoglucanos (GAG)** son cadenas de polisacáridos no ramificadas, compuestas por unidades repetidas de disacáridos. Se denominan GAG debido a que en estos disacáridos uno de los residuos es siempre un aminoazúcar (*N*-acetilglucosamina o *N*-acetilgalactosamina), que en la mayoría de los casos se encuentra sulfatado. Habitualmente, el segundo residuo es un ácido urónico (glucurónico o idurónico). Debido a la presencia de grupos sulfato o carboxilo, la mayoría de los residuos glucídicos de los glucosaminoglucanos presentan una gran carga negativa (**Figura 19–55**) constituyendo la mayoría de las moléculas de carácter aniónico sintetizadas por la célula animal. En función de dichos restos glucídicos, el tipo de enlace que se produce entre ellos y el número y localización de los grupos sulfato, se pueden distinguir cuatro grupos principales de GAG: (1) el *ácido hialurónico*, (2) el *condroitín sulfato* y el *dermatán sulfato*, (3) el *heparán sulfato* y (4) el *queratán sulfato*.

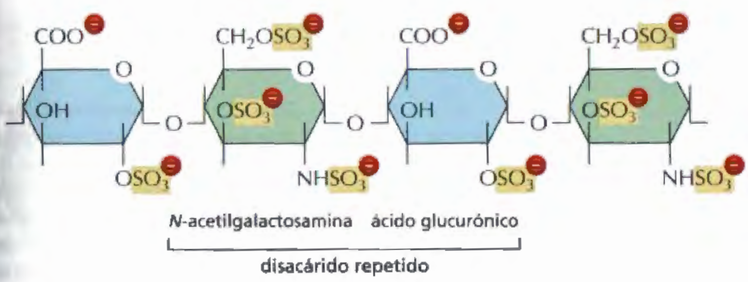


Figura 19–55 Secuencia repetida de disacáridos de la cadena de un glucosaminoglucano (GAG) de tipo heparán sulfato. Estas cadenas pueden llegar a estar constituidas por 200 residuos de azúcar, pero lo normal es que contengan unos 100. Existe una gran densidad de cargas negativas a lo largo de la cadena debido a la presencia de grupos sulfato y carboxilo. Todos los proteoglucanos de la lámina basal (perlecano, distroglucano y colágena de tipo XVIII) contienen GAG de tipo heparán sulfato. Aquí se muestra la molécula con el número máximo de grupos sulfato. *In vivo*, la proporción de grupos sulfato y no-sulfato es variable. Por ejemplo, la heparina presenta más del 70% de sulfatación y el heparán sulfato menos del 50%.

Las cadenas de polisacáridos son demasiado rígidas para plegarse formando estructuras globulares compactas como las que constituyen las cadenas polipeptídicas, siendo, además, muy hidrófilas. Así pues, los GAG tienden a adoptar conformaciones muy extendidas que ocupan un gran volumen en relación a su masa (**Figura 19–56**) y forman geles incluso a concentraciones muy bajas. Normalmente, el peso de los GAG en el tejido conjuntivo no representa más del 10% del peso del total de las proteínas fibrosas pero, debido a que forman geles hidratados porosos, las cadenas de GAG ocupan la práctica totalidad del espacio extracelular. La elevada densidad de carga negativa que presentan es la causa de la captación de numerosos cationes, sobre todo Na^+ que, debido a su actividad osmótica, dan lugar a la acumulación de grandes volúmenes de agua en la matriz. Este hecho produce una presión de hinchamiento o turgencia que capacita a la matriz para oponerse a las fuerzas de compresión (en contraste con las fibras de colágena, que se oponen a las fuerzas de tracción). Por ejemplo, gracias a este mecanismo la matriz cartilaginosa que recubre la articulación de la rodilla puede soportar presiones de cientos de atmósferas.

Defectos en la producción de GAG pueden afectar a muchos sistemas corporales. En una rara enfermedad genética humana, por ejemplo, hay una grave deficiencia en la síntesis de disacáridos del tipo de los dermatán sulfato. Los individuos afectados son enanos, envejecen de forma prematura y tienen defectos generalizados en la piel, en las articulaciones, en la musculatura y en los huesos. En invertebrados, vegetales y hongos, los principales constituyentes de la estructura de la matriz extracelular son otros tipos de polisacáridos. Así, como veremos más adelante, en las plantas superiores las cadenas de celulosa (poliglucosa) se empaquetan densamente formando estructuras cristalinas que, a modo de cintas, constituyen el principal componente de la pared celular. En insectos, crustáceos y otros artrópodos, la quitina (poli-*N*-acetilglucosamina) constituye el principal componente del citoesqueleto. Los hongos también utilizan principalmente la quitina para formar sus paredes. En conjunto, la celulosa y la quitina son los biopolímeros más abundantes de la Tierra.

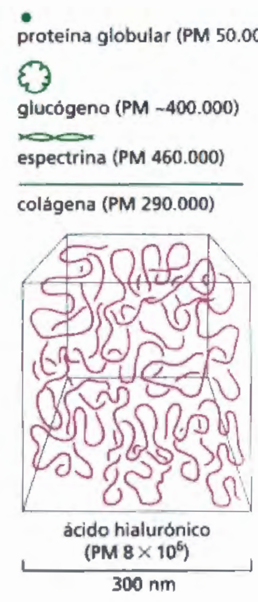


Figura 19–56 Dimensiones y volúmenes relativos ocupados por diversas macromoléculas. El esquema muestra varias proteínas, una partícula de glucógeno y una molécula hidratada de ácido hialurónico.

El ácido hialurónico actúa como relleno y facilita la migración celular durante la morfogénesis y la reparación de los tejidos

El **ácido hialurónico** (también denominado *hialuronato* o *hialuronano*) es el GAG de estructura molecular más sencilla (**Figura 19–57**). Consta de una secuencia repetida de hasta 25.000 unidades de disacáridos. Se encuentra en proporciones variables en todos los tejidos y fluidos de los animales adultos, aunque es especialmente abundante en los primeros estadios embrionarios. Su estructura no es la típica de la mayoría de los GAG ya que, a diferencia de ellos, no contiene azúcares sulfatados, todos sus disacáridos son idénticos, la longitud de su cadena es enorme y, habitualmente, no están unidos de forma covalente a proteínas. Además, mientras que los otros GAG son sintetizados dentro de la célula y secretados por exocitosis, la cadena de ácido hialurónico crece en la superficie celular mediante un complejo enzimático integrado en la membrana plasmática.

Se cree que el ácido hialurónico actúa ofreciendo resistencia a las fuerzas compresivas en los tejidos y articulaciones. También tiene una función importante durante el desarrollo embrionario como ocupante de espacio y puedo ser utilizado para forzar un cambio en la forma de una estructura, ya que una pequeña cantidad del polímero, una vez hidratado, se expande ocupando un gran volumen (véase Figura 19–56). El ácido hialurónico sintetizado

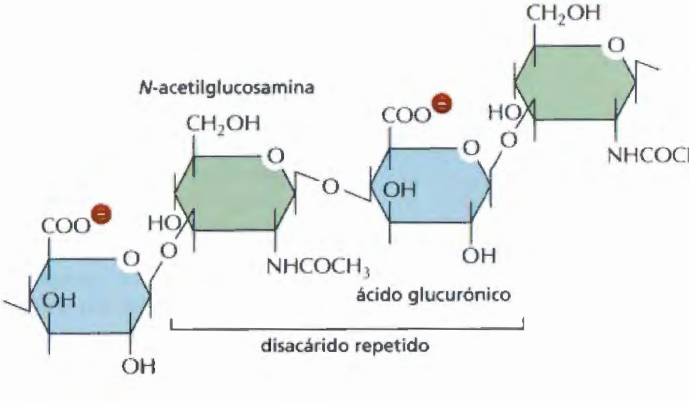


Figura 19–57 Secuencia repetida de disacáridos en el ácido hialurónico, un GAG relativamente sencillo. Esta molécula ubicua de organismos vertebrados está constituida por una larga cadena de unos 25.000 residuos de azúcar. Obsérvese la ausencia de grupos sulfato.

localmente a partir de la cara basal de un epitelio puede deformar este epitelio y generar espacios libres debajo de él por el que las células pueden migrar con facilidad. Por ejemplo, en la formación del corazón, la síntesis de ácido hialurónico actúa de este modo facilitando la formación de las válvulas y de los septos que separan las cámaras cardíacas. En otros muchos órganos se producen procesos similares a éste. Cuando finaliza la migración celular, el exceso de ácido hialurónico es degradado por la enzima *hialuronidasa*. El ácido hialurónico también se sintetiza en grandes cantidades durante la cicatrización de las heridas y también es un constituyente importante de los fluidos articulares, donde actúa como un lubrificante.

Muchas de las funciones del ácido hialurónico dependen de las interacciones específicas que establece con otras moléculas, entre las que se encuentran proteínas y proteoglucanos. Algunas de estas moléculas son constituyentes habituales de la matriz extracelular, mientras que otras son componentes integrales de la superficie celular.

Los proteoglucanos están compuestos por cadenas de GAG unidas covalentemente a una proteína central

Con la excepción del ácido hialurónico, los demás GAG se encuentran unidos covalentemente a una proteína y constituyen los denominados **proteoglucanos**, sintetizados por la mayoría de células animales. Los ribosomas unidos a membrana sintetizan la cadena polipeptídica de los proteoglucanos o *proteína central*, acumulándose en la luz del retículo endoplasmático, mientras que la unión de las cadenas de polisacárido a la proteína central tiene lugar sobre todo en el complejo de Golgi antes de ser liberados hacia el exterior de la célula mediante exocitosis. En primer lugar, se une un *tetrasacárido de unión* específico a un resto de serina de la proteína central, que actúa como un cebador del crecimiento de la cadena de polisacárido y, a continuación, se añaden de forma individual los residuos glucídicos mediante glucosiltransferasas específicas (**Figura 19–58**). Mientras permanece en el complejo de Golgi, muchos de sus residuos glucídicos son modificados covalentemente mediante una serie de reacciones que tienen lugar de manera secuencial y coordinada. Así, mediante epimerización se altera la configuración de los sustituyentes, en torno a determinados átomos de carbono de la molécula glucídica, y mediante sulfatación se incrementa la carga negativa.

En general, los proteoglucanos se diferencian de otras glucoproteínas por la naturaleza, la cantidad y la organización de sus cadenas glucídicas laterales de las que, por definición, al menos una de ellas ha de ser un GAG. Mientras que las glucoproteínas contienen entre un 1% y un 60% en peso de carbohidratos, y normalmente sólo un pequeño porcentaje en forma de numerosas cadenas ramificadas de oligosacáridos relativamente cortas, los proteoglucanos contienen hasta un 95% en peso de carbohidratos, por lo general en forma de una larga cadena de GAG no ramificada, formada por unos 80 residuos glucídicos.

En principio, los proteoglucanos poseen una heterogeneidad potencial casi ilimitada. Cada tipo de proteína central varía en gran medida tanto en el número como en el tipo de cadenas de GAG que se unen a ella. Además, en cada GAG el patrón repetitivo de los disacáridos puede ser modificado por una compleja distribución de grupos sulfato. Por último, existe una gran diversidad de proteínas centrales aunque muchas de ellas comparten dominios característicos como el dominio LINK, que interviene en las uniones a GAG.

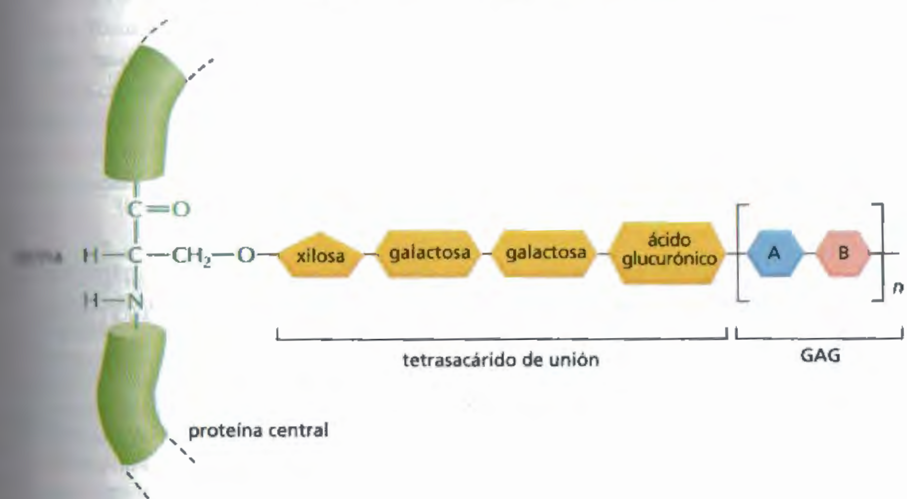
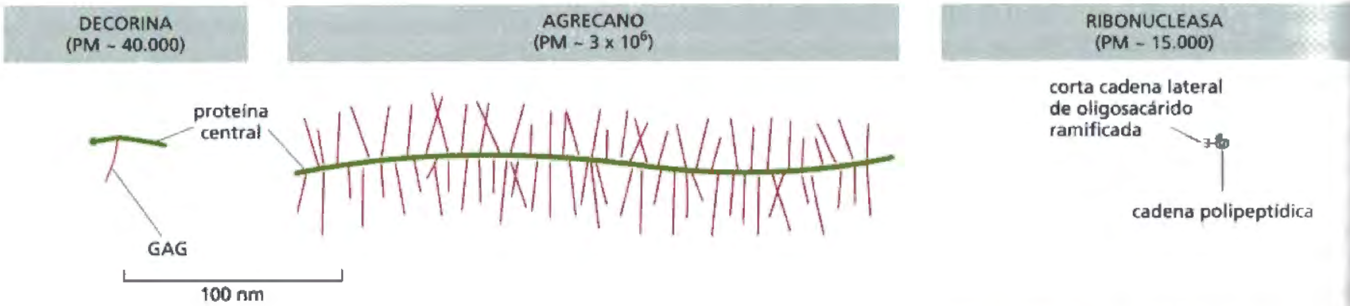


Figura 19–58 Unión de una cadena de GAG a la proteína central de una molécula de proteoglucano. En primer lugar se establece un enlace específico entre un tetrasacárido y un residuo de serina. En la mayoría de los casos no está claro cómo se selecciona el residuo de serina, pero parece que es más importante la conformación local de la proteína que una determinada secuencia de aminoácidos. A continuación se sintetiza el resto de la cadena de GAG, constituida principalmente por la repetición de un disacárido, que se van añadiendo resto a resto. En los condroitín sulfatos, el disacárido está compuesto por ácido D-glucurónico y *N*-acetil–D-galactosamina; en los heparán sulfatos por D-glucosamina (o ácido L-idurónico) y *N*-acetil–D-glucosamina; en el queratán sulfato por D-galactosa y *N*-acetil–D-glucosamina.



Los proteglucanos pueden constituir enormes moléculas. Baste citar como ejemplo que el proteoglucano *agrecano*, componente principal del cartílago, tiene una masa de alrededor de 3×10^6 daltons y está compuesto por más de 100 cadenas de GAG. Sin embargo, otros proteoglucanos son mucho más pequeños, ya que sólo tienen entre 1 y 10 cadenas de GAG. Es el caso de la *decorina*, secretada por los fibroblastos y que tiene una sola cadena de GAG (**Figura 19–59**). Esta proteína se une a fibras de colágena y regula el ensamblaje y el diámetro de estas fibras. Los ratones deficientes en decorina presentan una piel frágil con una resistencia mecánica reducida. Los GAG y diferentes tipos de proteoglucanos pueden asociarse en la matriz extracelular formando complejos más largos. Por ejemplo, las moléculas de agrecano se unen a ácido hialurónico de la matriz extracelular para formar agregados tan grandes como una bacteria (**Figura 19–60**). Además, aparte de asociarse entre ellos, los GAG y los proteoglucanos se asocian a proteínas fibrosas de matriz, tales como la colágena, y a entramados de proteína, como la lámina basal, generando compuestos extremadamente complejos (**Figura 19–61**).

Figura 19–59 Ejemplos de un proteoglucano pequeño (decorina) y uno de gran tamaño (agrecano) que pueden localizarse en la matriz extracelular. Se han comparado con una glucoproteína típica de secreción, la ribonucleasa B pancreática. Los tres están dibujados a escala. La proteína central del agrecano y de la decorina tiene cadenas de oligosacáridos y cadenas de GAG, pero no se representan en la figura. El agrecano está constituido por unas 100 cadenas de condrointín sulfato y unas 30 cadenas de queratán sulfato unidas a una proteína central rica en serina de unos 3000 aminoácidos. La decorina "decora" la superficie de las fibrillas de colágena, de aquí su nombre.



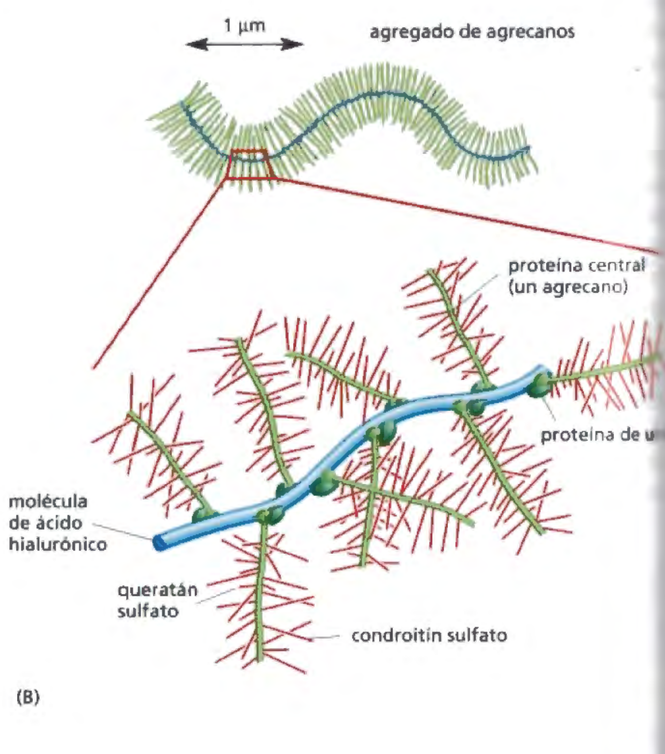


Figura 19–60 Agregado de agrecanos procedentes de cartílago fetal bovino. (A) Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión de un agregado de agrecanos sombreado con platino. También pueden observarse muchas moléculas libres del agrecano. (B) Esquema del enorme agregado de agrecanos mostrado en (A). Está constituido por unos 100 monómeros de agrecano (cada uno de los cuales es como el mostrado en la Figura 19–59) unidos de forma no-covalente a una cadena de ácido hialurónico a través del dominio N-terminal de la proteína central. Una proteína de unión se une a la proteína central del proteoglucano y a la cadena de ácido hialurónico estabilizando así el agregado. Las proteínas de unión son miembros de la familia de las proteínas de unión a ácido hialurónico, algunas de las cuales son proteínas de superficie celular. El peso molecular de un complejo como éste es de 10^8 daltons o más y ocupa un volumen equivalente al de una bacteria, que es aproximadamente de unos 2×10^{-12} cm^3. (A, cortesía de Lawrence Rosenberg.)

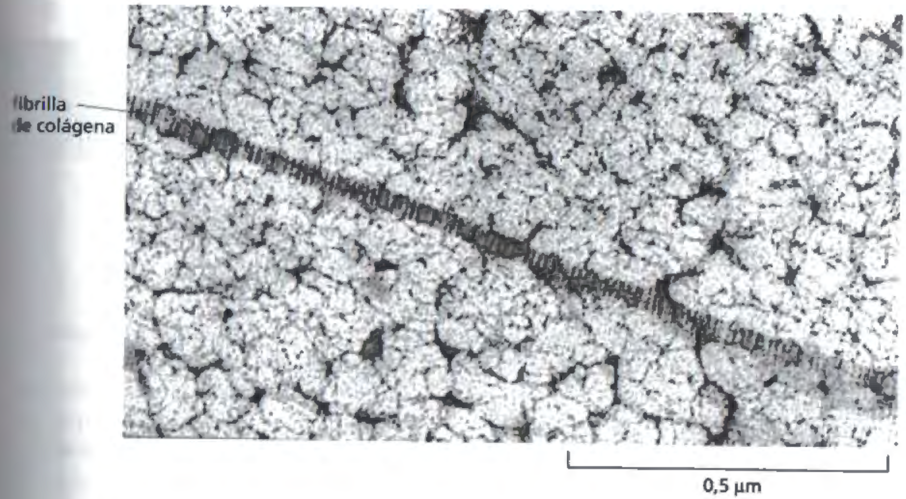


Figura 19–61 Proteoglucanos de la matriz extracelular del cartílago de rata. El tejido fue congelado rápidamente a –196 ºC y a continuación fue fijado y contrastado en estas condiciones (método denominado de congelación-sustitución) para evitar el colapso de las cadenas de GAG. En esta fotografía, obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión, las moléculas de proteoglucano se pueden observar como una fina red filamentosa que contiene una fibrilla de colágena, en la que pueden distinguirse bandas. Las regiones más contrastadas de los proteoglucanos corresponden a las proteínas centrales, mientras que las que muestran una menor intensidad corresponden a las cadenas de glucosaminoglucanos. (Reproducido de E.B. Hunziker y R.K. Schenk, *J. Cell Biol.* 98: 277-282, 1984. Con autorización de The Rockefeller University Press.)

Los proteoglucanos pueden regular las actividades de las proteínas secretadas

Los proteoglucanos son tan diversos en su función como lo son en sus características químicas y estructurales. Por ejemplo, sus cadenas de GAG pueden formar geles de poro y densidad de carga variables, por lo que podrían intervenir como filtro selectivo en la regulación del tráfico de moléculas y de células, seleccionándolas en función de su tamaño y carga, tal como sucede en la gruesa lámina basal del glomérulo renal (véase p. 1167).

Los proteoglucanos desempeñan un papel importante en la señalización química entre las células, ya que se unen a diversas moléculas de señalización tales como factores de crecimiento proteicos, controlando su difusión a través de la matriz, su rango de acción y su tiempo de vida, o inhibiendo su actividad señalizadora. Así, por ejemplo, el *factor de crecimiento fibroblástico* (*FGF: fibroblast growth factor*) que, entre otros efectos estimula la proliferación de varios tipos celulares, se une a las cadenas de heparán sulfato de proteoglucanos, las cuales inducen la oligomerización del factor facilitando así la activación de sus receptores tirosina quinasa transmembrana (véase la Figura 15–54A). En respuestas inflamatorias, los proteoglucanos heparán sulfato inmovilizan las *quimioquinas*, moléculas quimiotácticas secretadas (tratadas en el Capítulo 25) en la superficie endotelial de los vasos sanguíneos en el lugar de inflamación. Esto permite a las quimioquinas permanecer durante un tiempo prolongado estimulando a los leucocitos a abandonar el flujo sanguíneo y migrar hacia el tejido inflamado. En la mayoría de los casos, las moléculas de señalización se unen a las cadenas de los GAG de los proteoglucanos, aunque esto no siempre sucede así. En efecto, algunos miembros de la familia del *factor de crecimiento transformante β* (*TGF-β: transformig growth factor β*) se unen a las proteínas centrales de varios proteoglucanos de la matriz, incluyendo la decorina. En este caso, la unión a la decorina inhibe la actividad del factor de crecimiento. Moléculas simples, incluyendo TGF-β, pueden también unirse a proteínas fibrosas de la matriz, como es el caso del *factor de crecimiento vascular endotelial* (*VEGF: vascular endothelial growth factor*), el cual se une a fibronectina.

Los proteoglucanos también se unen y regulan las actividades de otros tipos de proteínas de secreción, tales como enzimas proteolíticas (proteasas) y sus inhibidores, participando de este modo en el control tanto del ensamblaje como de la degradación de otros componentes de la matriz extracelular, entre los que se encuentra la colágena.

Los proteoglucanos localizados en la superficie celular actúan como correceptores

No todos los proteoglucanos son componentes de matriz extracelular que han sido secretados. Algunos de ellos son componentes integrales de las membranas plasmáticas y tienen su proteína central insertada en la bicapa lipídica o unida a ésta mediante un anclaje de glucosil fosfatidil inositol (GPI: *glycosylphosphatidylinositol*)). Algunos de estos proteoglucanos de membrana actúan como *correceptores* que colaboran con proteínas receptoras de la su-

Tabla 19–6 **Algunos proteoglucanos comunes**

PROTEOGLUCANO	PESO MOLECULAR APROXIMADO DE LA PROTEÍNA CENTRAL	TIPO DE CADENAS GAG	NÚMERO DE CADENAS GAG	LOCALIZACIÓN	FUNCIONES
Agrecano	210.000	condroitín sulfato + queratán sulfato (en cadenas separadas)	~130	cartílago	soporte mecánico; forma grandes agregados con el ácido hialurónico
Betaglucano	36.000	condroitín sulfato/ dermatán sulfato	1	superficie celular y matriz	se une a TGFβ
Decorina	40.000	condroitín sulfato/ dermatán sulfato	1	amplia distribución en tejidos conjuntivos	se une a fibrillas de colágena de tipo I y a TGFβ
Perlecano	600.000	heparán sulfato	2-15	láminas basales	funciones estructural y filtradora en la lámina basal
Sindecano-1	32.000	condroitín sulfato + heparán sulfato (en cadenas separadas)	1-3	superficie celular	adhesión celular; se une a FGF y a otros factores de crecimiento
Dally (en *Drosophila*)	60.000	heparán sulfato	1-3	superficie celular	correceptor para las proteínas de señalización Wingless y Decapentaplegic

perficie celular. Además, algunos de los receptores convencionales disponen de una o más cadenas de GAG, por lo que también son proteoglucanos.

Entre los proteoglucanos de membrana mejor caracterizados se encuentran los *sindecanos*, los cuales presentan una proteína central transmembrana cuya región intracelular interacciona con el citoesqueleto de actina y con moléculas señalizadoras en la corteza celular. Los sindecanos se encuentran en la superficie de muchos tipos celulares, incluyendo fibroblastos y células epiteliales. En los fibroblastos, los sindecanos también se encuentran en las adhesiones célula-matriz, donde modulan la actividad de las integrinas al interaccionar con la fibronectina en la superficie celular, y con el citoesqueleto y con otras proteínas de señalización en el interior de la célula. Por otra parte, los sindecanos también se unen a los FGF, presentándolos a los receptores de FGF de la misma célula. De un modo parecido, otro proteoglucano de membrana, denominado *betaglucano*, se une al TGF-β presentándolo a sus receptores específicos.

La importancia de los proteoglucanos como correceptores y como reguladores de la distribución y actividad de moléculas señalizadoras se demuestra en los graves defectos en el desarrollo que se producen cuando determinados proteoglucanos se inactivan mediante una mutación. En *Drosophila*, por ejemplo, los productos de los genes *Dally* y *Dally-like*, que codifican miembros de la familia de los *glupicanos*, con cadenas heparán sulfato, son necesarios para la señalización de al menos cuatro de las principales proteínas de señalización que dirigen la organización del embrión: Wingless, Hedgehog, FGF y Decapentaplegic (Dpp); tal como se tratará en el Capítulo 22. Para algunas de estas vías de señalización, las mutaciones en *Dally* o *Dally-like* presentan los mismos efectos de las mutaciones en genes que codifican estas proteínas de señalización.

En la **Tabla 19–6** se resume la estructura, la función y la localización de algunos de los proteoglucanos tratados en este capítulo.

Las colágenas son las principales proteínas de la matriz extracelular

Las proteínas fibrosas, como componentes de la matriz extracelular, no son menos importantes que los proteoglucanos. Entre las más destacadas encontramos las **colágenas**, una familia de proteínas fibrosas que se encuentran en todos los animales pluricelulares. Son secretadas en grandes cantidades por las células del tejido conjuntivo y por otros muchos tipos celulares pero en menor cantidad. Son los componentes más abundantes de la piel y de los huesos, por lo que son las proteínas más abundantes de los mamíferos, en los que constituyen el 25% de la masa total de proteína.

Las características fundamentales de las moléculas de colágena son su longitud, su rigidez y su estructura helicoidal trimérica, en la cual tres polipéptidos de colágena, denominados *cadenas α*, se enrollan sobre sí mismos formando una superhélice filiforme (**Figura 19–62**).

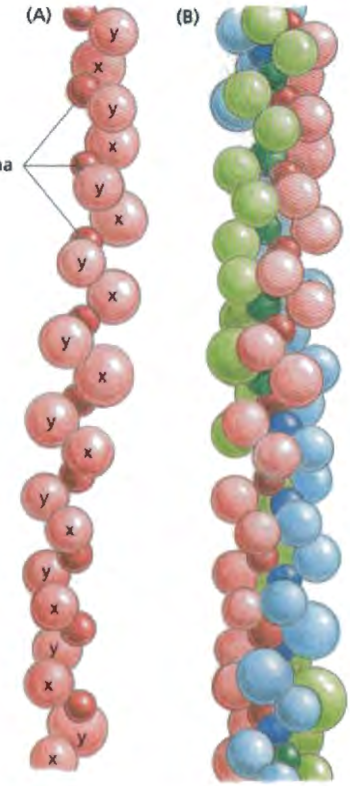


Figura 19–62 Estructura de una molécula típica de colágena. (A) Modelo de una región de una cadena α de colágena en la que cada aminoácido está representado por una esfera. La cadena contiene alrededor de 1000 residuos de aminoácido y está estructurada como una hélice levógira de tres residuos de aminoácido por vuelta, de los que el tercero es una glicina. Por lo tanto, cada cadena α está constituida por secuencias Gly-X-Y, donde X e Y pueden ser cualquier aminoácido (aunque habitualmente X es una prolina e Y una hidroxiprolina). (B) Modelo de una zona de la molécula de colágena en la que las tres cadenas α, cada una de ellas representada en un color distinto, están enrolladas entre sí dando lugar a una triple hélice. La glicina es el único aminoácido lo bastante pequeño para ocupar la pequeña región central de la triple hélice. Sólo se muestra una pequeña parte de la molécula, ya que su longitud total es de unos 300 nm de longitud. (Esquema realizado a partir del modelo propuesto por B.L. Trus.)

Las colágenas son muy ricas en prolina y glicina, las cuales son importantes en la formación de la hélice trimérica. Gracias a su estructura anular, la prolina estabiliza la conformación helicoidal en cada una de las cadenas α, mientras que la glicina se encuentra espaciada regularmente, cada tres residuos de aminoácido, a lo largo de la región central de las cadenas α. Al ser el aminoácido más pequeño (sólo tiene un átomo de hidrógeno como cadena lateral), la glicina favorece un denso empaquetamiento de las tres cadenas α formando la superhélice de colágena.

El genoma humano contiene 42 genes distintos que codifican diferentes cadenas α de colágena, expresándose diversas combinaciones de estos genes en los diferentes tejidos. Aunque, en principio, a partir de varias combinaciones de las 42 cadenas α se podrían formar miles de moléculas distintas de colágena de triple hélice, sólo es posible un número limitado de combinaciones triméricas. De hecho, sólo se han identificado menos de 40 tipos de moléculas de colágena. Las de tipo I son, con diferencia, las más comunes y constituyen la principal colágena de la piel y del hueso. Pertenecen a la clase de **colágenas fibrilares**, o colágenas formadoras de fibrillas, cuya larga estructura fibrosa presenta pocas interrupciones o incluso ninguna. Una vez secretados al espacio extracelular, estos tipos moleculares se organizan formando unos polímeros altamente ordenados denominados *fibrillas de colágena*. Son estructuras delgadas (entre 10 y 300 nm de diámetro) que, en tejidos maduros, alcanzan una longitud de varios cientos de micrómetros y es fácil distinguirlas con el microscopio electrónico (**Figura 19–63**; véase también la Figura 19–61). Por lo general, las fibrillas de colágena se agregan formando haces, con diámetros que alcanzan algunos micrómetros, por lo que pueden observarse con el microscopio óptico como *fibras de colágena*.

Los tipos IX y XII son las denominadas *colágenas asociadas a fibrillas*, ya que decoran la superficie de las fibrillas de colágena. Se supone que unen a las fibrillas entre sí y a otros componentes de la matriz extracelular. Por su parte, el tipo IV, tal como ya hemos comentado, es una *colágena formadora de redes*, mientras que las moléculas de tipo VII forman dímeros que se ensamblan constituyendo estructuras especializadas denominadas *fibras de anclaje*. Estas fibras intervienen en la fijación de la lámina basal de los epitelios pluriestratificados al tejido conjuntivo subyacente, razón por la que son especialmente abundantes en la piel.



Figura 19–63 Un fibroblasto rodeado por fibrillas de colágena en el tejido conjuntivo de la piel de un embrión de pollo. En esta electromicrografía obtenida por microscopía electrónica de transmisión se muestra cómo las fibrillas se organizan en haces orientados perpendicularmente. En efecto, mientras que unas se orientan en sentido longitudinal, otras lo hacen en sentido transversal. Las fibrillas de colágena están producidas por los fibroblastos, células con un abundante retículo endoplasmático donde se sintetizan proteínas de secreción como la colágena. (De C. Ploetz, E.I. Zycband y D.E. Birk, *J. Struct. Biol.* 106:73-81, 1991. Con la autorización de Elsevier.)

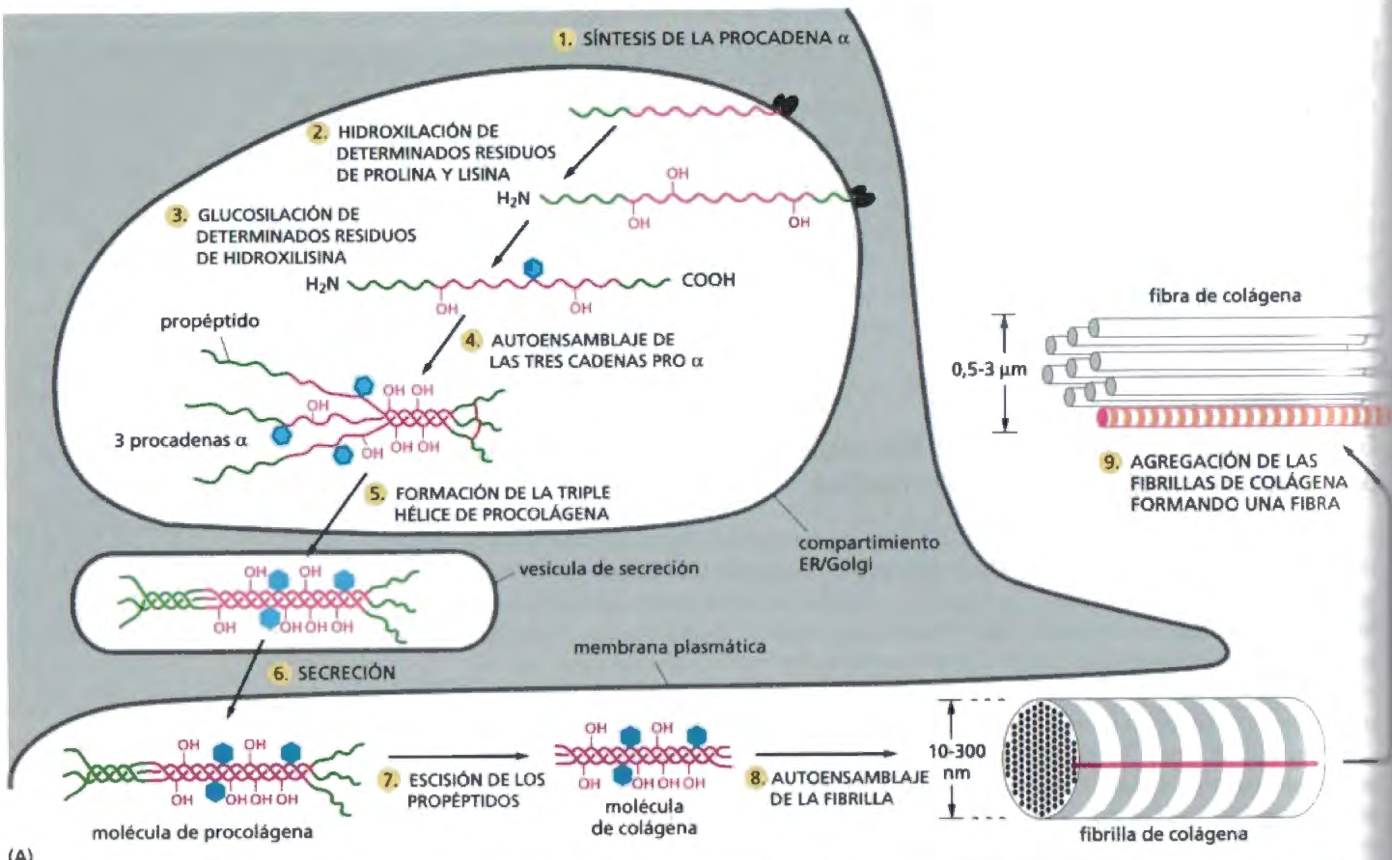




Figura 19–66 Procesos intra y extracelulares implicados en la formación de una fibrilla de colágena. (A) Nótese que las fibrillas de colágena se ensamblan en el espacio extracelular que está contenido en una gran invaginación de la membrana plasmática (no mostrado). A modo de ejemplo se muestra cómo las fibrillas pueden formar estructuras ordenadas en el espacio extracelular al ensamblarse y formar grandes fibras de colágena, las cuales son las estructuras observables mediante el microscopio óptico. No se muestran los enlaces cruzados que estabilizan los agregados extracelulares. (B) Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión de una fibrilla de colágena contrastada negativamente en la que se puede observar su típico aspecto estriado. (B, cortesía de Robert Horne.)

Las colágenas asociadas a fibrillas de secreción intervienen en la organización de las fibrillas

A diferencia de los GAG, que resisten fuerzas de compresión, las fibrillas de colágena forman estructuras que resisten fuerzas de tracción. Las fibrillas pueden presentar un diámetro muy variable y están organizadas de formas distintas en los diferentes tejidos. Así, por ejemplo, en la piel de los mamíferos están organizadas espacialmente a modo de un cesto de mimbre, lo que les permite la oposición a las tracciones ejercidas desde múltiples direcciones; el cuero está constituido por este material conservado de forma adecuada. En los tendones, las fibrillas de colágena están organizadas en haces paralelos que se alinean a lo largo del eje principal de tracción. Por último, tanto en el tejido óseo adulto como en la córnea, se disponen en láminas delgadas y superpuestas de forma que las fibrillas de cada lámina discurren paralelamente una a otra, pero forman un ángulo recto con las de las capas adyacentes. Esta misma organización se observa en la piel del renacuajo (**Figura 19–67**).

Las propias células del tejido conjuntivo determinan el tamaño y la organización de las fibrillas de colágena. Las células pueden expresar uno o más de los genes que codifican los diferentes tipos moleculares de procolágena fibrilar. Sin embargo, incluso fibrillas compuestas por una misma mezcla de moléculas de colágena fibrilar presentan diferentes organizaciones en los diversos tejidos. ¿Cómo se consigue? Parte de la respuesta radica en que las células pueden regular la disposición de las moléculas de colágena, una vez secretadas, mediante la formación de fibrillas directoras que están en íntima relación con la membrana plasmática (véase la Figura 19–66). Además, las células pueden influir en esta organización

secretando, junto con las colágenas fibrilares, diferentes tipos y cantidades de otras macromoléculas de la matriz. En particular, secretan la proteína fibrosa fibronectina, tal como estudiaremos y esto precede a la formación de fibrillas de colágena y ayuda a guiar su organización.

Parece que las **colágenas asociadas a fibrillas**, tales como los tipos IX y XII, son especialmente importantes en este sentido y difieren de las colágenas fibrilares en varios aspectos:

1. Su estructura trimérica helicoidal está interrumpida por uno o dos dominios cortos no helicoidales, lo que les aporta mayor flexibilidad que la de las moléculas de colágena fibrilares.
2. No son procesadas proteolíticamente tras la secreción, reteniendo así sus propéptidos.
3. Una vez en el espacio extracelular, no se agregan entre sí formando fibrillas, sino que se unen, siguiendo un patrón periódico, a la superficie de fibrillas formadas por colágenas fibrilares. Las moléculas del tipo IX se unen a fibrillas de colágena del tipo II en el cartílago, en la córnea y en el vítreo del ojo (**Figura 19–68**), mientras que las moléculas del tipo XII se unen a fibrillas que contienen colágena del tipo I y que se encuentran tanto en tendones como en otros tejidos.

Se cree que las colágenas asociadas a fibrillas median las interacciones entre sí y con otras macromoléculas de la matriz facilitando la organización fibrilar de la matriz.



Figura 19–67 Fibrillas de colágena de la piel de un renacuajo. La imagen obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión muestra el ordenamiento multilaminar de las fibrillas. Las sucesivas capas de fibrillas se orientan siguiendo ángulos rectos. Este tipo de organización también se encuentra en el hueso maduro y en la córnea. (Cortesía de Jerome Gross.)

Las células participan en la organización de las fibrillas de colágena que secretan al ejercer fuerzas de tracción sobre la matriz

Las células interaccionan con la matriz extracelular tanto mecánica como químicamente; los estudios *in vitro* sugieren que esta interacción mecánica comporta importantes efectos sobre la arquitectura del tejido conjuntivo. Así, cuando los fibroblastos son cultivados en una placa en la que se ha depositado una matriz gelificada de fibrillas de colágena distribuidas al azar, las células estiran de la matriz, ejerciendo tracción sobre la colágena situado a su alrededor, lo cual hace que el gel se contraiga hasta alcanzar un volumen que es una pequeña fracción del que tenían inicialmente. Mediante un mecanismo similar a éste, un grupo de fibroblastos se rodea de una cápsula de fibras de colágena, que se empaquetan densamente y están orientadas en circunferencia.

Cuando dos pequeños fragmentos de tejido embrionario que contienen fibroblastos se colocan separados sobre un gel de colágena, ésta tiende a organizarse formando una banda de fibras alineadas que conectan ambos explantes (**Figura 19–69**), sobre la que migrarán las células. En consecuencia, los fibroblastos ejercen una influencia sobre la alineación de las fibras de colágena y estas últimas afectan la distribución de los fibroblastos.

Los fibroblastos pueden tener un papel similar a éste en la organización de la matriz extracelular en el interior del cuerpo, en primer lugar sintetizando fibrillas de colágena y depositándolas en la orientación correcta y, a continuación, trabajando en la matriz que han secretado, migrando por ella y estirando de ella generando tendones, ligamentos y las duras y densas capas de tejido conjuntivo que envuelven y unen la mayoría de los órganos.

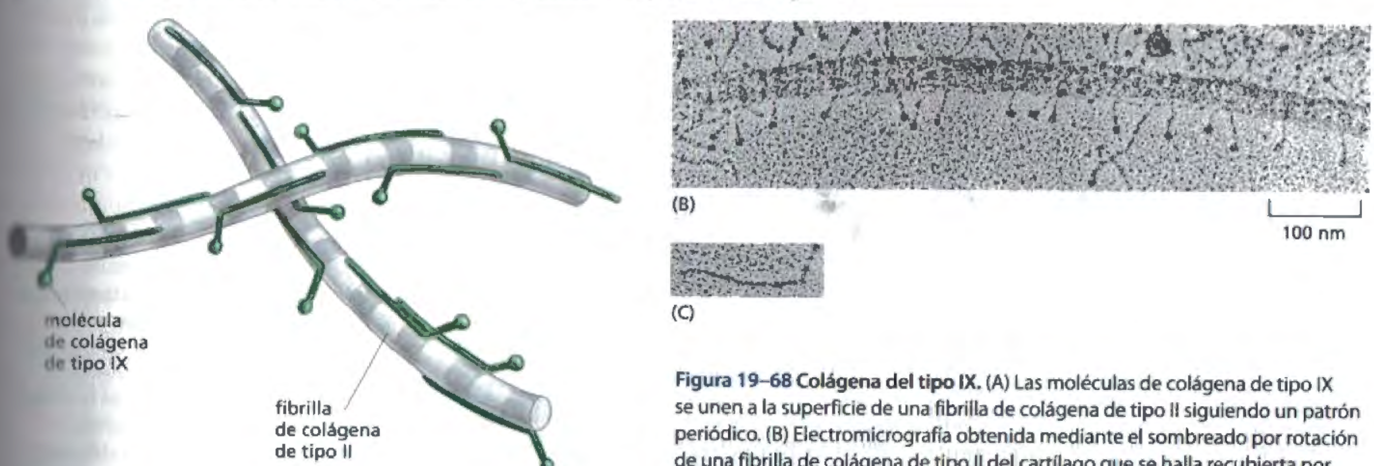


Figura 19–68 Colágena del tipo IX. (A) Las moléculas de colágena de tipo IX se unen a la superficie de una fibrilla de colágena de tipo II siguiendo un patrón periódico. (B) Electromicrografía obtenida mediante el sombreado por rotación de una fibrilla de colágena de tipo II del cartílago que se halla recubierta por moléculas de colágena de tipo IX. (C) Molécula de colágena de tipo IX individualizada. (B y C, de L. Vaughan et al., *J. Cell Biol.* 106:991-997, 1988. Con autorización de The Rockefeller University Press.)

La elastina confiere elasticidad a los tejidos

Muchos tejidos de vertebrados, como la piel, los vasos sanguíneos y los pulmones, para poder ejercer su función tienen que ser a la vez elásticos y resistentes. Una red de **fibras elásticas** en la matriz extracelular de estos tejidos les confiere la elasticidad necesaria para recobrar su conformación inicial después de una deformación transitoria (**Figura 19–70**). Las fibras elásticas son por lo menos cinco veces más extensibles que una goma elástica –de las de uso diario– de la misma sección transversal. Intercaladas con las fibras elásticas se encuentran largas fibras de colágena inelásticas, las cuales limitan la capacidad de extensión y previenen el desgarro tisular.

El componente principal de las fibras elásticas es la **elastina**, una proteína muy hidrofóbica (de unos 750 residuos de aminoácidos de longitud) y que, como la colágena, es muy rica en prolina y glicina. A diferencia de la colágena, la elastina no está glucosilada, presenta poca hidroxiprolina y carece de hidroxilisina. El precursor de la elastina, la *tropoelastina*, es secretado en forma soluble al espacio extracelular, ensamblándose formando las fibras elásticas en regiones próximas a la membrana plasmática, generalmente en invaginaciones de la superficie celular. Tras su secreción, las moléculas de tropoelastina forman numerosos enlaces cruzados entre ellas, dando lugar a una extensa red de filamentos y láminas de elastina. Se forman enlaces entre residuos de lisina mediante el mismo mecanismo por el que se forman en las moléculas de colágena.

La molécula de elastina está constituida en su mayor parte por dos tipos de segmentos, de longitud reducida y codificados por exones diferentes, que se alternan a lo largo de la cadena polipeptídica: los segmentos hidrofóbicos, responsables de las propiedades elásticas de la molécula, y los segmentos en hélice α, ricos en alanina y lisina, que forman los enlaces cruzados entre moléculas adyacentes. Todavía existe controversia respecto a la conformación de las moléculas de elastina en las fibras elásticas y cómo su estructura le confiere las propiedades elásticas. Sin embargo, parece que zonas de la cadena polipeptídica de elastina se asemejan a las cadenas poliméricas de las gomas elásticas en que adoptan una conformación de "enrollamiento al azar", y es precisamente esta estructura la que permite a la red de elastina estirarse y contraerse como una banda elástica (**Figura 19–71**).

La elastina es la proteína mayoritaria de la matriz extracelular de las arterias, representando hasta el 50% del peso seco de la mayor de ellas, la aorta. Determinadas mutaciones en el gen que codifica la elastina en humanos y en roedores, dan como resultado el estrechamiento de la aorta y otras arterias, y una excesiva proliferación de las fibras musculares lisas que residen en la pared del vaso. Parece que para restringir la proliferación de estas células es necesaria la presencia de fibras de elastina.

Las fibras elásticas no sólo están compuestas por elastina. El núcleo de la elastina está rodeado por una envoltura de *microfibrillas*, cada una de las cuales tiene un diámetro de unos 10 nm. Las microfibrillas aparecen antes que la elastina en tejidos en desarrollo y parece que proporcionan un armazón que guía su deposición. Las microfibrillas son elásticas por sí mismas y en algunas regiones persisten en ausencia de elastina. Por ejemplo, estas microfibrillas ayudan a mantener al cristalino en la posición correcta dentro del ojo. Las microfi-

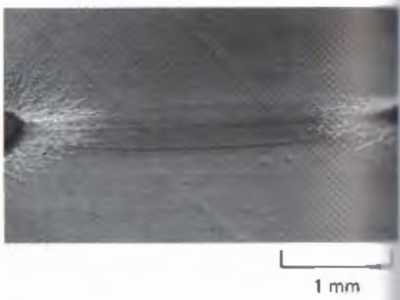


Figura 19–69 Las células modelan la matriz extracelular. Esta fotografía obtenida mediante microscopía óptica muestra la región situada entre dos fragmentos del corazón embrionario de pollo (el cual es rico tanto en fibroblastos como en fibras musculares) que han sido cultivados sobre un gel de colágena durante cuatro días. Entre los explantes se ha formado un denso tracto de fibras de colágena alineadas, probablemente como resultado de la fuerza de tracción ejercida sobre ellas por los fibroblastos. (De D. Stopak y A.K. Harris, *Dev. Biol.* 90:383-398, 1982. Con autorización de Academic Press.)

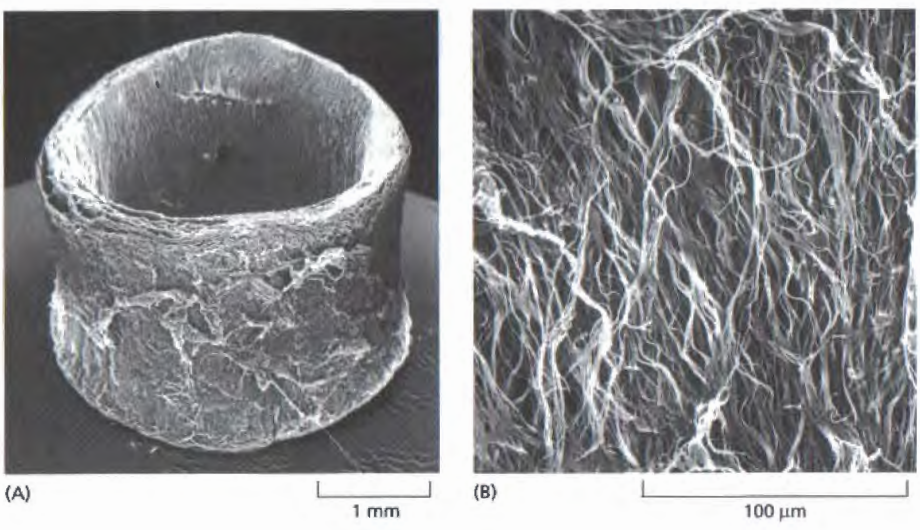


Figura 19–70 Fibras elásticas. Estas fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido muestran (A) un segmento de la aorta a bajo aumento de perro y (B) una amplificación que muestra la densa red de fibras elásticas, orientadas longitudinalmente y localizadas en la túnica adventicia del mismo vaso sanguíneo. El resto de componentes han sido digeridos por medio de enzimas y ácido fórmico. (De K.S. Haas et al., *Anat. Rec.* 230:86-96, 1991. Con autorización de Wiley-Liss.)

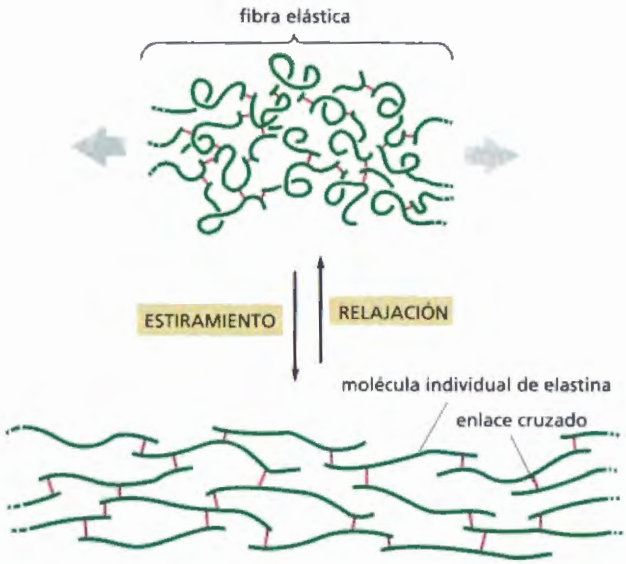


Figura 19–71 Estiramiento de una red de moléculas de elastina. Las moléculas de elastina están unidas entre sí mediante enlaces covalentes (*rojo*) dando lugar a una red entrecruzada. En este modelo cada molécula de elastina puede expandirse y contraerse como una espiral aleatoria, de modo que el conjunto de la red también puede hacerlo, asemejándose así a una banda elástica.

fibrillas están constituidas por varias glucoproteínas distintas, entre las que se encuentra la glucoproteína *fibrilina*, que interacciona con la elastina y parece desempeñar un papel esencial en el mantenimiento de la integridad de las fibras elásticas. Algunas mutaciones del gen de la fibrilina dan lugar al *síndrome de Marfan*, una enfermedad genética relativamente común. En los individuos afectados por la forma más grave, la aorta es propensa al desgarro. Otros efectos comunes en esta enfermedad son el desplazamiento del cristalino y las alteraciones del esqueleto y de las articulaciones. Las personas afectadas acostumbran a ser extraordinariamente altas y delgadas. Se cree que Abraham Lincoln padecía este síndrome.

La fibronectina es una proteína extracelular que interviene en el anclaje de la célula a la matriz

La matriz extracelular contiene un cierto número de proteínas, aparte de las colágenas, que de manera característica presentan varios dominios, cada uno de los cuales tiene lugares de unión específicos para otras macromoléculas de la matriz y para receptores de la superficie celular. De esta forma, estas proteínas facilitan tanto la organización de la matriz como el anclaje de las células a la matriz y, del mismo modo que los proteoglucanos, guían las migraciones celulares durante el desarrollo tisular, ya que sirven de camino para las células o como señales repelentes que mantienen las células fuera de regiones inadecuadas.

La primera de esta clase de proteínas de matriz en ser caracterizada fue la **fibronectina**, una glucoproteína que se halla presente en todos los vertebrados y es importante en las interacciones célula-matriz. Por ejemplo, los ratones mutantes deficientes en fibronectina mueren en estadios tempranos de la embriogénesis, ya que sus células endoteliales no pueden formas vasos sanguíneos. Se sugiere que este efecto se debe a anomalías en las interacciones entre estas células y la matriz extracelular adyacente, la cual suele contener fibronectina.

La fibronectina es un dímero compuesto por dos subunidades muy largas que se encuentran unidas mediante un par de enlaces disulfuro situados cerca del extremo carboxilo. Cada subunidad está organizada en una serie de dominios funcionalmente distintos, separados por regiones polipeptídicas flexibles (**Figura 19–72**). A su vez, estos dominios están compuestos por módulos más pequeños que, al repetirse de forma secuencial y estar codificados por un exón diferente, sugieren que el gen de la fibronectina, como los de la colágena, se originó por duplicaciones exónicas múltiples. En el genoma humano, se ha descrito sólo un gen de fibronectina, el cual contiene alrededor de 50 exones de tamaño similar, pero sus transcritos pueden madurar de diferentes maneras produciendo diferentes isoformas de fibronectina. Las regiones del módulo principal, denominado **repetición de fibronectina de tipo III**, interaccionan con las integrinas y, por tanto, con las superficies celulares. Este módulo está compuesto por unos 90 residuos de aminoácidos, repitiéndose al menos 15 veces en cada subunidad. La repetición de fibronectina de tipo III se encuentra entre los dominios proteicos más frecuentes en los vertebrados.

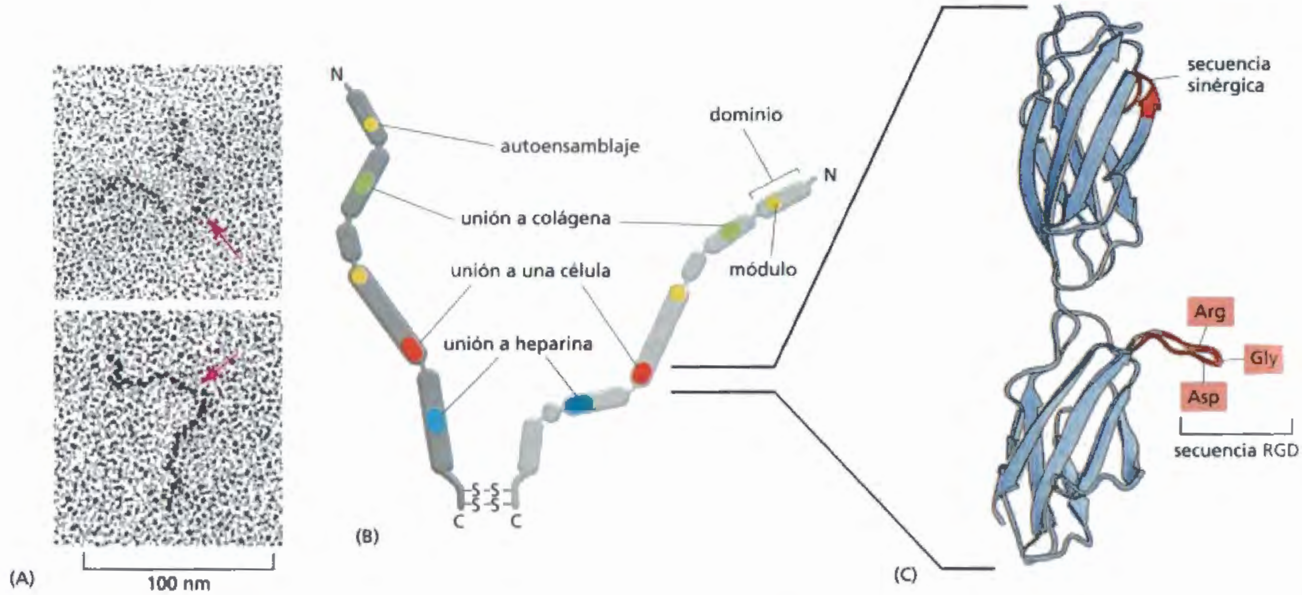


Figura 19-72 Estructura de un dímero de fibronectina. (A) Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de dímeros de fibronectina individualizados tras haber sido sombreados con platino; las *flechas rojas* señalan el extremo carboxilo. (B) Las dos cadenas polipeptídicas son similares pero no idénticas (están sintetizadas por el mismo gen pero son el resultado de una maduración diferencial del mRNA); están unidas por enlaces disulfuro localizados próximos al extremo carboxilo. Cada cadena contiene por lo menos 2500 residuos de aminoácido y está plegada en cinco o seis dominios conectados mediante segmentos polipeptídicos flexibles. Cada dominio se especializa en la unión a una molécula determinada o a una célula, como se indica para cinco de ellos. Para simplificar no se muestran todos los lugares de unión (p. ej., existen otros lugares de unión a la célula). (C) Estructura tridimensional, determinada por cristalografía de rayos X, de dos repeticiones de fibronectina de tipo III, el módulo repetitivo más representado en la fibronectina. Tanto la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) como las secuencias "sinérgicas" indicadas en *rojo* forman parte del principal lugar de unión a la célula y son importantes para esta unión. (A, de J. Engel et al., *J. Mol. Biol.*150:97-120, 1981. Con la autorización de Academic Press; C, de Daniel J. Leahy, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:363-393, 1997. Con la autorización de Annual Reviews.)

La tensión ejercida por las células regula el ensamblaje de las fibrillas de fibronectina

La fibronectina puede existir tanto en forma soluble, circulando por la sangre y otros fluidos corporales, como en forma de *fibrillas de fibronectina* insolubles, donde los dímeros de fibronectina están entrelazados por enlaces disulfuro adicionales y forman parte de la matriz extracelular. Al contrario de lo que ocurre con las fibrillas de colágena, que pueden autoensamblarse en un tubo de ensayo, las moléculas de fibronectina sólo pueden formar fibrillas en la superficie celular y únicamente donde se expresen las proteínas de unión a fibronectina adecuadas, en particular, las integrinas. Las integrinas proporcionan una región de enlace entre la fibronectina extracelular y la actina intracelular. Este enlace transmite tensión a las moléculas de fibronectina, que también presentan uniones a otras estructuras, estirándolas y dejando al descubierto regiones de unión ocultas (**Figura 19-73**). Este mecanismo les permite unirse directamente entre sí y reclutar moléculas adicionales de fibronectina formando una fibrilla (**Figura 19-74**). Esta dependencia entre la tensión y la interacción con la superficie celular asegura que las fibrillas de fibronectina se ensamblen justo donde existe una necesidad mecánica y no en zonas inapropiadas como sería el flujo sanguíneo.



Figura 19-73 Despliegue de un dominio de la fibronectina de tipo III en respuesta a tensión. El estiramiento de la fibronectina de esta forma deja al descubierto puntos de unión que normalmente están escondidos, lo cual hace que las moléculas estiradas se ensamblen formando filamentos, como se muestra en la Figura 19-74. (De V. Vogel y M. Sheetz, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:265-275, 2006. Con autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

Muchas otras proteínas de matriz extracelular presentan múltiples repeticiones similares a las de la fibronectina de tipo III, y es posible que la tensión ejercida en estas proteínas también descubra sitios de unión ocultos y, por tanto, influya en su polimerización.

La fibronectina se une a integrinas a través de motivos RGD

Una manera de analizar una proteína compleja multifuncional como la fibronectina es fragmentarla y determinar la función de cada uno de sus dominios individualmente. Cuando la fibronectina se trata con bajas concentraciones de una enzima proteolítica, la cadena polipeptídica se escinde por las regiones de conexión entre los dominios, pero mantiene intactos estos dominios. De esta forma se puede observar que un dominio se une a la colágena, otro a la heparina, otro a receptores específicos de superficie de varios tipos celulares y así sucesivamente (véase la Figura 19–72B). Además, mediante la utilización de péptidos sintéticos correspondientes al dominio de unión a la célula se pudo identificar una secuencia tripeptídica específica (*Arg-Gly-Asp* o *RGD*), localizada en una de las repeticiones de tipo III (véase la Figura 19–72C) y que constituía un elemento esencial del sitio de unión a una célula. Incluso los péptidos muy cortos que contienen esta **secuencia RGD** compiten con la fibronectina por el receptor de las células y bloquean su adhesión a una matriz de fibronectina. Si estos péptidos se inmovilizan sobre una superficie sólida, se consigue que las células se adhieran a ella.

Además de la fibronectina, algunas proteínas extracelulares también tiene una secuencia RGD que media su unión a la superficie celular. Algunas de ellas participan en la coagulación de la sangre, de forma que algunos péptidos que contienen la secuencia RGD han resultado útiles para el desarrollo de fármacos anticoagulantes. Algunas serpientes utilizan una estrategia similar a ésta para conseguir que sus víctimas sangren: en sus venenos segregan unas proteínas anticoagulantes que contienen RGD, llamadas *desintegrinas*.

Los receptores de superficie celular que se unen a proteínas que contienen RGD son miembros de la familia de las integrinas. Cada integrina, sin embargo, reconoce específicamente a un grupo reducido de moléculas de la matriz, lo cual indica que la fuerte unión al receptor requiere de algo más que de la secuencia RGD. Además, estas secuencias de RGD no son los únicos lugares de unión a integrinas, ya que algunas integrinas reconocen y se unen a otros motivos de la fibronectina.

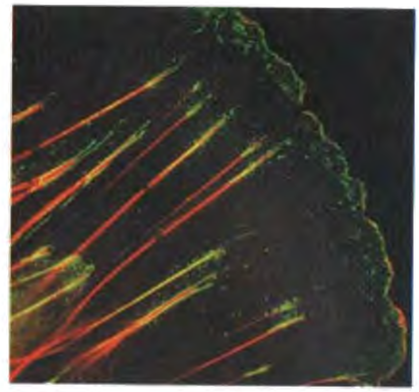


Figura 19–74 Organización de la fibronectina en fibrillas en la superficie celular. Esta imagen muestra el extremo frontal de un fibroblasto de ratón migrando. La proteína de adhesión extracelular fibronectina está teñida de *verde* y los filamentos de actina, de *rojo*. La fibronectina se presenta inicialmente como agregados en forma de puntos cerca de la superficie de avance de la célula. Se acumula en las adhesiones focales (lugares de anclaje de los filamentos de actina) y se organiza en fibrillas dispuestas de forma paralela a los filamentos de actina. Las moléculas de integrina esparcidas por la membrana celular enlazan la fibronectina extracelular con los filamentos de actina del interior de la célula. Se sugiere que la tensión ejercida sobre las moléculas de fibronectina a través de este enlace produce su estiramiento y, por tanto, la exposición de nuevos lugares de unión que favorecerían la formación de fibrillas. (Por cortesía de Roumen Pankov y Kenneth Yamada.)

Las células tienen que ser capaces tanto de degradar la matriz como de formarla

La habilidad que tienen las células para degradar y destruir la matriz extracelular es tan importante como la habilidad de formarla y de unirse a ella. Se requiere una degradación de matriz rápida en procesos como la reparación tisular. Incluso en la aparentemente estática matriz extracelular de los animales adultos, existe una renovación lenta y constante, con macromoléculas de matriz que van siendo sintetizadas y degradadas. Este proceso permite, por ejemplo, la remodelación del hueso tras una lesión (tratado en el Capítulo 23).

Desde el punto de vista de las células individuales, la capacidad para atravesar la matriz es fundamental en dos sentidos: permite su división aun estando incrustadas en la matriz y permite que migren a través de ella. Como ya hemos mencionado, las células de tejidos conjuntivos deben ser capaces de estirarse para dividirse. Si una célula carece de las enzimas necesarias para atravesar la matriz que la rodea o está incrustada en una matriz que se resiste a esta acción, la célula continuará siendo redonda e incapaz de extenderse y, en consecuencia, no podrá dividirse y tendrá dificultades para migrar.

También es necesaria la degradación localizada de los componentes de matriz cuando las células tienen que escapar de la lámina basal. Esta degradación es necesaria, por ejemplo, durante el crecimiento normal de las ramificaciones de estructuras epiteliales como las glándulas, ya que permite que la población de células epiteliales pueda diseminarse. Del mismo modo, también es necesaria en la migración de los leucocitos a través de la lámina basal de un vaso sanguíneo hacia los tejidos inflamados o lesionados. La degradación de la matriz también es importante tanto para la propagación de las células cancerosas a través del cuerpo como para la capacidad que tienen estas células para proliferar en los tejidos que invaden (tratado en el Capítulo 20).

La degradación de la matriz se localiza en las proximidades de las células

En general, los componentes de la matriz son degradados por enzimas proteolíticas extracelulares (proteasas) que actúan cerca de las células que las producen. Así, los anticuerpos que reconocen los productos de la hidrólisis proteica tan sólo los detectan alrededor de las células. Muchas de estas proteasas pertenecen a dos de las clases principales que las agrupan. La mayoría son **metaloproteasas matriciales**, cuya actividad depende de su unión a Ca^{2+} o a Zn^{2+}, mientras que las restantes son **serinas proteasa**, las cuales tienen un residuo serina muy reactivo en su lugar activo. Ambas, metaloproteasas y serinas proteasa, cooperan en la degradación de proteínas de la matriz tales como colágena, laminina y fibronectina. Algunas de las metaloproteasas, como las *colagenasas*, son muy específicas y degradan determinadas proteínas por lugares específicos. De esta manera se preserva la integridad estructural de la matriz, pero es suficiente para la migración celular. Otras metaloproteasas pueden ser menos específicas pero también actúan justo donde son necesarias porque permanecen ancladas a la membrana plasmática. Este tipo de metaloproteasas de matriz son las esenciales para que una célula pueda dividirse mientras está embebida en la matriz.

Evidentemente, la actividad de las proteasas que degradan los componentes de matriz debe tener un control preciso. Existen tres mecanismos básicos para este control.

Activación local. Numerosas proteasas son secretadas en forma de precursores inactivos, que serán activados localmente cuando se necesiten. Un ejemplo lo constituye el *plasminógeno*, un precursor inactivo que es muy abundante en el plasma sanguíneo. Proteasas denominadas *activadores del plasminógeno* escinden de forma local el plasminógeno, dando lugar a la serina proteasa *plasmina*, la cual participa en la disolución de los coágulos sanguíneos. El *activador del plasminógeno de tipo tisular* (*tPA: **t**issue-type **p**lasminogen **a**ctivator*) es administrado a pacientes que acaban de sufrir un infarto cardíaco o un proceso trombótico, facilitando la disolución del coágulo arterial que causó el infarto y, de esta manera, restaurando el flujo sanguíneo al tejido.

Confinamiento por receptores de la superficie celular. Muchas células disponen de receptores que reconocen a las proteasas, de manera que las enzimas se pueden confinar en los lugares que son necesarias. Un buen ejemplo de ello lo constituye un segundo tipo de activador del plasminógeno, denominado *activador del plasminógeno de tipo uroquinasa* (*uPA: **u**rokinase-type **p**lasminogen **a**ctivator*). Se encuentra unido a su receptor en el extremo en crecimiento del axón o en el frente de avance de algunas células migratorias, donde actúa en la apertura de la vía de migración. El uPA unido a su receptor también favorece la metástasis de algunas células cancerosas (**Figura 19–75**).

Secreción de inhibidores. La actividad de las proteasas puede ser confinada en determinadas áreas mediante la secreción de inhibidores, tales como los *inhibidores tisulares de metaloproteasas* (*TIMP: **t**issue **i**nhibitors of **m**etallo**p**roteases*) y los inhibidores de las serinas proteasa, conocidos como *serpinas*. Estos inhibidores son específicos de determinadas proteasas y se unen fuertemente a la enzima activa bloqueando su actividad. Una idea atractiva es que los inhibidores sean secretados por células situadas en la periferia de las áreas de degradación activa con el fin de proteger aquellas regiones de la matriz que no se encuentran implicadas de forma directa en el proceso. Estos inhibidores también pueden proteger aque-

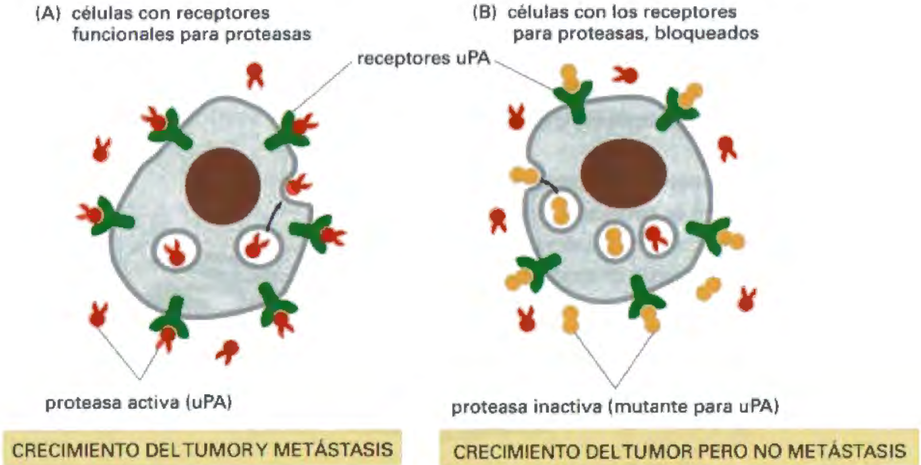


Figura 19–75 La importancia de la unión de las proteasas a los receptores de la superficie celular. (A) Las células de cáncer de próstata humano sintetizan y secretan la proteína serina uPA, la cual se une a los receptores uPA de la superficie celular. (B) Las mismas células que han sido transfectadas con DNA que codifica en exceso una forma inactiva de uPA, la cual se une a su receptor pero no tiene actividad proteasa. Esta uPA inactiva se une a los receptores de la superficie celular e impide que se unan las proteasas activas. Ambos tipos celulares secretan uPA activa, crecen rápidamente y producen tumores cuando se inyectan en animales de experimentación. Pero las células de (A) sufren metástasis mientras que las de (B) no lo hacen. Para que las células tumorales provoquen metástasis a través de la circulación sanguínea, tienen que atravesar las láminas basales y otras matrices extracelulares en la entrada y salida del flujo sanguíneo. Este experimento sugiere que las proteasas tienen que unirse a la superficie celular para facilitar la migración a través de la matriz.

las proteínas de superficie celular que sean necesarias para la adhesión o la migración. La sobreexpresión de TIMP inhibe la migración de algunos tipos celulares, lo cual enfatiza la importancia que tienen las metaloproteasas para la migración.

Resumen

Las células del tejido conjuntivo se hallan embebidas en una compleja matriz extracelular, que no sólo une las células entre sí, sino que también influye en su desarrollo, polaridad y comportamiento migratorio. La matriz contiene diversas proteínas fibrilares intercaladas en el interior de un gel hidratado compuesto por una red de cadenas de glucosaminglucanos (GAG).

Los GAG constituyen un grupo heterogéneo de largas cadenas de polisacáridos cargados negativamente, los cuales (exceptuando el ácido hialurónico) se unen de forma covalente a una proteína dando lugar a moléculas de proteoglucanos. Las cargas negativas atraen a compuestos cargados positivamente, los cuales tienen un poderoso efecto osmótico, trasvasando agua a la matriz y manteniéndola hinchada ocupando un gran volumen de espacio extracelular. Estos proteoglucanos también se encuentran en la superficie celular y a menudo desempeñan funciones de correceptores facilitando la respuesta celular frente a señales proteicas solubles.

Las proteínas formadoras de fibras confieren resistencia y elasticidad a la matriz. También proporcionan estructuras a las que las células se puedan adherir, a menudo mediante glucoproteínas multidominio, como la fibronectina y la laminina, que presentan múltiples regiones de unión a integrinas de superficie celular. La elasticidad está proporcionada por moléculas de elastina, las cuales forman una extensa red de fibras y láminas que tienen capacidad de estirarse y retraerse. Las colágenas fibrilares (tipos I, II, III, V y XI) proporcionan resistencia mecánica y están formadas por trímeros helicoidales que se agregan formando largas fibrillas en el espacio extracelular. A su vez, estas fibrillas pueden ensamblarse formando diversas matrices muy ordenadas. Las moléculas de colágena asociadas a fibras, tales como los tipos IX y XII, decoran la superficie de las fibras de colágena e influyen en las interacciones que establecen las fibras entre sí y con otros componentes de la matriz.

Los componentes de la matriz son degradados por enzimas proteolíticas extracelulares. La mayoría de ellas son metaloproteasas de matriz, cuya actividad depende de la unión de Ca^{2+} o Zn^{2+}, mientras que otras son serinas proteasa, las cuales disponen de un residuo reactivo de serina en su lugar activo. La degradación de los componentes de matriz es objeto de complejos controles; las células pueden, por ejemplo, abrir una vía que facilite su migración mediante esta degradación localizada.

PARED CELULAR VEGETAL

Cada célula vegetal forma y está a su vez completamente en contacto con una matriz extracelular compleja denominada *pared celular vegetal*. La gruesa pared celular del corcho, visible con un microscopio rudimentario, fue la que en 1663 permitió a Robert Hooke distinguir con claridad las células y después darles este nombre. Las paredes de las células vegetales colindantes, que se unen entre sí formando una planta (**Figura 19–76**), son por lo general más gruesas, más fuertes y, lo que es más importante, más rígidas que la matriz extracelular sintetizada por las células animales. Las células vegetales primitivas, al evolucionar hacia estas paredes relativamente rígidas –que pueden llegar a alcanzar muchos micrómetros de espesor–, perdieron la capacidad para desplazarse, adoptando un estilo de vida sedentario que ha persistido hasta los vegetales actuales.

La composición de la pared celular depende del tipo celular

Todas las paredes celulares vegetales se originan durante la división celular cuando, durante la citocinesis, se forma la placa celular que separará a las células hijas (se describe en el Capítulo 17). En general, las nuevas células se producen en regiones denominadas *meristemos* (como se discutirá en el Capítulo 22) y son pequeñas en comparación con su tamaño final. Para poder crecer posteriormente, las paredes de las nuevas células, denominadas **paredes celulares primarias**, son delgadas y extensibles, aunque resistentes. Cuando se detiene el crecimiento, la pared ya no necesita ser extensible, de manera que la pared primaria se conserva sin mayores modificaciones y frecuentemente se sintetiza una rígida **pared celular secundaria**, depositándose nuevas capas de matriz dentro de las antiguas. En general, estas nuevas capas pueden tener una composición que es significativamente diferente a la

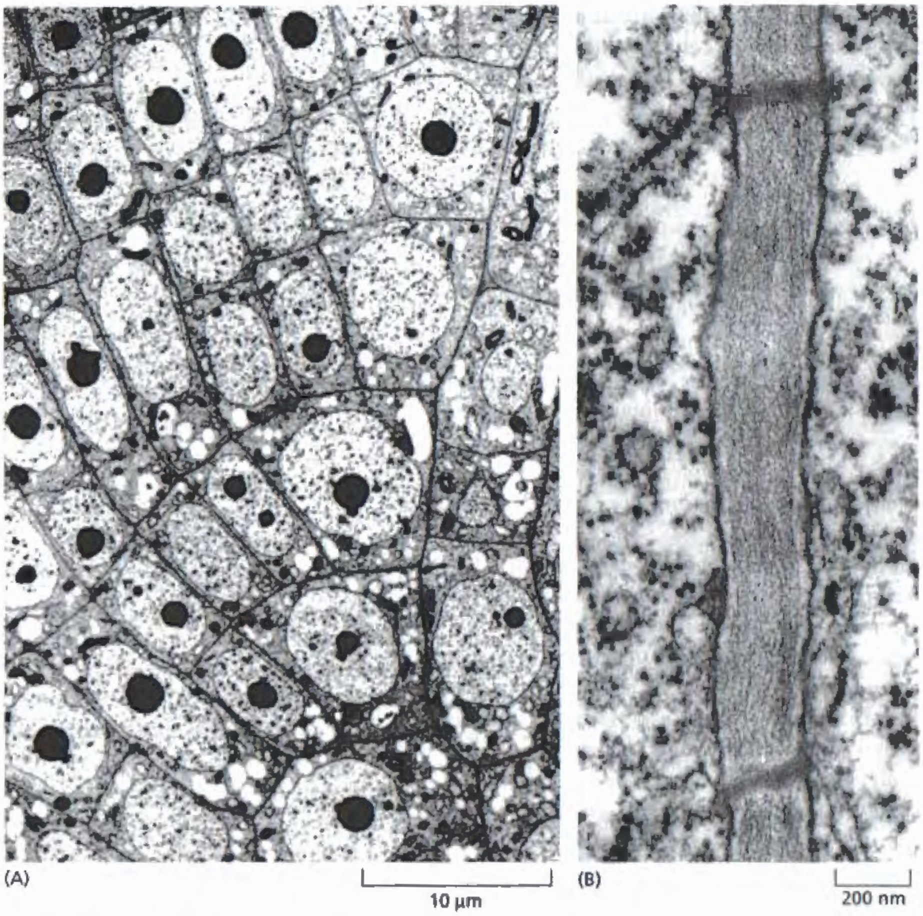


Figura 19–76 Paredes celulares vegetales. (A) Imagen de la punta de la raíz de un junco, obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión, que muestra el organizado patrón celular que resulta de una secuencia ordenada de divisiones de células que tiene paredes rígidas. En este tejido en crecimiento, las paredes celulares son todavía finas y en las micrografías aparecen como finas líneas negras entre las células. (B) Sección de la pared celular que separa dos células vegetales adyacentes. Las dos bandas transversales oscuras corresponden a los plasmodesmos que atraviesan la pared (véase Figura 19–38). (A, por cortesía de C. Busby y B. Gunning, *Eur. J. Cell Biol.* 21: 214-233, 1980. Con la autorización de Elsevier; B, por cortesía de Jeremy Burgess.)

de la pared primaria. El polímero suplementario más común en estas paredes secundarias es la **lignina**, una compleja red de compuestos fenólicos unidos covalentemente que se localiza en las paredes de los vasos del xilema y en las fibras de los tejidos leñosos.

Aunque las paredes celulares de las plantas superiores varían en cuanto a composición y a organización, todas ellas están construidas, como en el caso de las matrices extracelulares animales, utilizando un principio estructural común a todos los compuestos fibrosos, incluida la fibra de vidrio y el hormigón armado. Un componente proporciona resistencia a la tracción, mientras que otro, en el que está integrado el primero, proporciona resistencia a la compresión. Este principio es el mismo en las plantas y en los animales, pero su composición química es diferente. A diferencia de la matriz extracelular animal, que es rica en proteínas y en otros polímeros nitrogenados, la pared de células vegetales se constituye casi en su totalidad por polímeros que no contienen nitrógeno, incluidas la *celulosa* y la lignina. Para un organismo sedentario que depende de CO_2, H_2O y luz solar, estos dos biopolímeros abundantes representan materiales estructurales "baratos" basados en el carbono, facilitando la conservación del escaso nitrógeno disponible en el suelo y que, en general, limita el crecimiento de la planta. Así, por ejemplo, los árboles hacen una enorme inversión en celulosa y lignina para constituir la mayor parte de su biomasa.

En las paredes celulares de las plantas superiores, las fibras que se oponen a las fuerzas de tracción están formadas por el polisacárido celulosa, la macromolécula orgánica más abundante de la Tierra, organizado en una tupida red de *glucanos de entrecruzamiento*. En las paredes celulares primarias, la matriz en la que se embeben las fibras de celulosa está compuesta por *pectina*, una red altamente hidratada de polisacáridos ricos en ácido galacturónico. Las paredes secundarias contienen otros componentes suplementarios que les confieren rigidez y durabilidad. Entre ellos, encontramos la lignina, que constituye un relleno duro e impermeable que ocupa los intersticios dejados por otros componentes. Todas estas moléculas se mantienen unidas entre sí mediante la combinación de enlaces covalentes y no-covalentes, que dan lugar a una estructura muy compleja cuya composición, grosor y arquitectura depende del tipo celular.

La pared celular de los vegetales ejerce así una función "esquelética" que sostiene a la planta en todo su conjunto, una función protectora al englobar a las células individualmente,

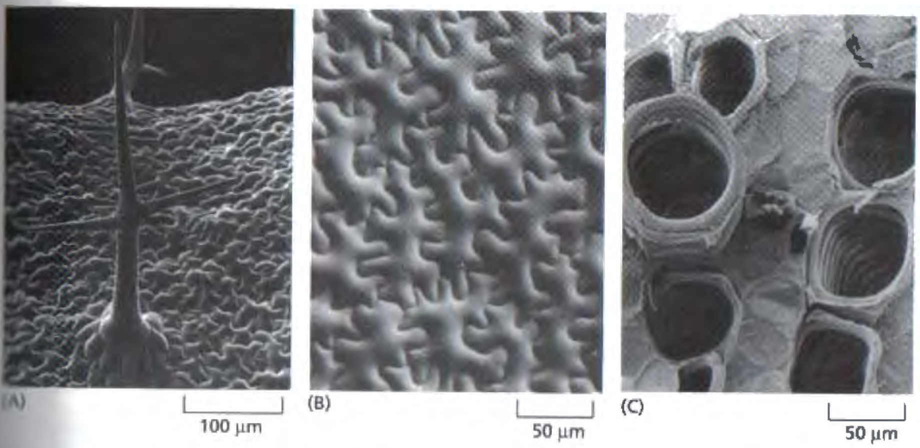


Figura 19–77 Tipos celulares especializados con paredes celulares modificadas. (A) Tricoma, o pelo, situado en el haz de una hoja de *Arabidopsis*. Esta puntiaguda célula protectora está modelada mediante la deposición local de una resistente pared celular de celulosa. (B) Vista de la superficie de las células epidérmicas de una hoja de tomate. Las células encajan perfectamente como si fueran las piezas de un rompecabezas, proporcionando a la hoja una recia cubierta externa. La pared celular externa está reforzada mediante una cutícula y ceras que impermeabilizan la hoja, colaborando en la defensa contra los patógenos. (C) Esta imagen de diversos elementos jóvenes del xilema muestra la gruesa pared secundaria, lignificada y reforzada por anillos, que da lugar a la formación de los resistentes tubos que realizan el transporte de agua en la planta. (A, por cortesía de Paul Linstead; B y C, por cortesía de Kim Findlay.)

y una función transportadora, al intervenir en la formación de canales que facilitan el desplazamiento de fluidos por el interior de la planta. Cuando las células vegetales se especializan, producen tipos de paredes adaptadas especialmente en función de las cuales pueden reconocerse y clasificarse los distintos tipos celulares (**Figura 19–77**; véase también el Panel 22-2, pp. 1404–1405). Sin embargo, en este apartado nos centraremos en la pared celular primaria y en la arquitectura molecular que subyace a la extraordinaria combinación de resistencia, elasticidad y plasticidad que se observa en las regiones de la planta que se encuentran en crecimiento.

La resistencia a la tracción que presentan las paredes celulares permite a las células vegetales desarrollar una presión de turgencia

El medio acuoso extracelular de una célula vegetal está constituido por el fluido contenido en las paredes que rodean la célula. Aunque el fluido de la pared celular de la planta contiene más solutos que el agua del medio externo de la planta (p. ej. el suelo), resulta ser hipotónico respecto al interior celular. Este desequilibrio osmótico es la causa de que la célula desarrolle una gran presión hidrostática interna o **presión de turgencia**, que presiona hacia la pared celular, exactamente como la cámara de una rueda presiona contra la cubierta. La presión de turgencia aumenta justo hasta el punto en el que la célula está en equilibrio osmótico e impide así la entrada neta de agua a pesar del desequilibrio salino (véase el Panel 11–1, p. 664). La presión de turgencia puede alcanzar 10 o más atmósferas, unas cinco veces más que unas cámaras de rueda de coche. Esta presión es vital para las plantas debido a que es la principal fuerza impulsora de la expansión de la célula durante el crecimiento, y proporciona la mayor parte de la rigidez mecánica, característica de los tejidos vegetales vivos. Compárese, por ejemplo, las hojas marchitas de una planta deshidratada con las hojas turgentes de una planta hidratada correctamente. La resistencia a la tracción de la pared celular es lo que permite a las células vegetales mantener esta presión interna.

La pared celular primaria está constituida por microfibrillas de celulosa entretejidas con una red de polisacáridos y proteínas

La celulosa proporciona la resistencia a la tracción que tiene la pared celular primaria. Una molécula de celulosa está compuesta por una cadena lineal de por lo menos 500 residuos de glucosa unidos entre sí covalentemente formando una estructura a modo de cinta, que está estabilizada por enlaces de hidrógeno intracatenarios (**Figura 19–78**). Además, al formarse enlaces de hidrógeno entre moléculas de celulosa adyacentes, éstas se unen con fuerza entre sí solapándose y constituyen haces de unas 40 cadenas de celulosa, todas ellas con la misma polaridad. Estos agregados cristalinos sumamente ordenados, de muchos micrómetros de longitud, se denominan **microfibrillas de celulosa** y tienen una resistencia a las fuerzas de tracción comparable a la del acero (véase Figura 19–78). Varios grupos de microfibrillas se ordenan en capas o láminas separadas unas de otras por unos 20-40 nm y conectadas por largas moléculas de glucanos que se unen a la superficie de las microfibrillas mediante enlaces

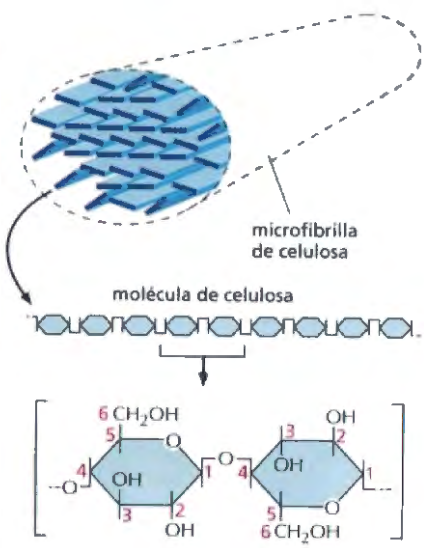


Figura 19–78 Celulosa. Las moléculas de celulosa son cadenas largas y no ramificadas de residuos de glucosa unidos entre sí mediante enlaces β1,4. Cada residuo de glucosa está invertido respecto a sus vecinos y la unidad de disacárido resultante se repite centenares de veces a lo largo de una misma molécula. Unas 40 moléculas de celulosa se ensamblan formando una fuerte microfibrilla de celulosa unida mediante enlaces de hidrógeno.

de hidrógeno. La pared celular primaria está constituida por varias de dichas láminas dispuestas en una red multilaminar (**Figura 19–79**).

Los **glucanos de entrecruzamiento** son un grupo heterogéneo de polisacáridos ramificados que se unen fuertemente a la superficie de cada microfibrilla de celulosa y, en consecuencia, facilitan el entrecruzamiento de las fibrillas formando una red compleja. Sus funciones son análogas a las de las colágenas asociadas a fibrillas que hemos descrito anteriormente (véase la Figura 19–68). Existen muchos tipos de glucanos de entrecruzamiento, pero todos ellos presentan una estructura lineal compuesta por un solo tipo de azúcar (glucosa, xilosa o manosa), del cual sobresalen cortas cadenas de otros glúcidos. Son los glúcidos de la estructura lineal los que forman enlaces de hidrógeno con las microfibrillas de celulosa, entrelazándolas al mismo tiempo. Tanto la estructura lineal como las cadenas laterales varían según la especie y su estadio de desarrollo.

Coexistiendo con esta red de microfibrillas formada por celulosa y glucanos de entrecruzamiento existe otra red de polisacáridos entrelazados constituida por **pectinas** (véase la Figura 19–79). Las pectinas constituyen un grupo heterogéneo de polisacáridos ramificados que contienen varios residuos de ácido galacturónico cargados negativamente. A causa del carácter de la carga, las pectinas se encuentran en un estado de gran hidratación y están rodeadas por una nube de cationes, lo que genera una gran ocupación de espacio; este hecho los hace semejantes a los glucosaminoglucanos de las células animales (véase Figura 19–56). Cuando se añade Ca^{2+} a una solución de moléculas de pectina, éstas se entrecruzan y dan lugar a un gel semirrígido, que es justo lo que sucede cuando se añade pectina a un zumo de fruta para obtener jalea. Ciertas pectinas son especialmente abundantes en la *lámina media*, región central especializada que une las paredes de las células vecinas (véase la Figura 19–79), y se supone que tales puentes de Ca^{2+} contribuyen a mantener unidos entre sí los componentes de la pared celular. Aunque los enlaces covalentes también intervienen en la unión de los diferentes componentes de la pared, se conoce muy poco acerca de su naturaleza. La separación regulada de las células al nivel de la lámina media es el proceso subyacente a la maduración de los tomates o la abscisión (caída) de las hojas en otoño.

Además de las dos redes de polisacáridos que forman casi la totalidad de las paredes celulares primarias de las plantas, existen proteínas que aportan hasta un 5% del peso seco de dichas paredes. Muchas de estas proteínas son las enzimas responsables del reciclaje y la remodelación de la pared, sobre todo durante el crecimiento. Otro tipo de estas proteínas, al igual que la colágena, contiene grandes cantidades de hidroxiprolina. Parece que estas proteínas refuerzan la pared y que, además, se expresan en grandes cantidades como una respuesta local frente al ataque de microorganismos. A partir del genoma de *Arabidopsis* se ha deducido que son más de 700 los genes necesarios para sintetizar, ensamblar y remodelar la pared celular vegetal. En la **Tabla 19–8** se resumen algunos de los principales polímeros que forman parte de las paredes primaria y secundaria.

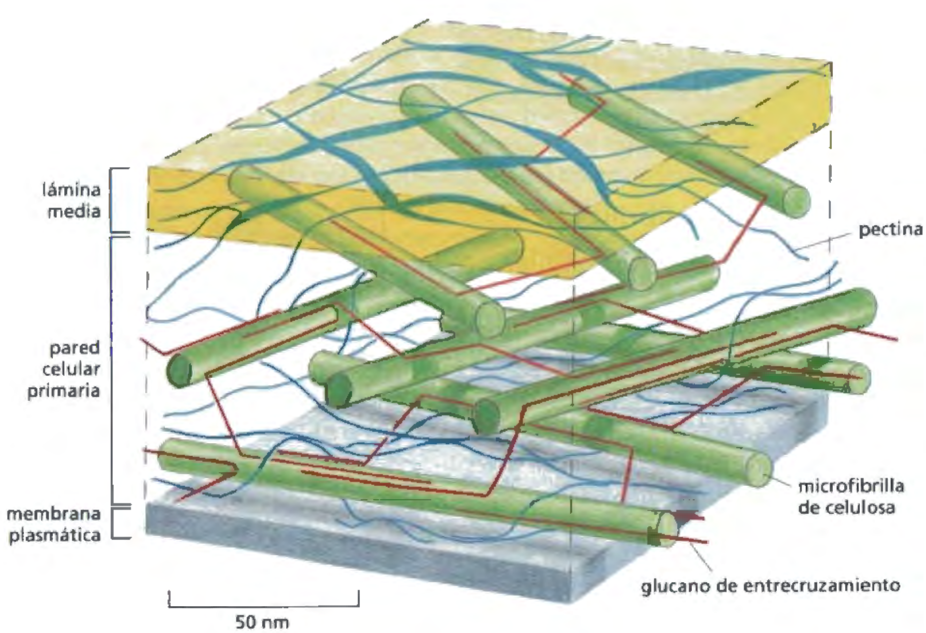


Figura 19–79 Modelo a escala de una porción de pared celular primaria mostrando las dos principales redes de polisacáridos. Las capas de microfibrillas de celulosa ordenadas ortogonalmente (*verde*) forman una red mediante glucanos de entrecruzamiento (*rojo*) que forman enlaces de hidrógeno con las microfibrillas. Esta red es paralela a la de polisacáridos de tipo pectina (*azul*). La red de celulosa y de glucanos de entrecruzamiento absorben las fuerzas de tracción, mientras que la red de pectina es resistente a la compresión. La celulosa, los glucanos de entrecruzamiento y la pectina se presentan a partes iguales en la pared celular primaria. La lámina media es rica en pectina y cementa las células adyacentes.

Tabla 19–8 Polímeros de la pared celular vegetal

POLÍMERO	COMPOSICIÓN	FUNCIONES
Celulosa	polímero lineal de glucosa	las fibrillas confieren resistencia a la tracción a las paredes celulares
Glucanos de entrecruzamiento	xiloglucano, glucuronoarabinoxilano y manano	entrecruzan las fibrillas de celulosa dando lugar a una red resistente
Pectina	homogalacturonanos y ramnogalacturonanos	forman una red hidrofílica cargada negativamente que aporta resistencia a la compresión a las paredes primarias; adhesión célula-célula
Lignina	alcoholes entrecruzados del tipo cumarol, coniferol y sinapol	forman un resistente polímero impermeable que refuerza las paredes secundarias
Proteínas y glucoproteínas	enzimas, proteínas ricas en hidroxiprolina	responsables del reciclaje y remodelado de la pared, así como también participan en la defensa contra patógenos

La deposición orientada de la pared celular controla el crecimiento celular en los vegetales

Cuando la célula vegetal ha salido del meristemo donde ha sido originada, puede crecer más de cien veces su volumen original. La manera como sucede esta expansión es lo que determina la forma final de la célula y, por tanto, la forma de toda la planta. La presión de turgencia dentro de la célula es la que lleva a cabo esta expansión, pero es el comportamiento de la pared celular el que gobierna su dirección y expansión. Para ello, se necesitan complejas actividades de remodelación de la pared y la deposición de nuevos materiales. A causa de su estructura cristalina, las microfibrillas de celulosa de la pared, por sí solas, son incapaces de estirarse o deformarse. Para que la pared celular se estire o se deforme, las microfibrillas tienen que deslizarse unas sobre otras, separarse un poco o ambas cosas. La orientación de las microfibrillas en las capas más internas de la pared gobierna el sentido en la que se expande la célula. Por tanto, las células vegetales anticipan su morfología futura controlando la orientación de las microfibrillas de celulosa que han depositado en la pared (**Figura 19–80**).

A diferencia de lo que ocurre con la mayoría de las macromoléculas matriciales que se sintetizan en el retículo endoplasmático y en el complejo de Golgi, y que posteriormente son secretadas, la celulosa –como el ácido hialurónico en los animales– se alarga desde la superficie celular mediante un complejo enzimático (la celulosa sintasa) que se encuentra anclado de manera integral en la membrana plasmática y que utiliza como sustrato la UDP-glucosa suministrada por el citosol. Cada complejo enzimático, o *roseta*, presenta una sime-

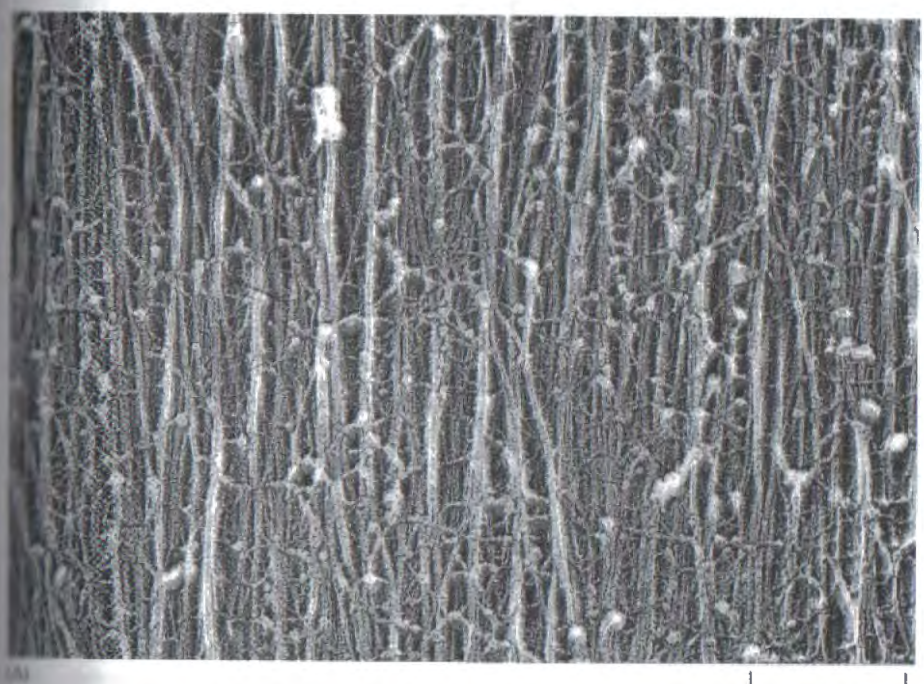
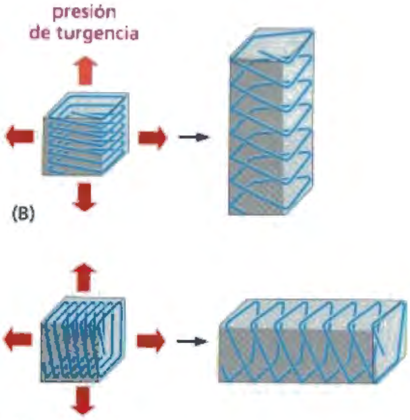


Figura 19–80 Las microfibrillas de celulosa influyen en la dirección de elongación de la célula vegetal. (A) Orientación de las microfibrillas de celulosa en la pared celular primaria de una célula de zanahoria en crecimiento. Esta imagen, obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión, corresponde a una réplica sombreada de una pared celular que fue congelada rápidamente y sublimada en profundidad. Las microfibrillas están unidas entre sí mediante una compleja red de moléculas de matriz (compárese con la Figura 19–79). (B, C) Las células de (B) y (C) parten con una forma idéntica (representadas aquí por cubos) pero con diferente orientación de las microfibrillas de celulosa de sus paredes. Aunque la presión de turgencia es uniforme en todas las direcciones, la debilidad local de la pared celular provoca que cada célula se alargue en una dirección perpendicular a la de la orientación de la capa más interna de las microfibrillas, las cuales tienen una gran resistencia a la tracción. La expansión de la célula tiene lugar de forma coordinada con la inserción de nuevo material de matriz. La forma final de un órgano, como puede ser una raíz, viene determinada por el sentido en el que se expanden las células. (A, por cortesía de Brian Wells y Keith Roberts.)



tría séxtuple y contiene los productos proteicos de tres genes distintos de celulosa sintasa (*CESA*). Cada proteína CESA es esencial para la producción de una microfibrilla de celulosa. Tres genes CESA son necesarios para la síntesis de la pared celular primaria y otros tres para la síntesis de la pared celular secundaria.

A medida que se van sintetizando, las cadenas de celulosa se ensamblan formando microfibrillas, las cuales se prolongan en la superficie de la membrana plasmática y forman una capa o lámina en la que todas las microfibrillas tienen más o menos la misma alineación (Figura 19–79). Cada nueva lámina es depositada en la cara interior de la lámina ya existente, de manera que la pared está constituida por láminas ordenadas concéntricamente, situándose la más antigua en la cara externa. En las células en crecimiento, la mayor parte de las microfibrillas se disponen de manera perpendicular al eje de elongación celular aunque la orientación de las microfibrillas de las láminas externas –que fueron depositadas previamente– sea diferente (Figura 19–80B y C).

Los microtúbulos orientan la deposición de la pared celular

Una pista importante sobre el mecanismo que determina esta orientación fue proporcionada por la observación de los microtúbulos en las células vegetales. En el citoplasma cortical, estos microtúbulos se disponen con la misma orientación que las microfibrillas de celulosa que se depositan en aquella región. Estos microtúbulos corticales constituyen lo que se denomina la *red cortical*, situándose muy próximos a la cara citoplasmática de la membrana plasmática y unidos a ella por proteínas todavía mal caracterizadas (**Figura 19–81**). En muchos tipos y formas de células vegetales se observa una orientación congruente con la red

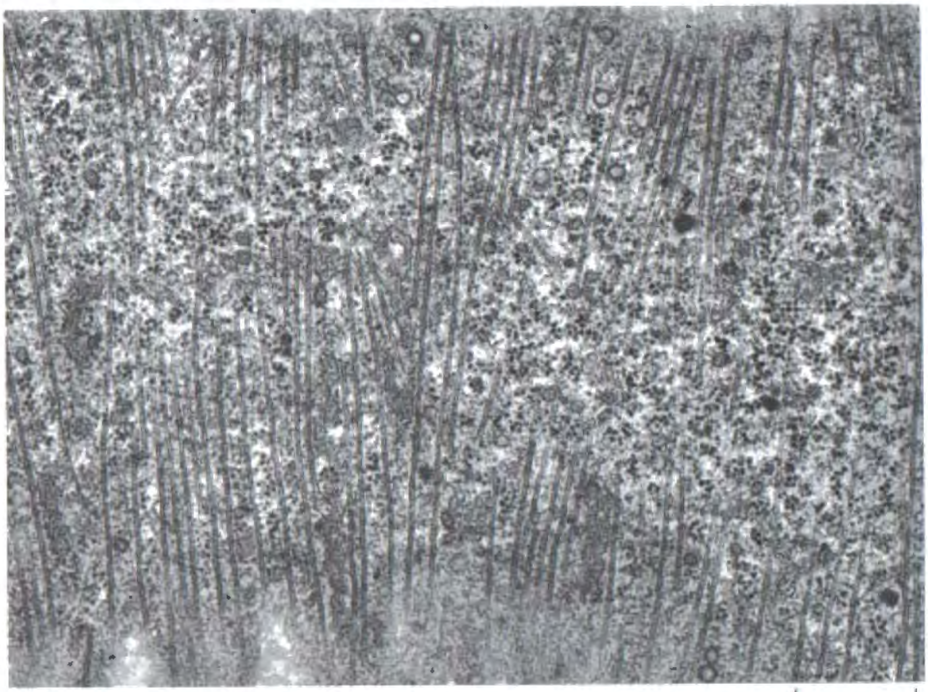




Figura 19–81 Red cortical de microtúbulos en una célula vegetal. (A) Sección de una célula de raíz de heno que muestra un ordenamiento cortical de los microtúbulos localizados justo debajo de la membrana plasmática. Estos microtúbulos están orientados perpendicularmente al eje longitudinal de la célula. (B) Células epiteliales de la punta de la raíz de *Arabidopsis* que han sido marcadas mediante la técnica de inmunofluorescencia, para mostrar la red cortical de microtúbulos en estas células de rápida elongación. El ordenamiento transversal de los microtúbulos corticales está en disposición perpendicular al eje de la elongación de la raíz. (A, por cortesía de Brian Gunning; B y C, cortesía de Keiko Sugimoto-Shirasu.)

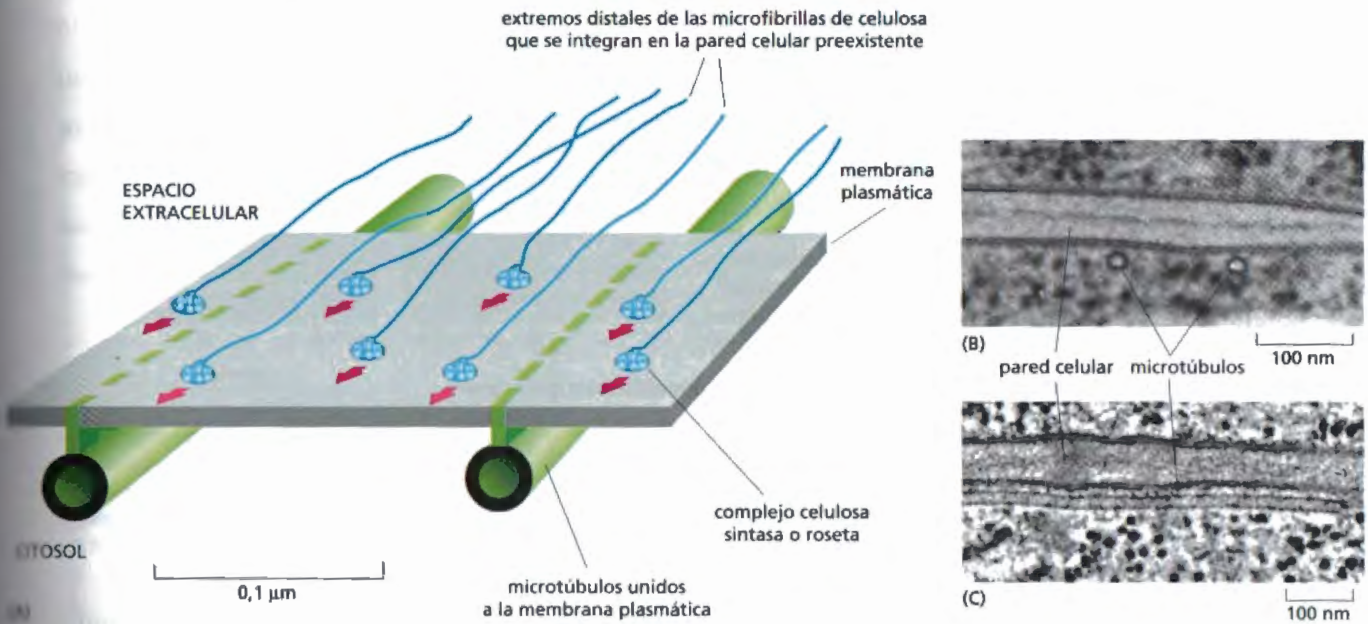


Figura 19–82 Modelo de cómo puede venir determinada la orientación de las microfibrillas de celulosa depositadas *de novo*, por la orientación de los microtúbulos corticales. (A) Los grandes complejos de celulosa sintetasa son proteínas de membrana que continuamente sintetizan microfibrillas de celulosa en la cara externa de la membrana plasmática. Los extremos distales de estas rígidas microfibrillas se integran dentro de la textura de la pared y la elongación de su extremo proximal empuja al complejo sintetasa a lo largo del plano de la membrana. Debido a que la red cortical de microtúbulos está unida a la membrana plasmática asociando este complejo a determinados canales de membrana, la orientación de estos microtúbulos determina el eje a lo largo del que se depositarán las nuevas microfibrillas. (B,C) Dos imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión que muestran la asociación estrecha entre los microtúbulos corticales y la membrana plasmática. Una de ellas muestra los microtúbulos en una sección transversal mientras que la otra muestra una sección longitudinal. En ambas se observa un espacio de unos 20 nm entre la membrana plasmática y los microtúbulos, mientras que las moléculas que los conectan no son distinguibles. (B y C, cortesía de Andrew Staehelin.)

cortical de microtúbulos (situados en la cara interna de la membrana plasmática) y con las microfibrillas de celulosa (en la cara externa), manteniéndose durante la deposición tanto de la pared celular primaria como de la secundaria, lo cual sugiere una relación causal.

Esta relación puede probarse mediante el tratamiento con un fármaco despolimerizador de microtúbulos, el cual disgrega todo el sistema cortical de microtúbulos, pero las consecuencias observadas en este experimento, respecto a la deposición posterior de celulosa, no son tan claras como podría esperarse. El tratamiento con el fármaco no interrumpe la producción de nuevas microfibrillas de celulosa y, en algunos casos, se pueden continuar depositando nuevas microfibrillas siguiendo la orientación preexistente. Sin embargo, cualquier cambio en la orientación de depósito de microfibrillas entre láminas consecutivas está bloqueado. Aparentemente, la orientación de las microfibrillas preexistentes puede propagarse incluso en ausencia de microtúbulos, pero cualquier cambio en la deposición de las microfibrillas de celulosa requiere que existan microtúbulos intactos que determinen la nueva orientación. Estas observaciones son coherentes con el modelo que se propone a continuación. Las rosetas sintetizadoras de celulosa prolongan moléculas de celulosa desde la membrana plasmática. A medida que estas moléculas se sintetizan y autoensamblan formando las microfibrillas, el extremo distal genera indirectamente enlaces cruzados con la capa precedente y orienta las nuevas fibrillas en disposición paralela a las precedentes al mismo tiempo que van quedando integradas en la textura de la pared. Debido a que la microfibrilla es rígida, el creciente extremo proximal de la roseta tiene que desplazarse para que se deposite nuevo material, migrando en el plano de la membrana en un sentido definido por la manera en que el extremo distal de las microfibrillas está anclado a la pared. De esta manera, cada capa tendería a crecer siguiendo la misma orientación que la capa depositada, con las rosetas siguiendo la orientación de las microfibrillas orientadas previamente en el exterior de la célula. Sin embargo, los microtúbulos pueden forzar el cambio de este sentido preestablecido por el que se desplazan las rosetas, al constituir límites en la membrana plasmática que actúan como muros de contención que constriñan el desplazamiento de estas rosetas (Figura 19–82). Desde este punto de vista, la síntesis de celulosa puede tener lugar con independencia de los microtúbulos, pero está determinada espacialmente cuando estos microtúbulos corticales están presentes, ya que definen los microdominios de membrana dentro de los cuales el complejo enzimático puede moverse.

En este sentido, las células vegetales cambian su sentido de elongación mediante un repentino cambio en la orientación de su red cortical de microtúbulos. Puesto que las células vegetales no pueden desplazarse (están limitadas por sus paredes), la morfología de un vegetal pluricelular seguramente depende de un despliegue coordinado, que sigue un estricto patrón, de las orientaciones de estos microtúbulos a lo largo del desarrollo. Se desconoce cómo se regulan estas orientaciones aunque se ha demostrado que pueden reorientarse con rapidez en respuesta a estímulos extracelulares, incluyendo los factores de crecimiento vegetales de bajo peso molecular tales como el etileno y el ácido giberélico (véase la Figura 21–119).

Sin embargo, los microtúbulos no son los únicos elementos del citoesqueleto que influyen en la deposición de la pared. Los focos locales de filamentos corticales de actina pueden dirigir la deposición de nuevos materiales de pared en regiones específicas de la superficie celular, contribuyendo a la elaboración de la forma final de algunas células vegetales diferenciadas, como es el caso de los tricomas foliares y de las células epidérmicas mostradas en la Figura 19–77. Las células que no pueden organizar sus redes corticales de actina, como en el caso de los mutantes *Arp2/3*, pierden su forma característica, tal como se ilustra en la Figura 16–35.

Resumen

Las células vegetales están rodeadas por una rígida matriz extracelular, o pared celular, que es la responsable de la mayoría de las características específicas que exhiben los vegetales. La pared está constituida por resistentes microfibrillas de celulosa y glucanos de entrecruzamiento incluidos en una matriz de polisacáridos de pectina. Por su parte, la lignina se deposita en las paredes secundarias proporcionándoles impermeabilidad, dureza y configuración leñosa. Un sistema cortical de microtúbulos ordenados puede controlar la orientación de las microfibrillas de celulosa que se van depositando, las cuales, a su vez, determinan el sentido en que se expanden las células y, por consiguiente, la forma final de las células y en último término de toda la planta.

PROBLEMAS

¿Qué afirmaciones son ciertas? Explicar por qué si o por qué no

19–1 Dado el gran número de procesos intracelulares que están regulados por cambios en la concentración de Ca^{2+}, parece probable que las adhesiones célula-célula dependientes de Ca^{2+} también estén reguladas por cambios en la concentración de Ca^{2+}.

19–2 Las uniones estrechas ejercen dos funciones diferentes: sellan el espacio entre las células restringiendo el transporte paracelular y forman barreras entre los dominios de membrana previniendo que las proteínas apicales y las basolaterales se mezclen.

19–3 Las integrinas pueden convertir señales mecánicas en señales moleculares.

19–4 La elasticidad de la elastina es debida a su gran cantidad de hélices α, que actúan como muelles moleculares.

Resolver los siguientes problemas

19–5 Comentar la frase que Warren Lewis (uno de los pioneros de la biología celular) escribió en 1922: "Si los diferentes tipos celulares perdiesen su adhesión a otras células y a la matriz extracelular que las sostiene, nuestros cuerpos se desintegrarían y fluirían por el suelo como riachuelos de mezclas de células".

19–6 Las moléculas de adhesión celular fueron identificadas utilizando anticuerpos contra componentes de la superficie celular con el fin de bloquear la agregación celular. En ensayos de bloqueo de adhesión, los científicos creyeron oportuno utilizar fragmentos de anticuerpo formados por una sola región de unión (también denominados fragmentos Fab) en vez de utilizar anticuerpos IgG intactos, es decir, moléculas en forma de Y con dos regiones de unión idénticas. Los fragmentos Fab fueron generados mediante la digestión de anticuerpos IgG por la proteasa papaína para separar las dos regiones de unión (**Figura P19–1**). ¿Por qué es necesario utilizar fragmentos Fab para bloquear la agregación celular?

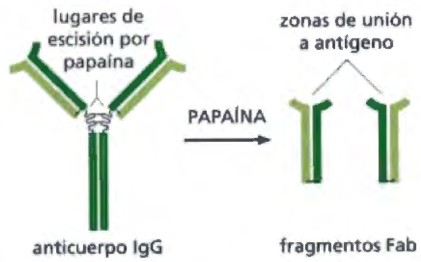


Figura P19–1 Producción de fragmentos Fab a partir de anticuerpos IgG por digestión con papaína (Problema 19–6).

19–7 *Clostridium perfringens*, una bacteria que provoca el e
venenamiento de la comida, sintetiza una toxina que se un
proteínas de la familia de las claudinas, el principal constituye
de las uniones estrechas. Cuando se unen a la claudina, el ext
mo C-terminal de la toxina permite que el extremo N-terminal
inserte a la membrana de la célula adyacente agujereándola y m
tando las células. La región de la toxina que se une a las claudi
se utiliza como reactivo para estudiar las propiedades de las un
nes estrechas. Por otro lado, las células MDCK se suelen util
para estudiar las uniones estrechas, ya que forman una lám
epitelial intacta con alta resistencia transepitelial. Estas célu
expresan dos claudinas: la claudina-1, que no se une a la toxin
la claudina-4, que sí lo hace.

Cuando una de estas láminas epiteliales intactas se incuba
el fragmento C-terminal de la toxina, la claudina-4 desapar
hasta ser indetectable a las 24 horas de tratamiento. En ausen
de claudina-4, las células continúan estando sanas y la lám
epitelial parece mantenerse intacta. El número de cordones
forman las uniones estrechas y que unen las células también
minuye a las 24 horas, pasando de cuatro a dos, y también di
nuye su grado de ramificación. Un estudio funcional de la integ
en las uniones estrechas revela que la resistencia transepit
disminuye en gran medida en presencia de la toxina, pero qu
se retira la toxina, la resistencia se recupera (**Figura P19-**
Curiosamente, la toxina produce estos efectos sólo cuand
añadida en la cara basolateral de la lámina y no tiene efecto c
do se añade en la cara apical (Figura P19–2B).

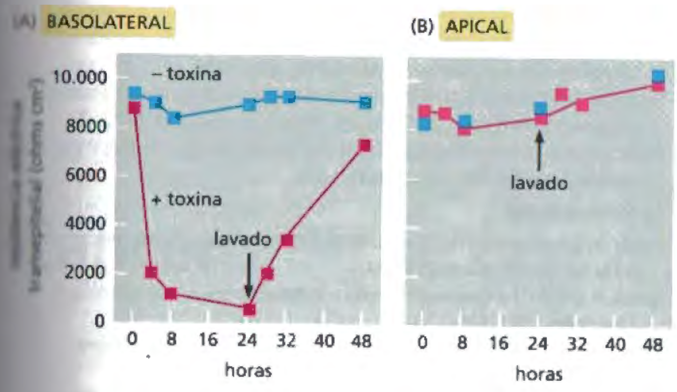


Figura P19–2 Efectos de la toxina de *Clostridium* en la función de barrera de las células MDCK (Problema 19–7). (A) Adición de la toxina en la cara basolateral de la lámina epitelial. (B) Adición de la toxina en la cara apical de la lámina epitelial. Cuanto mayor sea la resistencia (ohms cm^2), menor será la corriente paracelular para un determinado voltaje.

A. ¿Cómo se explica que, a pesar de que desaparezca toda la claudina-4, todavía queden dos cordones de unión estrecha?

B. ¿Cómo provoca el fragmento de toxina la desintegración de los cordones de la unión estrecha?

C. ¿Por qué la toxina sólo hace su efecto cuando se añade a la cara basolateral y no en la cara apical?

19–8 No resulta fácil asignar funciones específicas a cada uno de los componentes de la lámina basal, ya que es una estructura compuesta por un material complejo con propiedades mecánicas y de señalización. Por ejemplo, el nidógeno entrelaza dos componentes principales de la lámina basal mediante la unión de cadenas de laminina-γ1 con colágena de tipo IV. Dado este papel clave, es sorprendente que los ratones mutantes homocigotos para el gen nidógeno-2 sean completamente normales. Sin embargo, los ratones que son homocigotos para una mutación concreta del gen que codifica la laminina-γ1, que elimina la región de unión a nidógeno, mueren al nacer con defectos graves en la formación del pulmón y del riñón. La porción mutante de la cadena de laminina-γ1 no parece tener otra función que la de unir el nidógeno y no altera ni la estructura de la laminina ni su capacidad de unirse a la lámina basal. ¿Cómo explicar el resultado de las alteraciones genéticas resumidas en la **Tabla P19–1**? ¿Qué fenotipo tendrá un ratón doble mutante homocigoto para los dos genes de nidógeno?

19–9 Comentar la siguiente afirmación: "La lámina basal de una fibra muscular actúa como un tablón de anuncios molecular en el que las células contiguas pueden colgar mensajes que dirigen la diferenciación y la función de las células subyacentes".

Tabla P19–1 Fenotipos de ratones con defectos genéticos en componentes de la lámina basal (Problema 19–8).

PROTEÍNA	DEFECTO GENÉTICO	FENOTIPO
nidógeno-1	deleción del gen (–/–)	ninguno
nidógeno-2	deleción del gen (–/–)	ninguno
laminina-γ1	deleción de la región de unión a nidógeno (+/–)	ninguno
laminina-γ1	deleción de la región de unión a nidógeno (–/–)	muerte al nacer

+/– para heterocigotos, –/– para homocigotos.

19–10 La afinidad de las integrinas para los componentes de la matriz puede ser modulada por cambios en sus dominios citoplasmáticos, un proceso conocido como señalización dentro-fuera. Imaginar que se ha identificado una región clave en los dominios citoplasmáticos de la integrina αIIbβ3 que parece ser necesaria para la señalización dentro-fuera (**Figura P19–3**). Si se sustituye la alanina por cada D723 en la cadena β o por cada R995 en la cadena α, se produce una gran activación espontánea en una cadena control, la cual está inactiva en estado normal. Si se convierte el aspartato de la cadena β en una arginina (D723R) y la arginina de la cadena α en un aspartato (R995D) y se compara las tres cadenas α (R995, R995A y R995D) con las tres cadenas β (D723, D723A y D723R), se observa que todas las parejas presentan elevados niveles de activación espontánea excepto D723 con R995 (el control) y D723R con R995D, los cuales presentan niveles bajos de activación. A partir de estos resultados, ¿cómo se mantiene la integrina αIIbβ3 en su estado inactivo?

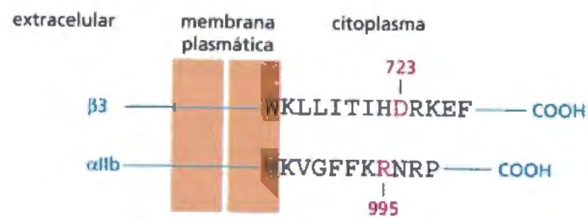


Figura P19–3 Representación esquemática de la integrina αIIbβ3 (Problema 19–10). Los residuos D723 y R995 son idénticos. (De P.E. Hughes et al., *J. Biol.* Chem. 271:6571-6574, 1996. Con permiso de American Society for Biochemistry and Molecular Biology).

19–11 El carboximetil Sephadex es un dextrano entrecruzado de cargas negativas que se utiliza en la purificación de proteínas. Se suministra en forma de cuentas secas que se hinchan mucho cuando se les añade agua. Se construye una columna de cromatografía con un gel de este producto hinchado y, cuando se empieza a calibrar la columna con un tampón que contiene 50 mM de NaCl a un pH neutro, el gel se encoge. ¿Por qué el Sephadex seco se hincha tan drásticamente cuando le añades agua? ¿Por qué este gel hinchado se encoge al añadir una solución salina?

19–12 A la temperatura corporal, el L-aspartato de las proteínas racemiza a D-aspartato a una velocidad apreciable. La mayoría de las proteínas del cuerpo presentan bajos niveles de D-aspartato, si es que son detectables. Sin embargo, la elastina presenta niveles considerables de D-aspartato y, además, este nivel aumenta con la edad del individuo. ¿Por qué la mayoría de las proteínas presentan bajos niveles de D-aspartato mientras que la laminina los tiene altos y son dependientes de la edad?

19–13 Hay un truco para rejuvenecer una lechuga marchita en caso de visitas inesperadas a la hora de la comida. Escoger una de las opciones siguientes: poner la lechuga en remojo en agua salada; en agua azucarada, o debajo de una luz brillante para que la fotosíntesis la reanime.

19–14 La conductividad hidráulica de un solo canal de agua es $4,4 \times 10^{-22}$ m^3 por segundo por MPa (megapascal) de presión. ¿A qué corresponde este valor en términos de moléculas por segundo a presión atmosférica? [La presión atmosférica es 0,1 MPa (1 bar) y la concentración de agua es 55,5 M.]

BIBLIOGRAFÍA

General

Beckerle M (ed) (2002) Cell Adhesion. Oxford: Oxford University Press.

Kreis T & Vale R (ed) (1999) Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins, 2.ª ed. Oxford: Oxford University Press.

Miner JH (ed) (2005) Extracellular Matrix in Development and Disease (Advances in Developmental Biology, Vol 15). Elsevier Science.

Cadherinas y adhesión intercelular

Garrod DR, Merritt AJ & Nie Z (2002) Desmosomal cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 14:537–545.

Gumbiner BM (2005) Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature Rev Mol Cell Biol* 6:622–634.

King N, Hittinger CT & Carroll SB (2003) Evolution of key cell signaling and adhesion protein families predates animal origins. *Science* 301:361–363.

Kowalczyk AP & Reynolds AB (2004) Protecting your tail: regulation of cadherin degradation by p120-catenin. *Curr Opin Cell Biol* 16:522–527.

Nelson WJ & Nusse R (2004) Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303:1483–1487.

Pokutta S & Weis WI (2007) Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Annu Rev Cell Dev Biol*. in press.

Rosen SD (2004) Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol* 22:129–156.

Scheiffele P, Fan J, Choih J, Fetter R & Serafini T (2000) Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101:657–669.

Shapiro L, Love J & Colman DR (2007) Adhesion molecules in the nervous system: structural insights into function and diversity. *Annu Rev Neurosci* 30:451–474.

Sheng M & Hoogenraad CC (2007) The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem* 76:823–847.

Takeichi M (2007) The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nature Rev Neurosci* 8:11–20.

Vestweber D (2002) Regulation of endothelial cell contacts during leukocyte extravasation. *Curr Opin Cell Biol* 14:587–593.

Yamagata M, Sanes JR & Weiner JA (2003) Synaptic adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 15:621–632.

Yang J, Mani SA, Donaher JL et al (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117:927–939.

Uniones estrechas y organización de los epitelios

Furuse M, Hata M, Furuse K et al (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156:1099–1111.

Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K et al (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 171:939–945.

Henrique D & Schweisguth F (2003) Cell polarity: the ups and downs of the Par6/aPKC complex. *Curr Opin Genet Dev* 13:341–350.

Nelson WJ (2003) Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* 422:766–774.

O'Brien LE, Jou TS, Pollack AL et al (2001) Rac1 orientates epithelial apical polarity through effects on basolateral laminin assembly. *Nature Cell Biol* 3:831–838.

Seifert JR & Mlodzik M (2007) Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nature Rev Genet* 8:126–138.

Shin K, Fogg VC & Margolis B (2006) Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:207–236.

Conductos intercelulares: uniones tipo gap y plasmodesmos

Cilia ML & Jackson D (2004) Plasmodesmata form and function. *Curr Opin Cell Biol* 16:500–506.

Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR et al (2002) Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 296:503–507.

Goodenough DA & Paul DL (2003) Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4:285–294.

Segretain D & Falk MM (2004) Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim Biophys Acta* 1662:3–21

Wei CJ, Xu X & Lo CW (2004) Connexins and cell signaling in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:811–838.

La lámina basal

Miner JH & Yurchenco PD (2004) Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:255–284.

Sanes JR. (2003) The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle *J Biol Chem* 278:12601–12604.

Sasaki T, Fassler R & Hohenester E (2004) Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J Cell Biol* 164:959–963.

Yurchenco PD, Amenta PS & Patton BL (2004) Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biol* 22:521–538.

Integrinas y adhesión célula-matriz

Galbraith CG, Yamada KM & Sheetz MP (2002) The relationship between force and focal complex development. *J Cell Biol* 159:695–705.

Hynes RO (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673–687.

Luo BH & Springer TA (2006) Integrin structures and conformational signaling. *Curr Opin Cell Biol* 18:579–586.

Nayal A, Webb DJ & Horwitz AF (2004) Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 16:94–98.

Vogel V & Sheetz M (2006) Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:265–275.

Matriz extracelular de los tejidos conjuntivos animales

Aszodi A, Legate KR, Nakchbandi I & Fassler R (2006) What mouse mutants teach us about extracellular matrix function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:591–621.

Bulow HE & Hobert O (2006) The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:375–407.

Couchman JR (2003) Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nature Rev Mol Cell Biol* 4:926–937.

Hotary KB, Allen ED, Brooks PC et al (2003) Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. *Cell* 114:33–45.

Kielty CM, Sherratt MJ & Shuttleworth CA (2002) Elastic fibres. *J Cell Sci* 115:2817–2828.

Larsen M, Artym VV, Green JA & Yamada KM (2006) The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Curr Opin Cell Biol* 18:463–471.

Lin X (2004) Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development* 131:6009–6021.

Mott JD & Werb Z (2004) Regulation of matrix biology by matrix metalloproteases. *Curr Opin Cell Biol* 16:558–564.

Prockop DJ & Kivirikko KI (1995) Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 64:403–434.

Toole BP (2001) Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 12:79–87.

Pared celular vegetal

Carpita NC & McCann M (2000) The Cell Wall. In Biochemistry and Molecular Biology of Plants (Buchanan BB,Gruissem W & Jones RL eds), pp 52–108. Rockville, MD: ASPB.

Carpita NC, Campbell M & Tierney M (eds) (2001) Plant cell walls. *Plant Mol Biol* 47:1–340. (special issue)

Dhugga KS (2001) Building the wall: genes and enzyme complexes for polysaccharide synthases. *Curr Opin Plant Biol* 4:488–493.

McCann MC & Roberts K (1991) Architecture of the primary cell wall. In The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form (Lloyd CW ed), pp 109–129. London: Academic Press.

Smith LG & Oppenheimer DG (2005) Spatial control of cell expansion by the plant cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:271–295.

Somerville C (2006) Cellulose synthesis in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:53–78.

Cáncer

20

Una de cada cinco personas morirá de cáncer, pero no es esta la razón por la que dedicamos un capítulo a esta enfermedad. Las células cancerosas rompen las reglas más básicas del comportamiento celular mediante las cuales se forman y mantienen los organismos pluricelulares y aprovechan todo tipo de oportunidades para hacerlo. Al estudiar estas transgresiones hemos descubierto cuáles son estas reglas normales y cómo se refuerzan. Así pues, dentro del contexto de la biología celular, el cáncer ha tenido una importancia única; el esfuerzo dedicado a la investigación del cáncer no sólo ha beneficiado al propio tratamiento del cáncer sino también a un área más amplia del conocimiento médico.

El esfuerzo para combatir el cáncer ha conducido a descubrimientos fundamentales en el ámbito de la biología celular. Se han descubierto muchas proteínas debido a que su funcionamiento anormal puede provocar crecimiento incontrolado, tasas de división más grandes, muerte disminuida y otras características aberrantes de las células cancerosas. Entre estas proteínas se incluyen la mayoría de las proteínas que intervienen en la reparación del DNA (Capítulo 5), la señalización celular (Capítulo 15), el ciclo celular, el crecimiento celular (Capítulo 17), la muerte celular programada (apoptosis, Capítulo 18) y la estructuración de los tejidos (Capítulo 19).

En este capítulo, primero se considerará la naturaleza del cáncer describiendo la historia natural de la enfermedad desde el punto de vista celular. En un segundo apartado, trataremos los cambios moleculares que convierten a una célula en cancerosa. Por último, se examinará y valorará de qué forma nuestros conocimientos cada vez mayores acerca de las bases moleculares del cáncer, están conduciendo a nuevos y mejores métodos para la prevención y el tratamiento de la enfermedad.

En este capítulo

EL CÁNCER COMO PROCESO MICROEVOLUTIVO 1205

CAUSAS DEL CÁNCER QUE PODEMOS PREVENIR 1224

DECUBRIMIENTO DE LOS GENES CRÍTICOS DEL CÁNCER 1230

BASES MOLECULARES DEL COMPORTAMIENTO DE LAS CÉLULAS TUMORALES 1241

EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER: PRESENTE Y FUTURO 1256

EL CÁNCER COMO PROCESO MICROEVOLUTIVO

El cuerpo de un animal funciona como una sociedad o ecosistema. Los miembros individuales son células que se reproducen por división celular y que están organizadas en conjuntos de células que colaboran entre sí llamados tejidos. Sin embargo, esta sociedad es muy peculiar puesto que el autosacrificio es la norma. Todos los linajes de células somáticas están condenados a morir: no dejan descendencia y en vez de eso dedican su existencia a sustentar las células germinales que son las únicas que tienen la oportunidad de sobrevivir (descrito en el Capítulo 21). No se trata de ningún misterio, porque el cuerpo es un clon derivado del huevo fecundado y el genoma de las células somáticas es el mismo que el de las células germinales que darán lugar a los espermatozoides o a los óvulos. Por tanto, con su autosacrificio por el bien de las células germinales, las células somáticas facilitan la propagación de copias de sus propios genes.

Así pues, en contraste con las células de vida independiente como las bacterias, que compiten para sobrevivir, las células de un organismo pluricelular están comprometidas a colaborar entre sí. Para coordinar su comportamiento, las células emiten, reciben e interpretan y elaboran conjuntos de señales que actúan a modo de *controles sociales* que, al comunicarse de unas a otras, indican cómo deben actuar (Capítulo 15). El resultado de este comportamiento es que cada célula actúa de una manera socialmente responsable –dividiéndose, manteniéndose quiescente, diferenciándose o muriéndose– en la medida que sea necesario para el bien del organismo. Las alteraciones moleculares que rompan esta armonía pueden suponer un problema para una sociedad pluricelular. En el cuerpo humano, formado por más de 10^{14} células, miles de millones de estas células sufren mutaciones cada día

y rompen potencialmente los controles sociales. Pero lo más peligroso es que una mutación de este tipo puede proporcionar a una célula una ventaja selectiva, permitiendo que se divida más vigorosamente que sus vecinas y convirtiéndose en la fundadora de un clon mutante en crecimiento. Cualquier mutación que origine un comportamiento no altruista de miembros individuales de la cooperativa arriesga el futuro de la totalidad de la empresa. Ciclos repetidos de mutaciones, competición y selección natural actuando dentro de una población de células somáticas provocarán problemas que empeorarán con el tiempo. Estas son las características básicas del cáncer: es una enfermedad en la cual los clones individuales de células mutantes empiezan a prosperar a expensas de sus células vecinas y, finalmente, destruyen la totalidad de la sociedad celular.

En esta sección trataremos del desarrollo del cáncer como un proceso de microevolución. En el hombre este proceso se produce a una escala temporal de años o décadas en una subpoblación de células del organismo. Pero el resultado final depende de los mismos principios de mutación y selección natural que han gobernado la evolución de los organismos vivos durante miles de millones de años.

Las células cancerosas se reproducen sin restricciones y colonizan otros tejidos

Las células cancerosas se caracterizan por dos propiedades hereditarias: (1) se reproducen a pesar de las restricciones normales; (2) invaden y colonizan territorios normalmente reservados a otras células. La combinación de estas dos características es lo que hace que los cánceres sean tan peligrosos. Una célula anormal que crece (aumenta de masa) y prolifera (se divide) más de lo normal, producirá un tumor o *neoplasma* –literalmente nuevo crecimiento. Mientras las células neoplásicas no se convierten en invasoras, se dice que el tumor es **benigno** y en este estadio por lo general se puede conseguir la curación completa extrayendo quirúrgicamente la masa tumoral. Un tumor se considera canceroso sólo si es **maligno**, es decir, si sus células tienen la capacidad de invadir el tejido circundante. La capacidad de invasión es una característica esencial de las células cancerosas. Les permite liberarse del tejido, entrar en el torrente sanguíneo o en los vasos linfáticos y formar tumores secundarios o **metástasis** en otros lugares del cuerpo (**Figura 20–1**). Cuanto más amplia sea la metástasis, más difícil será erradicar el cáncer y son generalmente las metástasis las que matan al paciente de cáncer.

Los cánceres se clasifican de acuerdo con el tejido y con el tipo celular a partir del cual se originan. Los **carcinomas** son los cánceres derivados de las células epiteliales y son, con diferencia, los más frecuentes en las personas; los **sarcomas** son los que derivan de tejido conjuntivo o de fibras musculares. Entre los cánceres que no encajan en ninguna de estas dos amplias categorías se encuentran las diversas formas de **leucemia** y **linfomas**, derivados de las células de la línea blanca sanguínea y de sus precursores (células hematopoyéticas) y también los cánceres derivados del sistema nervioso. La **Figura 20–2** muestra los tipos de cáncer más frecuentes en Estados Unidos, indicando su incidencia y la frecuencia de muertes que producen. Cada una de las categorías tiene muchas subdivisiones según el tipo celular de que se trate, la localización en el cuerpo y la estructura específica del tumor. Muchos de los nombres utilizados están fijados por tradición sin que tengan una base racional moderna.

Paralelamente a la serie de nombres aplicados a los tumores malignos, existe una serie de nombres relacionados con tumores benignos: un *adenoma*, por ejemplo, es un tumor



Figura 20–1 Metástasis. Los tumores malignos normalmente producen metástasis y, en consecuencia, el cáncer es difícil de erradicar. Esta imagen de fusión muestra un escáner de cuerpo entero de un paciente con un linfoma no de Hodgkins metastático (NHL: *non-Hodgkins lymphoma*). La imagen de fondo de los tejidos del organismo fue obtenida mediante rastreo CT (*computed X-ray tomography*; tomografía computerizada de rayos X). Superpuesto a la imagen, un escáner tipo PET (*positron emision tomography*; tomografía de emisión de positrones) que detecta la captación de fluorodesoxiglucosa (FDG) marcada radiactivamente en diversos tejidos y revela el tejido tumoral (*amarillo*). La detección elevada de FDG indica células con captación de glucosa alta y metabolismo elevado, una característica de los tumores. Las manchas amarillas en la región abdominal muestran múltiples metástasis de NHL. (Cortesía de S. Gambhir.)

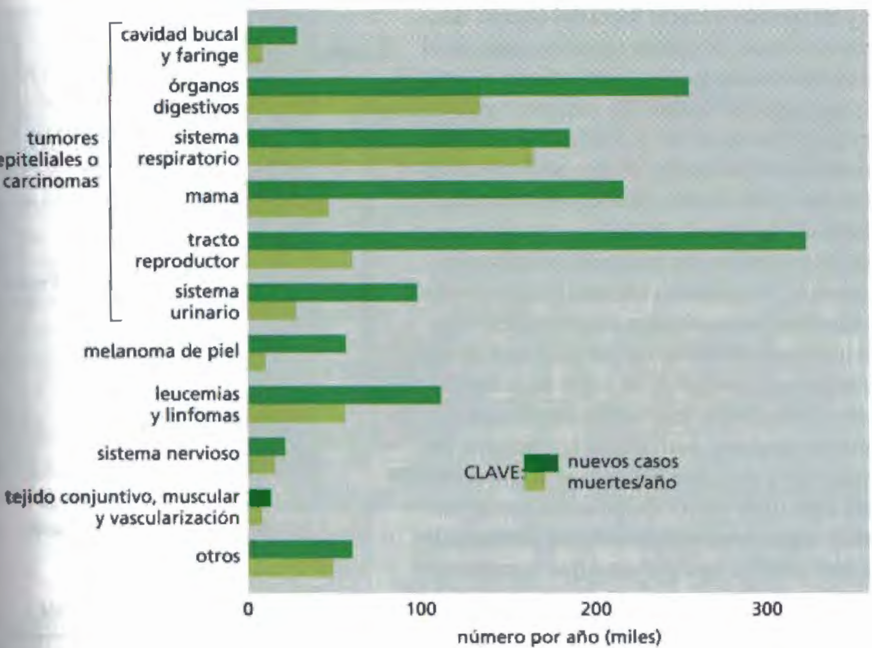


Figura 20–2 Incidencia y mortalidad por cáncer en los Estados Unidos. El número total de nuevos casos diagnosticados en 2004 en Estados Unidos fue de 1.368.030 y se produjeron un total de 563.700 muertes por cáncer. Obsérvese que las muertes reflejan los casos diagnosticados en muchos momentos distintos y que murieron menos de la mitad de las personas que desarrollaron cáncer. Los cinco tipos de cáncer más frecuentes en el mundo son los de pulmón, estómago, mama, colono-rectal y útero (incluido en la figura con el nombre de tracto reproductor). El número total de nuevos casos de cáncer registrados por año está por encima de los 6 millones. Los cánceres de piel que no son melanomas, no se han incluido en el número total de cánceres, ya que la mayoría de ellos se curan fácilmente por lo que muchos no se registran. (Datos de la American Cancer Society, Cancer Facts and Figures, 2004.)

epitelial benigno con una organización glandular, siendo el tipo de tumor maligno correspondiente un *adenocarcinoma* (**Figura 20–3**); de modo parecido, un *condroma* y un *condrosarcoma* son, respectivamente, tumores de cartílago benigno y maligno.

Cada cáncer tiene algunas características que reflejan su origen. Así por ejemplo, las células de un *carcinoma de células basales*, derivadas de una estirpe de células queratinocíticas de piel, por lo general continuarán sintetizando filamentos intermedios de citoqueratina, mientras que las células de un *melanoma*, derivadas de una célula pigmentaria de la piel, a menudo (aunque no siempre) continuarán produciendo gránulos de pigmento. En general los cánceres que se originan a partir de diferentes tipos celulares producen enfermedades muy distintas. El carcinoma de células basales, por ejemplo, sólo es invasivo de forma local y raramente produce metástasis, mientras que el melanoma, si no es extirpado en una etapa temprana, es mucho más maligno y produce con rapidez un número de metástasis mucho mayor (reflejando el comportamiento migratorio de los precursores de las células pigmentarias normales durante el desarrollo, tratado en el Capítulo 22). Por lo general, el carcinoma de células basales se cura por completo mediante cirugía o irradiación local, mientras que el melanoma maligno, una vez ha metastatizado, tiene consecuencias fatales.

La mayoría de cánceres derivan de una sola célula

Incluso cuando el cáncer ha producido metástasis, normalmente puede determinarse su origen a partir de un único **tumor primario**, procedente de un órgano determinado. Se considera que el tumor primario deriva de una sola célula por división celular que al principio ha experimentado un cambio heredable. Por consiguiente, los cambios adicionales se acu-

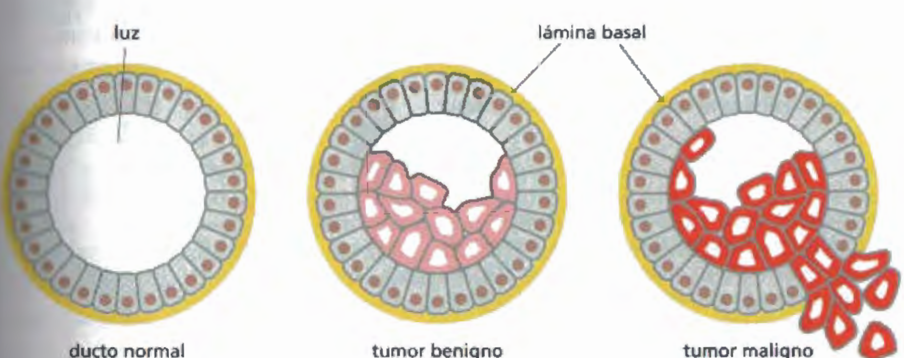


Figura 20–3 Tumores benignos respecto a tumores malignos. Un tumor glandular benigno (adenoma) permanece dentro de la lámina basal que marca el límite de la estructura normal (un ducto en este ejemplo), mientras que un tumor glandular maligno (adenocarcinoma) destruye la integridad del ducto como se muestra en el esquema. Estos tumores pueden adoptar diversas formas.

mulan en algunas de sus células descendientes y les permiten crecer fuera del órgano, dividirse sin control y a menudo sobrevivir más que sus vecinas. Un cáncer típico humano, en el momento de ser detectado, lleva ya muchos años desarrollándose y tendrá más de mil millones de células cancerosas (**Figura 20–4**). Los tumores habitualmente incluyen también una gran variedad de células normales, por ejemplo, fibroblastos en el tejido conjuntivo de sostén que está asociado al carcinoma y también células inflamatorias. ¿Cómo podemos estar seguros de que las células cancerosas son un clon descendiente de una sola célula anormal?

El análisis molecular de los cromosomas de las células tumorales demuestra claramente el origen clónico de estas células. En casi todos los pacientes con *leucemia mieloide crónica* (*CML: chronic myelogenous leukemia*), por ejemplo, los glóbulos blancos leucémicos se distinguen de las células normales por una anormalidad cromosómica característica: el llamado *cromosoma Filadelfia*, originado por una translocación entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 (**Figura 20–5**). Si se clona y se secuencia el DNA del lugar de la translocación, se observa que el lugar de rotura y de nueva unión de los fragmentos translocados es idéntico en todas las células leucémicas de un mismo paciente, pero difiere ligeramente (en varios cientos o miles de pares de bases) de un paciente a otro. Este hallazgo es lo que cabría esperar si y sólo si cada caso de leucemia surgiera a partir de un accidente único que se produjera en una sola célula. Posteriormente veremos cómo estas translocaciones provocan la leucemia dando lugar a un nuevo gen híbrido que codifica una proteína que incrementa la proliferación celular.

Muchas otras evidencias procedentes de una gran variedad de cánceres apuntan a la misma conclusión: la mayoría de tumores se originan a partir de una sola célula anormal (**Figura 20–6**).

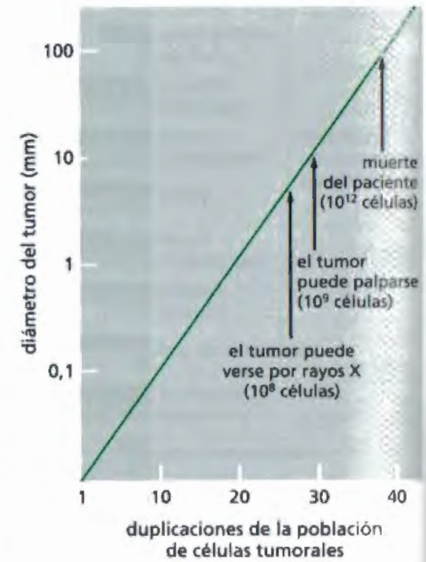


Figura 20–4 Crecimiento de un tumor humano típico, como un tumor de mama. El diámetro del tumor se representa en una escala logarítmica. Pueden transcurrir años antes de que el tumor sea apreciable. El tiempo de duplicación de un tumor de mama típico, por ejemplo, es de aproximadamente 100 días.

Las células cancerosas tienen mutaciones somáticas

Para que una sola célula anormal genere un tumor tiene que transmitir su anormalidad a su descendencia: la anomalía tiene que ser hereditaria. Un primer problema para comprender un cáncer es descubrir si la anomalía hereditaria es debida a un cambio genético –es decir, a una alteración en la secuencia del DNA de la célula– o a un cambio *epigenético* –es decir a un cambio en la pauta de expresión génica sin que exista ningún cambio en la secuencia del DNA. Los cambios epigenéticos se producen durante el desarrollo normal y son responsables de la estabilidad del estado diferenciado, de fenómenos tales como la inactivación del cromosoma X y la impresión genómica (véase Capítulo 7). Como se describirá más adelante, en la actualidad sabemos que los cambios epigenéticos desempeñan un papel importante en el desarrollo de los cánceres.

Pero también es evidente que el desarrollo de un clon de células cancerosas implica cambios genéticos. Las células de muchos cánceres tienen uno o más defectos compartidos en la secuencia de su DNA que las distingue de las células normales circundantes al tumor, como en el ejemplo de la CML mencionada; los avances en el análisis del DNA han permitido identificar estos fallos genéticos en una proporción cada vez mayor de tipos de cáncer. Este hecho corrobora que muchos agentes que provocan el desarrollo del cáncer pueden producir también cambios genéticos. Así pues la **carcinogénesis** (generación del cáncer) parece relacionada con la *mutagénesis* (producción de un cambio en la secuencia del DNA). Esta correlación es clara para dos tipos de agentes: (1) los **carcinógenos químicos** (que causan simples cambios locales en la secuencia de nucleótidos) y (2) las *radiaciones ionizantes*, como los rayos X (que causan roturas de cromosomas y translocaciones) o la luz UV (que induce alteraciones específicas en las bases del DNA). Trataremos estos agentes carcinogénicos con más detalle más adelante.

La conclusión de que el desarrollo del cáncer depende de las mutaciones somáticas deriva de estudios sobre personas que han heredado un defecto genético en alguno de los mecanismos de reparación del DNA, de forma que sus células acumulan mutaciones muy

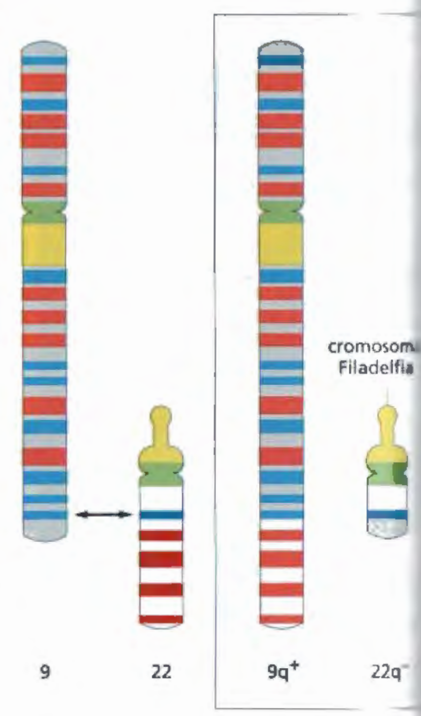
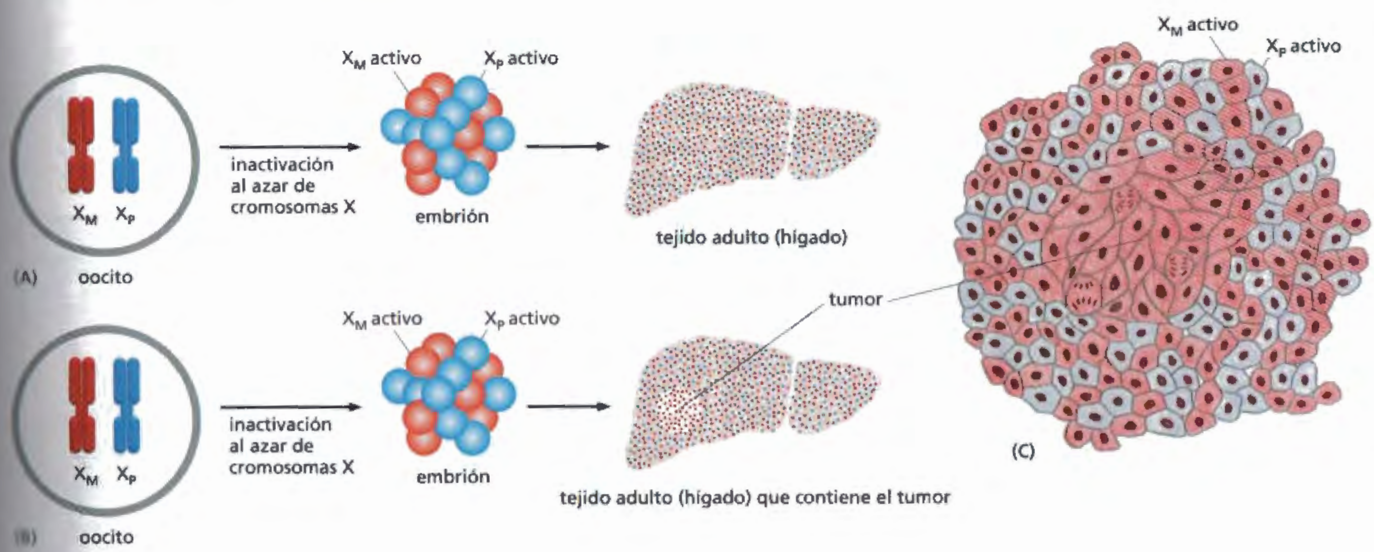


Figura 20–5 Translocación entre los cromosomas 9 y 22, responsable de la leucemia mieloide crónica. A la izquierda se muestran las estructuras normales de los cromosomas 9 y 22. Cuando se produce la translocación entre ellos en el lugar indicado, el resultado es el par de cromosomas anormales de la derecha. El menor de los dos cromosomas anormales resultantes ($22q^{-}$) se denomina cromosoma Filadelfia, nombre de la ciudad donde se registró la anormalidad por primera vez.



rápidamente, mostrando una gran predisposición al desarrollo del cáncer. Las personas afectadas de *xeroderma pigmentosum*, por ejemplo, presentan defectos en el sistema celular que repara el DNA dañado por la luz UV y padecen una mayor incidencia de cáncer de piel. De forma parecida, los ratones que han perdido los genes específicos para reparar el DNA son anormalmente susceptibles al cáncer.

Figura 20–6 Evidencia que demuestra el origen monoclonal de los cánceres, a partir del análisis de mosaicos de inactivación del cromosoma X. (A) Como resultado de un proceso al azar, que se produce en una fase temprana del embrión, prácticamente todos los tejidos normales del cuerpo de una mujer son una mezcla de células que presentan diferente heredabilidad del cromosoma X inactivado (indicada por la mezcla de células *rojas* y células *azules* en el tejido normal). (B) Sin embargo, cuando se determina la expresión de un gen marcador ligado al cromosoma X (una forma específica de la enzima G6PD), por lo general se observa que todas las células de un cáncer tienen el mismo cromosoma X inactivado, como se muestra en (C). Este hecho implica que todas ellas derivan de una sola célula cancerosa inicial.

Una sola mutación no es suficiente para causar cáncer

En el transcurso de una vida normal, en un cuerpo humano se producen unas 10^{16} divisiones celulares; en un ratón, con un número más pequeño de células y un ciclo vital más corto, el número se aproxima a 10^{12}. Incluso en un entorno libre de mutágenos, las mutaciones se producirán espontáneamente con una frecuencia estimada de alrededor de 10^{-6} mutaciones por gen y por división celular; un valor que depende de limitaciones fundamentales en la precisión de la replicación y de la reparación del DNA (véase p. 263). Por lo tanto, en el transcurso de la vida de cualquier ser humano, un gen es susceptible de haber padecido mutaciones unas 10^{10} ocasiones distintas e independientes y en un ratón unas 10^{6} ocasiones. Entre las células mutantes resultantes cabe esperar que muchas de ellas presenten alteraciones en genes relacionados con la regulación del crecimiento y de la división celular y que, por lo tanto, no obedezcan las restricciones normales sobre la proliferación celular. Desde este punto de vista, el problema no es por qué se produce el cáncer, si no por qué se produce con tan poca frecuencia.

Evidentemente, si una sola mutación fuera suficiente para convertir una célula sana normal en una célula tumoral que prolifera sin restricción, no seríamos organismos viables. Diversas evidencias indican que en realidad la génesis de un cáncer requiere que en una misma célula se produzcan varios accidentes independientes y extraños. Una indicación de este tipo procede de estudios epidemiológicos sobre la incidencia de cáncer en función de la edad (**Figura 20–7**). Si fuera suficiente una sola mutación que se produjera con una probabilidad fija por año, la probabilidad de desarrollar cáncer en cualquier año dado debería ser independiente de la edad. Sin embargo, en la mayoría de tipos de cánceres la incidencia se incrementa abruptamente con la edad, como sería de esperar si el cáncer se produce por una acumulación lenta de numerosas mutaciones al azar en una sola línea de células.

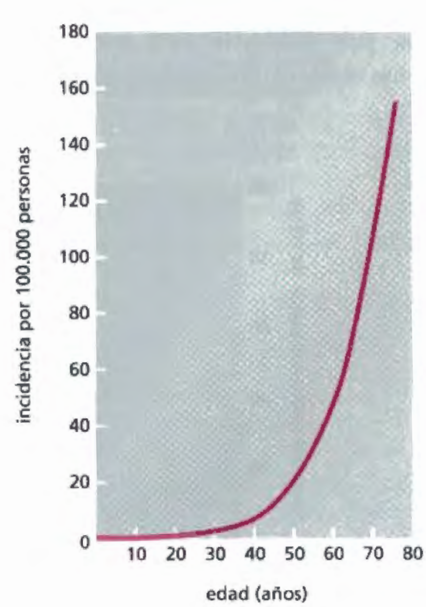


Figura 20–7 Incidencia de cáncer en función de la edad. El número de nuevos casos de cáncer de colon diagnosticados en un año en mujeres en Inglaterra y Gales, se expresa en función de la edad del diagnóstico y en relación al número total de individuos en cada grupo de edad. La incidencia de cáncer aumenta de forma súbita en función de la edad. Si una sola mutación fuese suficiente para desencadenar el cáncer y esta mutación tuviera la misma probabilidad de ocurrir en cualquier momento, la incidencia debería ser independiente de la edad. (Datos de C. Muir et al., Cancer Incidence in Five Continents, Vol. V. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1987.)

Ahora que han sido identificadas la mayoría de las mutaciones específicas responsables del desarrollo del cáncer, podemos analizar de forma directa su presencia en el genoma de cada tipo particular de célula tumoral. Tales análisis han revelado que por lo general una célula maligna acumula varias mutaciones. Los modelos animales también confirman que una sola alteración genética no es suficiente para causar cáncer: cuando se han introducido genes mutantes en animales transgénicos, la enfermedad sólo aparece después de un periodo estacionario de meses en un conjunto pequeño y esparcido de células del organismo y esto implica que para que se desarrolle un cáncer tienen que producirse otros acontecimientos genéticos. Además, los ratones transgénicos con mutaciones en más de un gen crítico para el cáncer desarrollarán cáncer más rápidamente que los ratones con una sola mutación; este hecho demuestra que sucesos genéticos múltiples en una sola célula pueden cooperar entre sí promoviendo el crecimiento de la célula cancerosa y el desarrollo de un tumor.

Los cánceres se desarrollan gradualmente a partir de un número creciente de células aberrantes

En el caso de los cánceres que tienen una causa externa identificable, la enfermedad no se convierte en aparente hasta que ha transcurrido un largo periodo de tiempo desde la exposición inicial al agente causal. La incidencia del cáncer de pulmón, por ejemplo, no empieza a aumentar rápidamente hasta 20 años después de fumar con intensidad. De forma parecida, la incidencia de leucemias en Hiroshima y Nagasaki no aumentó de forma significativa hasta unos 5 años después de la explosión de las bombas atómicas y los trabajadores industriales expuestos durante un periodo limitado a agentes cancerígenos químicos no desarrollan los cánceres característicos de su ocupación hasta 10, 20 o incluso más años después de la exposición (**Figura 20–8**). Durante este largo periodo de incubación, las presuntas células cancerosas sufren cambios genéticos y epigenéticos sucesivos. Algo similar sucede con los cánceres cuya lesión genética inicial no tiene una causa externa tan clara.

El concepto de que el desarrollo de un cáncer necesita de una acumulación gradual de mutaciones en varios genes –un número diferente para los distintos cánceres pero habitualmente al menos cinco– ayuda a comprender el conocido fenómeno de la **progresión tumoral**, en el cuál un leve desorden inicial del comportamiento celular evoluciona de manera gradual hasta un cáncer totalmente destructivo. La leucemia mieloide crónica proporciona un ejemplo claro al respecto. Esta enfermedad empieza como un trastorno caracterizado por una sobreproducción no letal de glóbulos blancos y continúa así durante varios años hasta que se convierte en una enfermedad de progresión mucho más rápida, que general finaliza a los pocos meses, con la muerte. En la fase crónica temprana, las células leucémicas del cuerpo sólo se distinguen porque presentan la translocación de cromosomas (el cromosoma Filadelfia) mencionada, aunque pueden existir otros cambios genéticos y epigenéticos menos visibles. En la siguiente fase aguda de la enfermedad, el sistema hematopoyético (el fabricante de la sangre) queda invadido por células que no sólo muestran esta translocación sino también otras anormalidades cromosómicas. Parece como si las células del clon mutante inicial hubiesen sufrido más mutaciones que les permitieran proliferar más rápido (o dividirse más veces antes de diferenciarse o morir), de forma que llegan a ex-

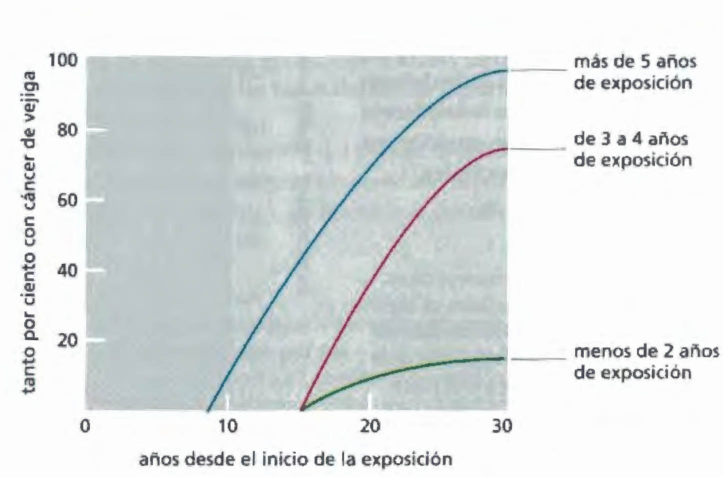


Figura 20–8 Retraso de la aparición de cáncer tras la exposición a un agente cancerígeno. La gráfica muestra el retraso de la aparición del cáncer de vejiga en una serie de 78 trabajadores de la industria química desde que fueron expuestos al carcinógeno 2-naftilamina, agrupados según la duración de su exposición. (Modificado de J. Cairns, Cancer: Science and Society. San Francisco: Freeman, 1978. Según M.H.C. Williams, en Cancer, Vol. III [R.W. Raven, ed.]. London: Butterworth Heinemann, 1958.)

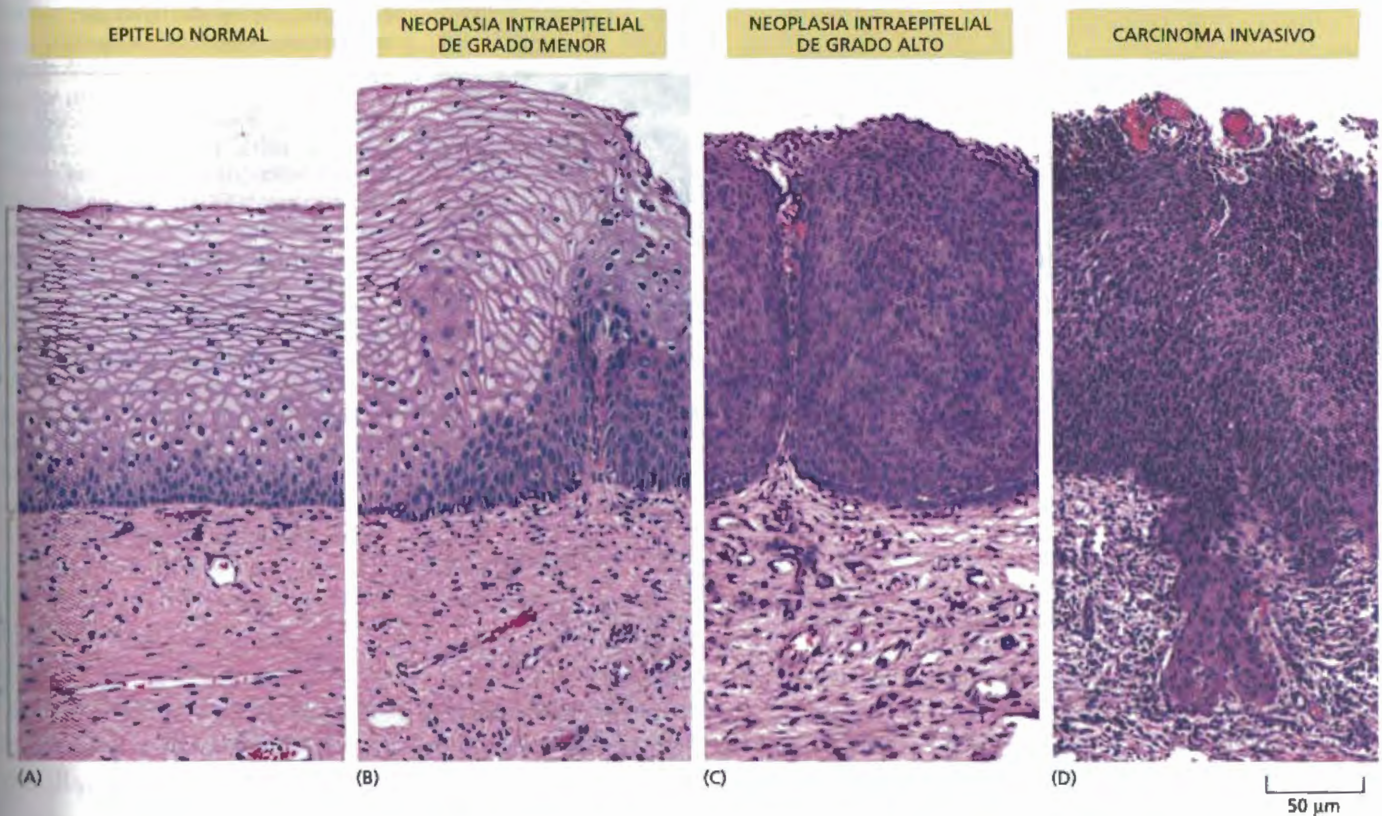


Figura 20–9 Etapas de progresión en el desarrollo de cáncer en el epitelio del cuello uterino. (A) En el epitelio escamoso pluriestratificado normal, las células en división están confinadas en la capa basal. (B) En las neoplasias intraepiteliales de grado menor, las células en división se pueden encontrar en la tercera parte inferior del epitelio; las células superficiales todavía son alargadas y muestran signos de diferenciación, aunque es incompleta. (C) En la neoplasia intraepitelial de grado alto, las células proliferan en todas las capas del epitelio y no muestran signos de diferenciación. (D) La verdadera malignidad empieza cuando las células atraviesan o destruyen la lámina basal e invaden el tejido conjuntivo circundante. (Fotografías por cortesía de Andrew J. Connolly.)

ceder en número a las hematopoyéticas normales e incluso a sus parientes que sólo tenían la translocación cromosómica primaria.

Parece que los carcinomas y otros tumores sólidos evolucionan de forma parecida. Aunque en el hombre la mayoría de estos cánceres no son diagnosticados hasta una fase relativamente tardía, en algunos casos es posible observar las primeras etapas del desarrollo de la enfermedad. Los cánceres de *cérvix uterino* (el cuello del útero) son un ejemplo de estos últimos, debido al cribado rutinario de este cáncer mediante raspado cervical.

La detección precoz evita los cánceres cervicales

El epitelio que recubre el cérvix está organizado inicialmente como un epitelio escamoso estratificado (en múltiples capas) (**Figura 20–9**A) parecido en estructura a la epidermis de la piel (véase Figura 23–3). En estos epitelios estratificados, la proliferación se produce en la lámina basal, generando células que se desplazan hacia la superficie exterior, diferenciándose a lo largo de este desplazamiento en células aplanadas ricas en queratina que no se dividen y que finalmente se descaman en la superficie. Cuando se examinan muestras de epitelio cervical de distintas mujeres, no es extraño encontrar placas en las cuales la organización está alterada de forma que sugiere el inicio de una transformación cancerosa. Los patólogos describen estos cambios como *neoplasia intraepitelial* y las clasifican como de grado bajo (benignas) o de grado alto (de moderadas a graves).

En las lesiones benignas, las células en división no diferenciadas no están confinadas en la lámina basal sino que ocupan otras capas en el tercio inferior del epitelio; aunque el proceso de diferenciación se produce en las capas epiteliales superiores, está ligeramente alterado (Figura 20–9B). La mayoría de estas lesiones remiten de forma espontánea, pero un pequeño número de ellas (cerca del 10%) se convierten en lesiones de grado alto en las cuales, la mayoría de capas epiteliales o todas ellas están ocupadas por células indiferenciadas que se dividen continuamente, presentando por lo general tamaños y formas altamente variables. Con frecuencia se observan figuras mitóticas anormales y, a menudo, el *cariotipo* (imagen de la totalidad de los cromosomas) también es defectuoso. Sin embargo, las células anormales todavía están confinadas en el lado epitelial de la lámina basal (Figura 20–9C). En este estadio, la enfermedad es de fácil curación si se destruye o elimina mediante cirugía el tejido anormal. Afortunadamente, la presencia de este tipo de lesiones puede detectarse

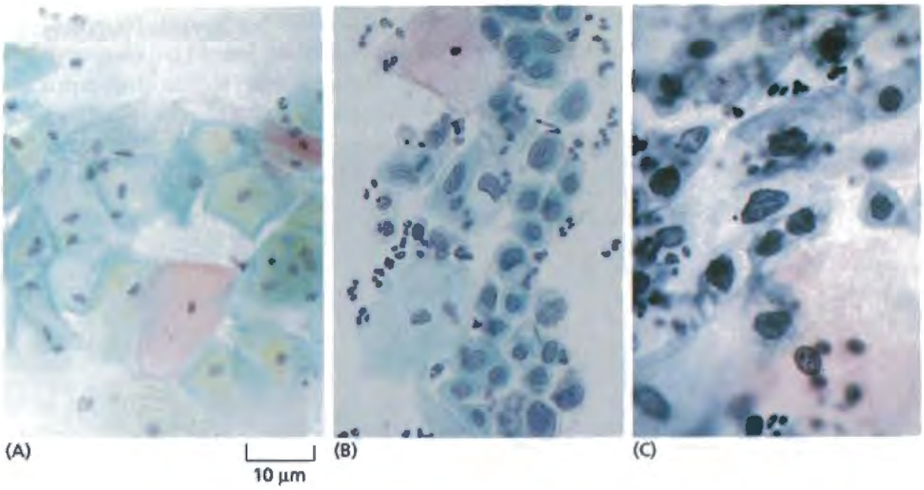


Figura 20–10 Fotografías de células recogidas por raspado de la superficie del cuello uterino (técnica de Papanicolaou o "Pap smear"). (A) Normal: las células son grandes y bien diferenciadas, con núcleos muy condensados. (B) Lesión precancerosa: la diferenciación y la proliferación son anormales pero la lesión todavía no es invasiva; las células están en distintas etapas de diferenciación, algunas de ellas bastante inmaduras. (C) Carcinoma invasivo: todas las células aparecen indiferenciadas, con escaso citoplasma y núcleo relativamente grande; entre los restos acompañantes hay algunas células sanguíneas blancas. (Cortesía Winifred Gray.)

raspando una muestra de células de la superficie y observándolas al microscopio (técnica de "frotis de Papanicolau"; **Figura 20–10**), salvándose así muchas vidas.

Sin tratamiento, el tejido anormal puede persistir sin progresar o incluso entrar en regresión de forma espontánea. Sin embargo, en al menos un 30-40% de los casos progresa originando al cabo de algunos años un carcinoma cervical invasivo (véase Figura 20–9D): las células cancerosas destruyen y cruzan la lámina basal, invadiendo el tejido subyacente, y provocan metástasis a través de los vasos linfáticos. La curación mediante cirugía se vuelve progresivamente más difícil a medida que el crecimiento invasivo se va extendiendo.

La progresión de los tumores implica rondas sucesivas de mutación y selección natural

A partir de todas las evidencias parece que los cánceres surgen por un proceso en el cual una población inicial de células ligeramente anormales, descendientes de una sola célula mutante, evoluciona de mal en peor a través de ciclos sucesivos de mutaciones al azar seguidos de selección natural. En cada etapa, una de las células adquiere una mutación adicional o un cambio epigenético que le proporciona una ventaja selectiva sobre sus vecinas, capacitándola para sobrevivir mejor en el entorno que, en el interior del tumor, puede ser muy duro, con niveles muy bajos de oxígeno, escasos nutrientes y las barreras naturales al crecimiento que presentan los tejidos normales circundantes. La descendencia de esta célula tan bien adaptada continuará dividiéndose, a menudo formando el tumor y convirtiéndose en el clon dominante en la lesión en desarrollo (**Figura 20–11**). Los tumores crecen a empujones mientras los ventajosos cambios heredados van apareciendo y las células que los sufren, prosperan. La progresión tumoral implica un gran componente de azar y por lo general requiere muchos años, de forma que la mayoría de nosotros morirá por otras causas y no de cáncer.

¿Por qué son necesarias tantas mutaciones? Claramente, los animales más grandes han tenido que desarrollar un conjunto muy complejo de mecanismos reguladores para controlar a sus células. Sin estos múltiples controles, los errores inevitables en el mantenimiento de las secuencias de DNA producirían numerosos tumores en una etapa muy temprana de la vida y rápidamente los grandes organismos pluricelulares serían destruidos. Así pues, no debería sorprendernos que las células utilicen mecanismos reguladores múltiples para man-

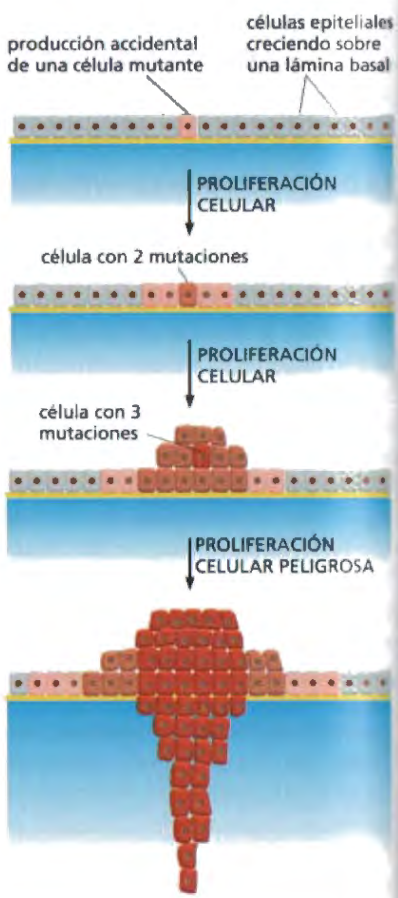


Figura 20–11 Evolución clonal. En este esquema, un tumor se desarrolla a través de sucesivas rondas de mutación y proliferación, originando un clon de células cancerosas totalmente malignas. En cada etapa, una de las células sufre una mutación que o incrementa su capacidad de proliferación o disminuye la muerte celular, de forma que sus descendientes se convierten en el clon dominante del tumor. La proliferación de cada clon acelera el paso siguiente en la progresión tumoral e incrementa el tamaño de la población de riesgo que puede sufrir una mutación adicional. La última etapa mostrada es la invasión a través de la lámina basal, la primera etapa de la metástasis. En realidad, existen más etapas que las tres mostradas; en ellas están implicados una combinación de cambios genéticos y epigenéticos.

tener un control preciso de su comportamiento y deben alterarse muchos mecanismos distintos para que una célula pueda salir de sus restricciones normales y comportarse como una célula cancerosa maligna. Las restricciones son de distintos tipos y las células tumorales encuentran nuevas barreras para su posterior expansión en cada una de las etapas de su evolución. Por ejemplo, el oxígeno y los nutrientes no son limitantes hasta que el tumor alcanza uno o dos milímetros de diámetro, momento en el cual las células del interior del tumor dejan de tener el acceso adecuado a sus necesidades. Las células tienen que adquirir mutaciones adicionales, cambios epigenéticos (o ambos) para superar cada nueva barrera, ya sea física o fisiológica.

En general, esperaríamos que la tasa de evolución en cualquier población de organismos de la tierra dependiera principalmente de cuatro parámetros: (1) la *tasa de mutación*, es decir, la probabilidad por gen y por unidad de tiempo de que un miembro determinado de la población sufra un cambio genético; (2) el *número de individuos* con capacidad reproductiva dentro de la población; (3) la *tasa de reproducción*, es decir, el número medio de generaciones de cada progenie producidas por unidad de tiempo, y (4) la *ventaja selectiva* de la que disfrutan los individuos mutantes con éxito, es decir, la proporción entre el número de supervivientes fértiles que se producen por unidad de tiempo y el número de supervivientes fértiles producidos por los individuos no mutantes.

Estos mismos factores son cruciales para la evolución de las células cancerosas en un organismo pluricelular, excepto que tanto los cambios genéticos como los epigenéticos dirigirán el proceso evolutivo.

Los cambios epigenéticos que se acumulan en las células cancerosas incluyen estructuras heredadas de cromatina y metilaciones en el DNA

Como se acaba de afirmar, la progresión hacia un cáncer se diferencia de la evolución biológica normal en un aspecto importante: se producen cambios epigenéticos que proporcionarán a las células una ventaja selectiva.

Durante muchos años, los patólogos han utilizado el aspecto anormal del núcleo celular para identificar y clasificar a las células cancerosas en las biopsias tumorales. Por ejemplo, algunas veces las células cancerosas poseen una cantidad muy grande y nada común de heterocromatina, una forma condensada de la cromatina en interfase que silencia los genes (véase p. 238). En la actualidad, se conocen algunos de los mecanismos moleculares implicados en la formación de esta cromatina y es posible asociar la formación de nueva heterocromatina con el silenciamiento epigenético específico de genes que de otra forma bloquearían la progresión tumoral.

La formación y el mantenimiento de la heterocromatina implica modificaciones covalentes específicas de las histonas; esto a su vez, atrae complejos de cromatina-proteínas que se mantienen de forma estable después de la replicación del DNA (descrito en el Capítulo 4). De esta forma, los genes pueden ser desviados de forma que se hereden de célula a célula sin ningún cambio en la secuencia de DNA. Esta forma epigenética de regulación génica desempeña un papel importante en la creación del patrón ordenado de especializaciones celulares que se produce durante el desarrollo embrionario (tratado en el Capítulo 22). Los errores que se produzcan en este proceso son potencialmente peligrosos porque pueden transmitirse a la progenie de la célula en la que se ha producido el cambio original.

Ahora sabemos que muchas de las mutaciones que hacen que una célula sea cancerosa alteran proteínas que determinan estructuras de la cromatina. Entre ellas se encuentran no sólo enzimas que modifican las histonas de los nucleosomas sino también proteínas del complejo "lector-escritor del código" que interpretan el código de las histonas (véase la Figura 4–43). Estos hechos constituyen una sólida evidencia de la importancia que tienen los cambios epigenéticos basados en la cromatina sobre la progresión de los tumores.

Durante los procesos normales del desarrollo, un patrón heredado de metilación de DNA refuerza muchos de los acontecimientos de silenciamiento de genes provocados por el empaquetamiento de los genes en la heterocromatina (véase p. 467). Los análisis revelan que en genes concretos también se producen una gran cantidad de metilaciones de DNA durante la progresión tumoral. En resumen, aunque reconocido de forma relativamente reciente, parece que el silenciamiento epigenético anormal de genes no es menos importante que las mutaciones en las secuencias de DNA para el desarrollo de la mayoría de cánceres (**Figura 20–12**).

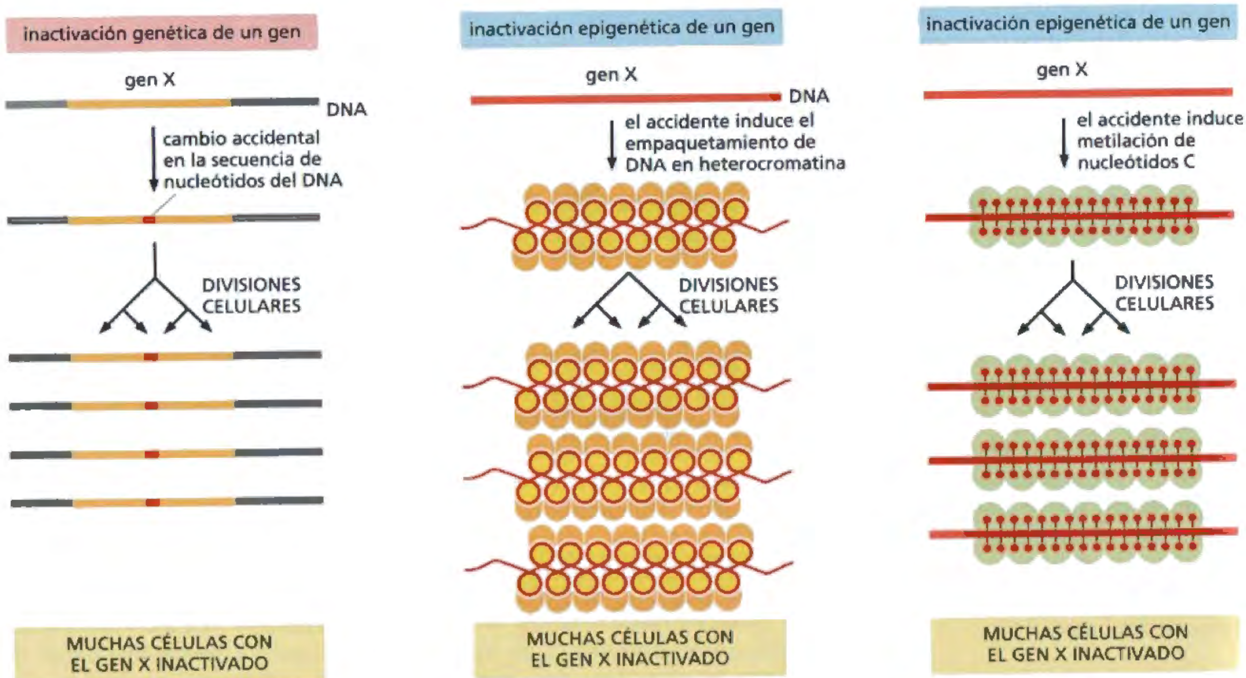


Figura 20-12 Comparación entre los cambios genéticos y epigenéticos observados en los tumores. Una mutación es el resultado de un cambio irreversible en la secuencia del DNA. Al contrario que estos cambios genéticos, los cambios epigenéticos se basan en alteraciones que, aunque se heredan de una célula a otra, pueden revertir mediante cambios en lugares específicos en la modificación de las histonas (vía de la heterocromatina) o mediante desmetilaciones de DNA en lugares específicos (vía de metilación). Puesto que las marcas epigenéticas en los genes revierten por lo general durante la formación de los oocitos y de los espermatozoides, no se heredan entre generaciones y no han podido ser estudiadas ampliamente por los genetistas.

Como se describió en el Capítulo 7, parece que la metilación del DNA (un patrón hereditario de metilación de nucleótidos C en las secuencias CpG) es un mecanismo utilizado para silenciar de forma permanente genes que ya han sido parados; la metilación de DNA parece ser un mecanismo de silenciamiento que normalmente sigue a la formación de heterocromatina. Pero la desregulación que se produce durante la progresión tumoral puede producir un silenciamiento génico independiente de la heterocromatinización, como se ilustra de forma esquemática.

Las células cancerosas humanas son genéticamente inestables

La mayoría de las células cancerosas humanas acumulan cambios genéticos a una velocidad sumamente elevada y se dice que son **genéticamente inestables**. Esta inestabilidad supone diferentes aspectos. Algunas células tumorales son incapaces de reparar el DNA dañado o de corregir errores de replicación de diversos tipos. Estas células acumulan más mutaciones puntuales u otros cambios en las secuencias de DNA que las células normales. Otras células tumorales no pueden mantener el número o la integridad de sus cromosomas de forma que acumulan grandes anormalidades en su cariotipo que son visibles durante el proceso de mitosis (**Figura 20-13**). La inestabilidad genética se ve amplificada cuando algunos de los cambios en el DNA alteran los mecanismos epigenéticos de control de forma que se producen cantidades extra de heterocromatina y de metilaciones de DNA. Además, los cambios epigenéticos por sí mismos, que aparecen de forma accidental e independiente de los cambios genéticos que los preceden, también pueden conducir –al menos en principio– a desestabilizar los patrones de herencia celular, facilitando otros cambios ya sea a nivel genético o epigenético. Desde un punto de vista evolutivo, ninguno de estos cambios tendría que sorprendernos: cualquier cambio que aumente la probabilidad de que los cambios producidos al azar en la función de un gen sean heredables de una generación celular a la siguiente, contribuirá a que un clon de células evolucione hacia la malignidad.

Aunque los cambios epigenéticos en las células tumorales no han sido analizados por completo, se conocen bastantes detalles de los cambios genéticos. Tumores distintos –incluso de los mismos tejidos– pueden tener distintos tipos de inestabilidad genética, provocados por alteraciones heredables en cualquiera del gran número de *genes* llamados *de mantenimiento del DNA*, implicados en la propagación del DNA o de los cromosomas. Es raro que una persona herede una mutación en uno de estos genes, pero los individuos que las heredan presentan una mayor incidencia de cáncer, lo que confirma que la pérdida de estabilidad genética puede provocar cáncer. Generalmente estas mutaciones desestabilizadoras no son hereditarias sino que aparecen *de novo* en el clon de células en el que se desarrolla el tumor y colaboran a que la célula cancerosa vaya acumulando mutaciones mucho más rápidamente que sus vecinas. Análisis recientes muestran que las células de una gran variedad de tumores humanos experimentan sustituciones sencillas de nucleótidos en una proporción que es de 10 a 20 veces más alta que la observada en las células normales. La secuenciación de más de 10.000 genes en un conjunto de tumores de mama y colono-rectales muestra que las células tumorales han acumulado suficientes mutaciones para provocar el cambio de un aminoácido en proteínas de unos 100 genes distintos. La mayoría de ellos son cambios al azar que afectan genes distintos en distintos tumores individuales. Pero existe un grupo de genes que se encuentran mutados de forma repetida en un tipo particular de

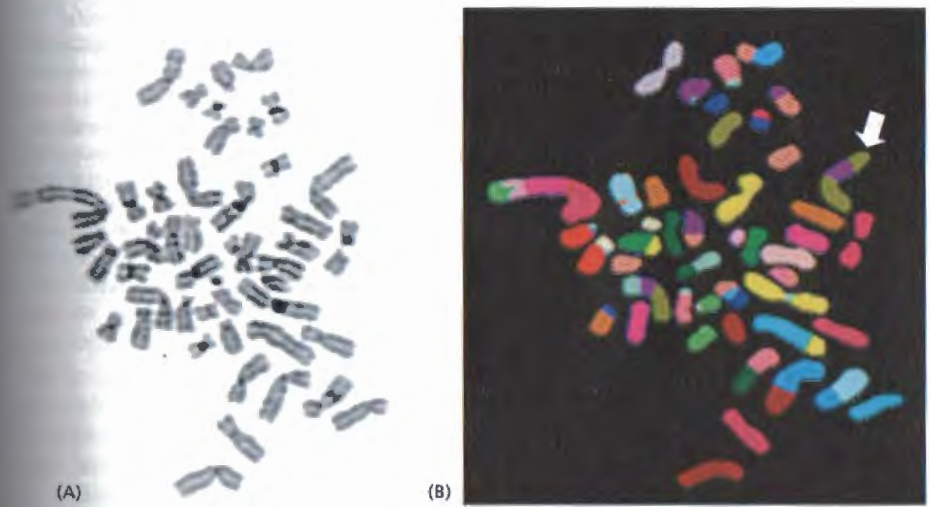


Figura 20–13 Cromosomas procedentes de un tumor mamario que muestran anormalidades en cuanto a número y estructura. Los cromosomas fueron preparados a partir de las células en metafase de un tumor de mama. Se extendieron en un portaobjetos y se marcaron con un colorante general de DNA (A) o con una combinación de marcadores fluorescentes que dan un color distinto a cada cromosoma normal humano. El marcaje (mostrado en color falso) muestra múltiples translocaciones incluyendo un cromosoma con translocación doble (*flecha blanca*) formado por dos piezas del cromosoma 8 (*marrón*) y una pieza del 17 (*púrpura*). El cariotipo está formado por 48 cromosomas en vez de los 46 normales. (Cortesía de Joanne Davidson y Paul Edwards.)

cáncer, lo que sugiere que estas alteraciones en más de 20 genes son necesarias para la progresión tumoral.

La inestabilidad genética por sí sola no da a la célula ninguna ventaja selectiva. Parece que existe un nivel óptimo de inestabilidad genética para el desarrollo del cáncer, transformando la célula lo suficiente como para que evolucione peligrosamente pero no para que muera. Para que una célula inestable genéticamente pueda ser favorecida por la selección natural tiene que adquirir propiedades que le confieran alguna ventaja competitiva.

A menudo el crecimiento del cáncer depende de un control defectuoso de la muerte celular, de la diferenciación celular o de ambas cosas

De la misma forma que la probabilidad de la progresión del cáncer aumenta con una tasa de mutación elevada, también aumenta con cualquier circunstancia que suponga un incremento del número de células con capacidad de mutación. Por ejemplo, las persona con obesidad clínica tiene un riesgo más alto de contraer muchos tipos de cáncer que las personas que tiene un peso normal; este hecho se supone que es debido al aumento tanto del número de células del cuerpo como a la velocidad a la que estas células se dividen cuando están nutridas o estimuladas en exceso por los factores de crecimiento. El mismo principio se aplica tanto al inicio del cáncer como a su progresión: cuanto mayor sea el clon de células mutantes formado a partir de una mutación primaria, mayor será la probabilidad de que una de sus células sufra una mutación adicional o un cambio epigenético que permita progresar al cáncer. Así pues, en cada etapa del desarrollo de un cáncer, cualquier condición que facilite el aumento del número de las células alteradas favorecerá la progresión del tumor.

Una mutación temprana o un cambio epigenético pueden tener este efecto al aumentar la velocidad a la que prolifera el clon de células. Sin embargo, estos cambios no son los únicos –ni necesariamente los más importantes– mecanismos para aumentar el número de células. En los tejidos normales adultos, en especial aquellos que tienen un riesgo de cáncer, las células proliferan continuamente; pero su número permanece estable puesto que la producción celular está equilibrada por una pérdida celular y este proceso forma parte de los mecanismos de control homeostático del organismo. La muerte celular programada mediante *apoptosis* tiene un papel esencial en este equilibrio, tal como se trata en los Capítulos 18 y 23. Si se generan demasiadas células, la tasa de apoptosis aumenta disminuyendo esta superproducción. Una de las propiedades más importantes de muchas células cancerosas es que han perdido la capacidad de sufrir apoptosis en condiciones en las que una célula normal lo haría. Este fenómeno contribuye en gran medida al crecimiento del tumor (**Figura 20–14**).

Los cambios hereditarios también pueden aumentar el tamaño de un clon de células mutantes alterando su capacidad para diferenciarse, como se ilustró con la situación del cérvix uterino descrito anteriormente. Cuando se divide una célula progenitora (madre o *stem*) de la lámina basal, cada una de las células hijas debe escoger entre permanecer como célula progenitora o comprometerse hacia una vía que la conducirá hasta la diferenciación; las cé-

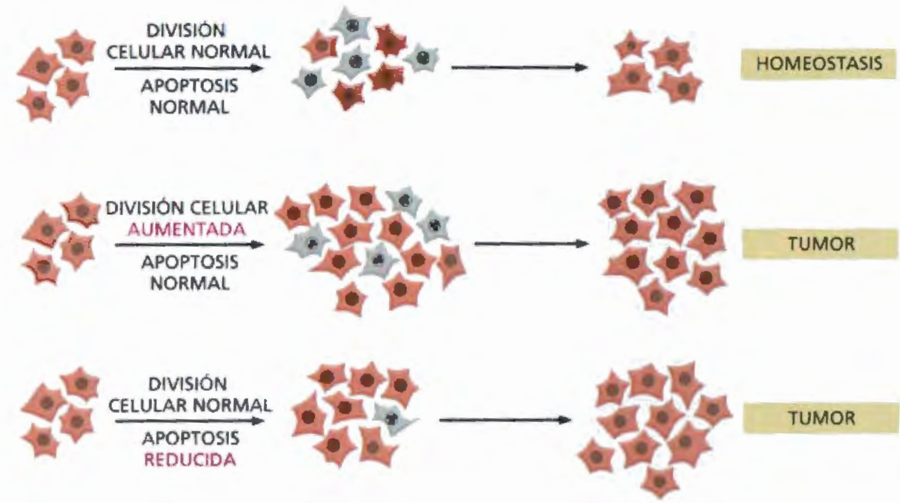


Figura 20–14 Tanto una división celular aumentada como una apoptosis reducid pueden contribuir a la génesis de tumore En los tejidos normales, la apoptosis equilibra la división celular manteniendo la homeostasis. <GCCC> Durante el desarroll de un cáncer, tanto un aumento en la divis celular como una inhibición de la apoptosi pueden conducir a un aumento en el núm de células, importante para la formación d tumores. Las células condenadas a sufrir apoptosis se muestran en *gris*.

lulas comprometidas se dividen y luego paran de dividirse y se diferencian de forma terminal (las células proliferantes comprometidas se llaman *células amplificadoras transitorias*). Si el programa de diferenciación se bloquea en alguna de las etapas, las células proliferantes se acumulan, contribuyendo a la progresión desde una neoplasia de cérvix intraepitelial de bajo grado hasta una neoplasia intraepitelial de grado alto y a un cáncer maligno (véase Figura 20–9). Consideraciones similares a ésta pueden aplicarse al desarrollo de cáncer en otros tejidos que dependan de células madre, como la piel, el revestimiento del intestino y el sistema hematopoyético. Por ejemplo, parece que algunos tipos de leucemia aparecen por una disfunción del programa normal de diferenciación, de tal forma que un determinado progenitor de un tipo particular de célula sanguínea continúa dividiéndose de forma indefinida en lugar de diferenciarse terminalmente en la forma normal, después de un número limitado de ciclos de división (como se describe en el Capítulo 23).

Así pues, la acumulación de mutaciones y de cambios epigenéticos que comportan errores en los controles normales de división celular, apoptosis y diferenciación contribuyen al desarrollo y progresión de los cánceres.

Las células cancerosas presentan alteraciones en sus respuestas al daño en el DNA y a otras formas de estrés

La mayoría de células normales dejan de dividirse de forma permanente cuando se diferencian en células especializadas. Sin embargo, la diferenciación no es la única razón por la cual una célula proliferante parará de dividirse; también pueden hacerlo respondiendo al estrés o a daños en su DNA. Como describimos en el Capítulo 17, las células normales disponen de un conjunto de *puntos de control* que paran el ciclo celular temporalmente cuando algo va mal, dejando un tiempo para que el problema sea corregido. La ruptura de cromosomas y otros tipos de daño en el DNA generan señales intracelulares que activan estos puntos de control; una célula normal se para dentro del ciclo celular y permite así reparar el daño antes que avance a lo largo del ciclo y se divida. Si el daño es irreparable, una célula normal se retirará de forma permanente del ciclo celular o se "suicidará" mediante apoptosis antes que originar células hijas con un genoma dañado.

Las células cancerosas a menudo adquieren mutaciones y cambios epigenéticos que inactivan estas respuestas al daño en el DNA. Desde el punto de vista de la célula cancerosa, la pérdida de estas restricciones le da ventaja, ya que le permite continuar multiplicándose incluso con el DNA dañado. Al mismo tiempo, esto acelera la velocidad de acumulación de mutaciones en la población tumoral y pueden favorecer la progresión hacia una malignidad más elevada. Las células cancerosas también son defectuosas en otros puntos de control que regulan el ciclo celular. Así pues, dudarán en avanzar a lo largo del ciclo cuando las condiciones no son favorables lo cual les genera daños genéticos que aumentan las anormalidades cromosómicas que a menudo ya tienen. Aunque estas células dañadas genéticamente a menudo tardan más tiempo en completar un ciclo celular que una célula normal, se acumulan a lo largo del tiempo porque tienen una mayor predisposición a proliferar. Es remarcable cómo estas células compiten con sus vecinas normales siendo tan desorganizadas.

Las células cancerosas humanas escapan a la autolimitación de la proliferación celular

Muchas células humanas normales tienen una autolimitación en el número de veces que pueden dividirse cuando son estimuladas a proliferar en cultivo: paran de dividirse después de un cierto número de duplicaciones (p. ej., entre 25 y 50 para los fibroblastos humanos. Este fenómeno se denomina **senescencia de la replicación celular** (descrito en el Capítulo 17). Este mecanismo depende generalmente del progresivo acortamiento de los telómeros en los extremos de los cromosomas, que cambia su estructura. Como se analizó en el Capítulo 5, la replicación del DNA del telómero durante la fase S depende de la enzima **telomerasa**, que mantiene la secuencia especial de DNA telomérico y promueve la formación de estructuras proteicas que forman un casquete y protegen los extremos de los cromosomas. Puesto que la mayoría de células proliferantes humanas (aunque no las células progenitoras) son deficientes en la telomerasa, sus telómeros se acortan en cada división y su casquete protector se deteriora. Finalmente, los extremos alterados de los cromosomas conducen a una parada del ciclo celular permanente.

Este mecanismo de contaje de duplicaciones que acabamos de describir establece un límite fisiológico para la proliferación celular de la mayoría de tipos celulares del organismo. Las células cancerosas humanas tienen que evitar o superar esta barrera para formar los grandes tumores. Por el contrario, algunas células de roedores mantienen la actividad telomerasa y los telómeros normales mientras proliferan y entonces carecen de esta barrera. Se ha propuesto que los humanos necesitan de la senescencia de la replicación celular para impedir el cáncer porque, en comparación con el ratón, existen numerosas oportunidades en nuestra larga vida para la progresión tumoral.

Las células cancerosas humanas evitan la senescencia de la replicación celular de dos formas. En primer lugar, adquieren cambios genéticos y epigenéticos que les permiten superar los puntos de control de forma que continúan a lo largo del ciclo incluso con los telómeros desprotegidos. Las mutaciones que inactivan la vía de p53 tienen este efecto y son muy comunes en la mayoría de células cancerosas, como describiremos más adelante. Como estrategia alternativa para escapar a la senescencia replicativa, las células cancerosas a menudo mantienen una actividad telomerasa mientras proliferan y, por lo tanto, sus telómeros no se acortan ni pierden el casquete. En algunos casos, las células cancerosas pueden mantener su actividad telomerasa porque el cáncer se originó en células progenitoras que tenían esta actividad. En otros casos, aunque el cáncer se originó en células que no presentaban una actividad telomerasa apreciable, las células cancerosas han adquirido esta actividad como resultado de un cambio genético o epigenético que fue seleccionado mientras se acortaban sus telómeros. Incluso otras células cancerosas desarrollan mecanismos alternativos para alargar los extremos de los cromosomas. Independientemente de la estrategia utilizada, el resultado es que las células cancerosas continúan proliferando en condiciones en las que las células normales habrían parado de dividirse.

Una pequeña población de células progenitoras tumorales mantiene la mayoría de tumores

Como se explicará en el Capítulo 23, en un linaje de células adultas normales con un recambio celular importante, como el linaje celular hematopoyético, las células están organizadas en una jerarquía: las pocas células progenitoras se dividen con lentitud y producen células (las células amplificadoras transitorias) que proliferan extensamente y por último se diferencian en las células especializadas características de linaje. Las células progenitoras mantienen el linaje mediante la generación de células hijas que se mantienen como células progenitoras (un proceso conocido como *autorrenovación*) y producen otras que se comprometen hacia la vía que las conducirá a diferenciarse. Existen cada vez más evidencias de que la mayoría de cánceres se organizan de la misma forma jerárquica, con pocas **células madre progenitoras** en la cima de la jerarquía responsables de mantener la población total de células que forman el tumor. Estas células progenitoras están capacitadas para autorrenovarse de forma indefinida, pero también pueden derivar hacia células amplificadoras transitorias de división rápida que tienen una capacidad limitada para autorrenovarse. Tan sólo recientemente se ha reconocido de forma general que estas células con un potencial de crecimiento limitado son las que forman la inmensa mayoría de células de muchos cánceres.

Desde hace más de cuarenta años se sabe que existe una probabilidad muy pequeña -generalmente menor al 1%- de que una célula individual escogida al azar de un cáncer sea capaz de generar un nuevo tumor cuando se ensaya su capacidad para producirlo, por ejemplo, mediante su implantación en un ratón inmunosuprimido. Los avances tecnológicos en separación de células han permitido observar que en la mayoría de casos esto se produce porque las células cancerosas son heterogéneas, y sólo una proporción muy pequeña presenta esta propiedad especial. Una forma de enriquecer la pequeña población de células cancerosas supuestamente progenitoras de algunos cánceres es utilizar un marcador fluorescente permeable y un separador celular que se activa mediante fluorescencia (véase Figura 8–2). Cuando una suspensión celular preparada a partir de un tejido normal se expone al marcador y se separa de esta forma, a menudo las células progenitoras del tejido se encuentran enriquecidas en una pequeña *población localizada lateralmente* compuesta por células débilmente fluorescentes. Las células progenitoras son sólo débilmente fluorescentes porque tienen un transportador ABC (descrito en el Capítulo 11) en su membrana plasmática que bombea de forma activa el marcador hacia el exterior celular.

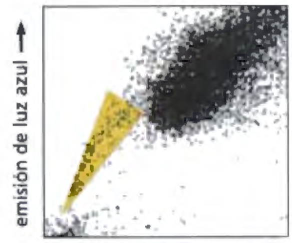


Figura 20–15 La separación celular revela las células progenitoras celulares en una pequeña población lateral de células. En este ejemplo, las células de una línea celular obtenidas a partir de un glioma de rata se trataron con un marcador que puede pasar a través de la membrana plasmática (Hoechst 33342) y fueron analizadas mediante separación celular. Cerca del 0,4% de las células bombearon el colorante hacia el exterior y se marcaron sólo ligeramente, como se indica en *amarillo*. Experimentos comparando esta población lateral (SP: *side population*) de células con el resto de la población, mostraron que sólo en esta población celular lateral las células podían proliferar de forma extensa y formar tumores. Además, mientras que las células SP producían tanto células SP como células no SP, las células no SP no podían producir células SP. (Adaptado de T. Kondo, T. Setoguchi y T. Taga, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:781-786, 2004. Con la autorización de National Academy of Sciences.)

Cuando se han analizado alguno cánceres de la misma forma, se ha encontrado que una pequeña población situada lateralmente con transportador ABC, contiene, sino todas, la mayoría de células capaces de formar nuevos cánceres después de ser transplantadas en ratones inmunodeficientes. Es interesante que este sea también el caso de algunas líneas celulares tumorales que han sido propagadas en cultivo celular durante más de treinta años: mientras que la población lateral de cada una de estas líneas forma tumores fácilmente después de un trasplante, la población restante muy fluorescente, que incluye la inmensa mayoría de células de la línea, no puede formarlos (**Figura 20–15**). Además, cuando esta población lateral aislada a partir de la línea celular se devuelve al cultivo, reaparece con rapidez una pequeña población lateral que se mantiene de forma indefinida, mientras que este hecho no se produce a partir de las células remanentes en el cultivo.

En otros estudios, el fraccionamiento celular utilizando anticuerpos monoclonales que reconocen las células progenitoras normales del tejido de origen del cáncer ha proporcionado resultados parecidos.

¿Cómo aparecen las células progenitoras del cáncer?

El descubrimiento de que muchos cánceres se mantienen gracias a una pequeña población de células progenitoras tumorales tiene implicaciones muy importantes, tanto para la comprensión del cáncer como para su tratamiento, y genera un número importante de preguntas inquietantes. ¿Cómo aparecen estas células progenitoras? ¿Cuál es la naturaleza de estas células progenitoras, y qué las distingue, en términos moleculares, de la mayoría de células del tumor? A partir de los resultados que acabamos de describir con las líneas celulares tumorales en cultivo, la mayoría de estas diferencias son el resultado de cambios epigenéticos y no de cambios genéticos.

Está claro que en algunos tumores, el cáncer se origina en las células progenitoras del tejido normal, que acumulan progresivamente las mutaciones y los cambios epigenéticos responsables del comportamiento anormal del cáncer. Por ejemplo, esta secuencia de acontecimientos es la forma en la que aparecen las leucemias mielógenas crónicas. Así pues, cuando las células progenitoras hematopoyéticas pluripotenciales (véase p. 1456) son purificadas a partir de las médulas óseas de estos pacientes, la mayoría de células presentan el cromosoma Filadelfia, con la translocación característica de este tumor. De la misma forma, muchos cánceres humanos se forman a partir de células progenitoras normales, porque son las responsables de formar el epitelio que sufre un recambio celular importante. En estos tejidos, sólo permanecen en el organismo las células progenitoras y proliferan durante el tiempo suficiente para acumular el número de mutaciones necesario para desarrollar un cáncer.

La segunda forma de aparición de células progenitoras tumorales es a través de un cambio en una célula proliferante que presenta una mayor diferenciación, como una célula amplificadora transitoria. Los cambios deben proporcionarle las dos propiedades cruciales de las células progenitoras: la capacidad de mantenerse en el organismo, y la capacidad de autorrenovarse de forma indefinida. Entonces, y sólo entonces, la célula alterada tendrá el tiempo suficiente para acumular otras mutaciones y cambios epigenéticos necesarios para convertirse en una célula tumoral totalmente destructora. Algunas leucemias de linfocitos B, por ejemplo, parece que surgen de esta forma. Todas las células de la leucemia presentan el mismo tipo de reorganizaciones genéticas en los genes de sus anticuerpos (descrito en el

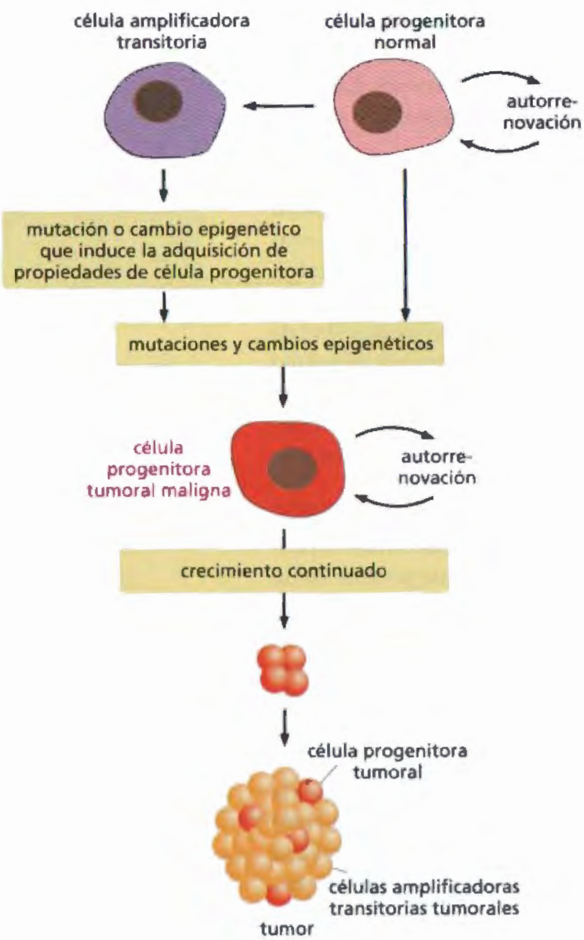


Figura 20–16 Los cánceres pueden aparecer a partir de células progenitoras tumorales. Las células progenitoras tumorales se definen como las células de un cáncer que pueden autorrenovarse produciendo más células progenitoras malignas y al mismo tiempo generar células no formadoras de tumores, como las células amplificadoras transitorias. Las células progenitoras tumorales pueden formarse a partir de células progenitoras normales que han sufrido mutaciones que las han transformado en cancerosas, o a partir de células más diferenciadas que han sufrido mutaciones o cambios epigéneticos que les han proporcionado las características de las células progenitoras.

Capítulo 25), lo que sugiere que el cáncer se originó en una célula precursora de linfocitos B comprometida en la diferenciación, y no en una célula progenitora sin diferenciar. Así pues, parece que la mayoría de tumores humanos surgen a partir de una célula progenitora y otros a partir de células que han adquirido la capacidad de autorrenovación continuada a través de mutaciones, cambios epigenéticos o de ambos (**Figura 20–16**).

La mayoría de terapias habituales para el tratamiento del cáncer como la radiación o la quimioterapia matan sobre todo a las células cancerosas que proliferan más rápidamente en el tumor. Puesto que las células progenitoras del cáncer se dividen más lentamente, serán menos sensibles a estos tratamientos. Además, en la década de 1970, se propuso que la evolución habría seleccionado mecanismos para evitar la acumulación de mutaciones en las células progenitoras. En particular, puesto que la mayoría de mutaciones surgen durante la replicación del DNA, ¿podría cada división de una célula progenitora utilizar un mecanismo especial que permitiera a la cadena de DNA vieja de cada cromosoma ser segregada en una célula hija que se mantendrá como célula progenitora? Experimentos recientes sugieren que las células progenitoras, y sólo las células progenitoras, pueden coordinar la segregación de los cromosomas de esta forma (véase Figura 23–16). Si este es también el caso de las células progenitoras tumorales, les podría proporcionar una resistencia poco común a la mayoría de tratamientos que eliminarían a las otras células.

Si no se eliminan las células progenitoras tumorales, el cáncer reaparecerá. Ésta puede ser una de las razones por la cual con frecuencia los tumores recidivan después de un periodo inicial de respuesta importante a la terapia. Para curar el cáncer, es crucial encontrar nuevas terapias dirigidas hacia la eliminación de las células progenitoras.

Para producir metástasis, las células cancerosas malignas tienen que sobrevivir y proliferar en un ambiente adverso

La metástasis es el aspecto más temido –y menos comprendido– del cáncer y es el responsable del 90% de las muertes asociadas con esta enfermedad. Cuando un cáncer se ha exten-

dido por el cuerpo es casi imposible de erradicar mediante cirugía o irradiación localizada. La metástasis es, en sí misma, un proceso multisecuencial: las células tumorales invaden el tejido local y los vasos sanguíneos, y establecen nuevas colonias en sitios distantes. Cada una de estas etapas es un proceso complejo y los mecanismos moleculares implicados en ellas todavía no son totalmente conocidos.

Para que una célula cancerosa pueda producir metástasis, tiene que eliminar las restricciones que mantienen a las células normales en sus localizaciones adecuadas e impiden que invadan los tejidos circundantes. Esta capacidad de invasión es una de las propiedades que definen a los tumores malignos, que muestran un patrón desorganizado de crecimiento y bordes desiguales con prolongaciones hacia el tejido circundante (véase, p. ej., Figura 20–9). Aunque los cambios moleculares no se conocen totalmente, la capacidad de invasión requiere de la interrupción de los mecanismos adhesivos que hacen que las células normales se mantengan unidas a sus vecinas más próximas y a la matriz extracelular. Como describiremos más adelante, este cambio para los carcinomas se parece a la *transición epitelio-mesénquima* (*EMT: epithelial-to-mesenchymal transition*), que se produce en algunos tejidos epiteliales durante su desarrollo normal (véase Figura 19–12).

La siguiente etapa del proceso de metástasis –el establecimiento de colonias en tejidos más distantes– es una operación compleja, lenta y poco eficiente; muy pocas células lo consiguen. Antes de que pueda metastatizar con éxito, la célula tumoral tiene que penetrar en un vaso sanguíneo o en un vaso linfático atravesando la lámina basal y el revestimiento lineal de células endoteliales que tapizan el vaso, y entrar en la sangre o en la linfa; salir de la circulación en otro lugar del organismo y crecer en el nuevo lugar, formando un pequeño grupo de células conocido como micrometástasis. Para completar el proceso de metástasis, algunas de estas micrometástasis tienen que producir células que sobrevivan y proliferen abundantemente en el nuevo ambiente, un proceso difícil conocido como colonización (**Figura 20–17**).

La vascularización que crece en el interior de un tumor es débil y parece que la mayoría de células del tumor consiguen escapar y entrar en los vasos linfáticos o sanguíneos. Sin embargo, los experimentos demuestran que sólo una pequeña proporción de células, menos de una de cada mil, quizás una entre millones, sobrevive formando algo más que micrometástasis. La mayoría de tumores se diagnostican antes de que hayan conseguido formar colonias metastásicas y pueden curarse si se elimina el tumor primario.

Aunque en principio es posible que cada célula tumoral que entre en la circulación tenga la misma probabilidad de sobrevivir, establecerse y crecer en un lugar ajeno, en realidad no es así. La baja tasa de colonización refleja el escaso número de células que presentan las capacidades especiales necesarias para ello. Es decir, que muy pocas células de la población del tumor tendrán el carácter progenitor que les permite dividirse sin restricciones y la capacidad para establecerse y sobrevivir en un ambiente extraño. Esta baja cantidad de células progenitoras tumorales explicaría por qué tan pocas células consiguen llegar a colonizar incluso después de formar micrometástasis.

La necesidad de disponer de capacidades de supervivencia especiales es otra restricción añadida. Las células normales dependen de señales de supervivencia extracelulares que son relativamente abundantes en su entorno normal; cuando estas señales son eliminadas, activan la maquinaria de muerte celular y sufren apoptosis (descrito en el Capítulo 18). A menudo, las células tumorales capaces de formar metástasis son resistentes a la apoptosis comparadas con las células normales y pueden fácilmente sobrevivir y escapar de su propio entorno. Son menos dependientes de las señales de supervivencia que el resto de células para crecer y dividirse.

Los tumores inducen angiogénesis

Además de todos los requerimientos que acabamos de describir, para que un tumor pueda crecer ampliamente tiene que conseguir su propio abastecimiento sanguíneo, para poder disponer de suficiente cantidad de oxígeno y de nutrientes. Así pues, la *angiogénesis* o formación de nuevos vasos sanguíneos es necesaria para que el tumor crezca por encima de un determinado tamaño. Igual que en los tejidos normales, los tumores atraen a los vasos sanguíneos secretando señales angiogénicas. Estas señales se producen como respuesta a un estado de hipoxia que empieza a afectar a las células cuando el tumor supera el milímetro o los dos milímetros de diámetro. La hipoxia activa un *interruptor angiogénico* aumentando el riego sanguíneo y provocando el aumento de los niveles del *factor inducible de hipoxia-1α* (*HIF-1α: hypoxia inducible factor-1α*), una proteína reguladora de genes descrita en el

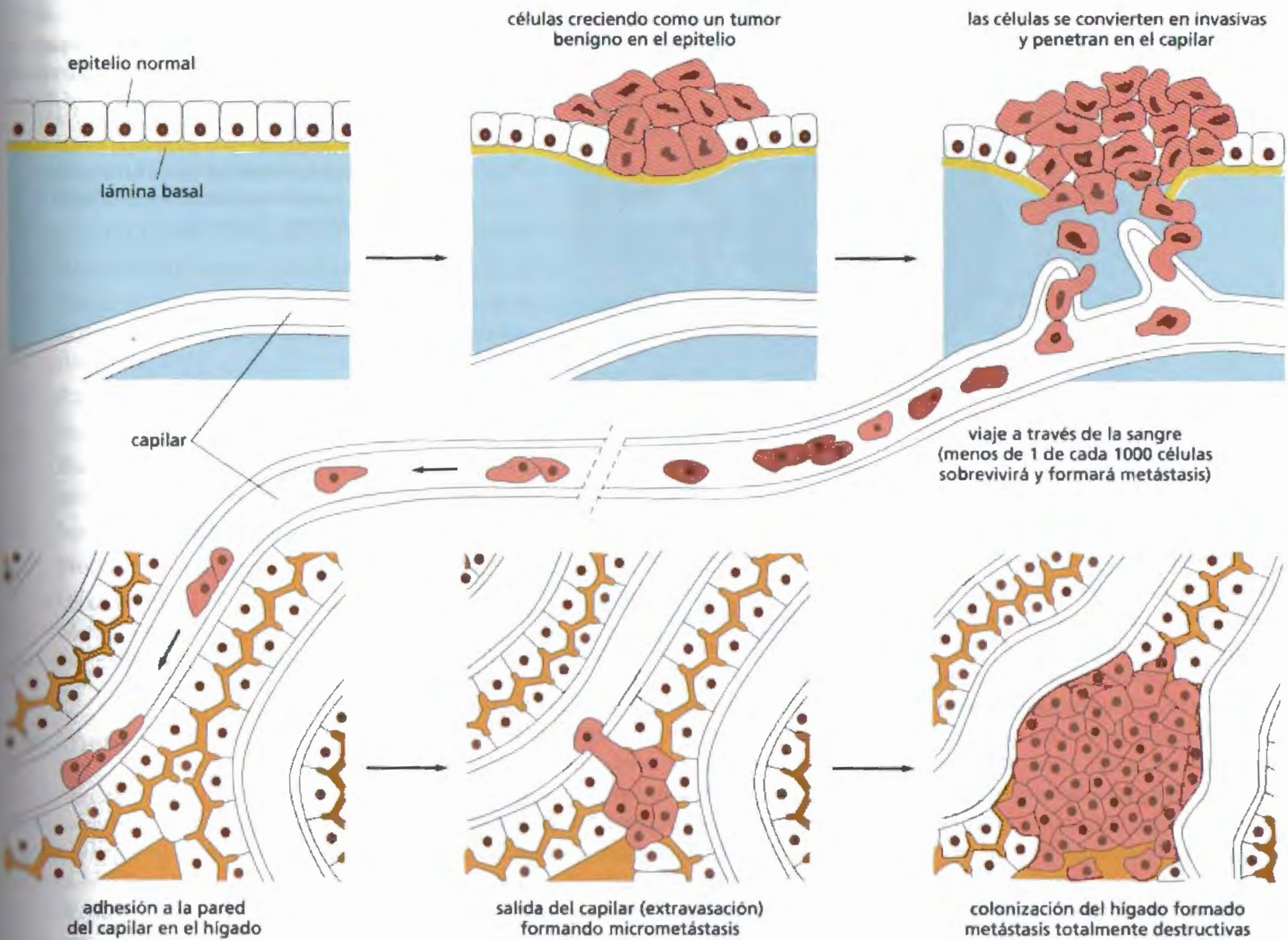


Figura 20-17 Etapas en el proceso de metástasis. Este ejemplo ilustra la expansión de un tumor desde un órgano, como la vejiga urinaria hasta el hígado. Las células tumorales pueden entrar de forma directa en el torrente circulatorio atravesando la pared de un vaso sanguíneo –como se esquematiza aquí – o, quizás más frecuentemente, atravesando la pared de un vaso linfático que finalmente descarga su contenido (linfa) en el torrente circulatorio. A menudo, las células tumorales que han entrado en un vaso linfático quedan atrapadas en los nódulos linfáticos y producen metástasis en estos nódulos linfáticos. Estudios en animales demuestran que, por término medio, de cada mil células tumorales malignas que entran en el torrente circulatorio sólo sobrevive una, que produce un tumor en otro lugar del cuerpo.

Capítulo 23; esta proteína activa la transcripción de genes que codifican factores proangiogénicos, como el factor de *crecimiento vascular endotelial* (*VEGF: vascular endothelial growth factor*). Son proteínas secretoras que atraen a las células endoteliales y estimulan el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (véase Figura 23-34). Estos vasos no sólo proporcionan nutrientes y oxígeno al tumor sino que también son la ruta de escape para que las células puedan producir metástasis.

Sin embargo, los nuevos vasos son tortuosos, heterogéneos en cuanto a diámetro y débiles, y tienen multitud de ramificaciones con extremos muertos. Estas anormalidades, probablemente el resultado de un balance desequilibrado de moléculas señalizadoras, comportan que el flujo sanguíneo sea irregular en el interior del tumor por lo que se generan nuevas zonas de hipoxia (**Figura 20-18**). La hipoxia, a su vez, selecciona a las células tumorales que mejor sobrevivan en estas condiciones adversas y estresantes, que por lo general son las de mayor malignidad. En definitiva, el crecimiento del tumor depende de un aporte sanguíneo adecuado y los vasos sanguíneos anormales formados en el interior del tumor son claramente una diana para nuevos fármacos terapéuticos, como se describirá más adelante.

El microambiente del tumor influye en el desarrollo del cáncer

Como se ha mencionado, los carcinomas son entidades complejas, que contienen muchos tipos de células además de las células tumorales. Las células del cáncer son exageradamente anormales, portadoras de las mutaciones en estos tumores, pero las otras células del tumor –en especial las que se encuentran en el tejido conjuntivo o **estroma**– tampoco son meros espectadores inocentes. Esto es porque el desarrollo de un tumor comporta entrecruzamientos entre las células tumorales y el estroma del tumor, igual que en el desarrollo de los órganos se producen entrecruzamientos entre las células epiteliales y las células mesenquimales (descrito en el Capítulo 22).

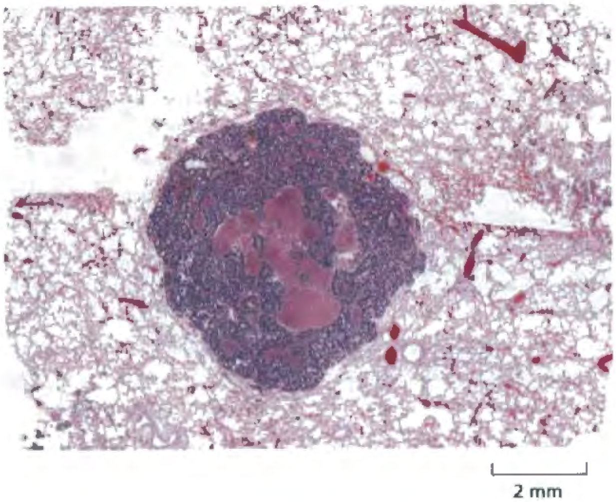


Figura 20-18 Metástasis de un adenocarcinoma de colon en el pulmón. En este corte de tejido se observan las células diferenciadas del cáncer colono-rectal que forman glándulas cohesivas en el pulmón. Esta metástasis tiene áreas rosas de necrosis donde las células del tumor han formado sus propios vasos sanguíneos. (Cortesía de Andrew J. Connolly.)

El estroma proporciona el soporte para el tumor y está formado por tejido conjuntivo normal con fibroblastos, miofibroblastos, células inflamatorias sanguíneas de la línea blanca, células endoteliales de la sangre y de los vasos linfáticos y los pericitos y células musculares lisas que los rodean (**Figura 20-19**). Mientras progresa el carcinoma, las células tumorales inducen cambios en el estroma al segregar tanto señales proteicas que alteran el comportamiento de las células estromales, como enzimas proteolíticas que modifican la matriz extracelular. A su vez, las células del estroma actúan hacia el tumor de diversas formas. Secretan señales proteicas que estimulan el crecimiento y la división de las células tumorales y también sintetizan proteasas que favorecen la remodelación de la matriz extracelular. De esta forma, el tumor y su estroma cooperan y el tumor se convierte en dependiente de sus células estromales particulares. Experimentos realizados en el ratón indican que el crecimiento de algunos carcinomas trasplantados depende de los fibroblastos asociados al tumor y no se produce en presencia de fibroblastos normales. Como segundo ejemplo, el crecimiento de tumores en la piel está retrasado de forma significativa en el ratón que ha perdido una metaloproteinasa de la matriz que normalmente es secretada por los mastocitos del estroma; esta proteasa es la responsable de la liberación de factores angiogénicos desde la matriz extracelular que estimulan la angiogénesis necesaria para que crezca el tumor de la piel. Estas y otras señales sugieren que se podrían diseñar tratamientos para el cáncer dirigidos a la inhibición de las células activadas del estroma, además de hacia las propias células tumorales.

Diversas propiedades contribuyen al crecimiento canceroso

Es evidente que para que una célula produzca cáncer tiene que adquirir un amplio conjunto de propiedades aberrantes –una serie de habilidades nuevas y subversivas– mientras evolu-

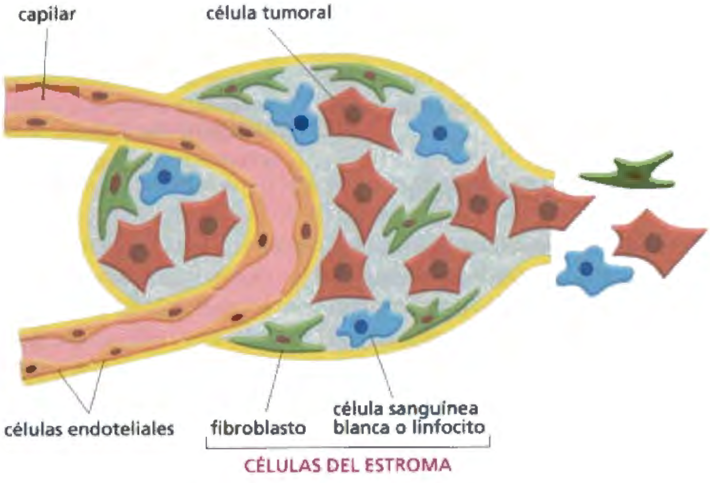


Figura 20-19 El microambiente del tumor interviene en la génesis de los tumores. Los tumores están formados por muchos tipos de células, entre las que se incluyen las células tumorales, las del epitelio vascular, los fibroblastos y células blancas sanguíneas inflamatorias. La interacción entre estos y otros tipos de células tiene un papel muy importante en el desarrollo del tumor.

ciona. Distintos cánceres requieren combinaciones distintas de estas propiedades. Sin embargo, podemos establecer una lista corta de comportamientos clave para las células cancerosas en general:

1. Son más autosuficientes que las células normales para crecer y proliferar. Por ejemplo, a diferencia de la mayoría de células normales, a menudo pueden sobrevivir y proliferar en cultivo celular incluso cuando no se adhieren al sustrato y se mantienen flotando libres en suspensión.
2. Son relativamente insensibles a las señales extracelulares antiproliferativas.
3. Son menos propensas a sufrir apoptosis que las células normales.
4. Son defectuosas en los mecanismos de control intracelular que normalmente paran la división celular de forma permanente respondiendo al estrés (como la hipoxia) o al daño en el DNA.
5. Provocan la ayuda de las células estromales normales en su entorno local.
6. Inducen angiogénesis.
7. Escapan de sus tejidos de origen (es decir, son invasoras) y sobreviven y proliferan en ambientes extraños (es decir, producen metástasis).
8. Son genéticamente inestables.
9. Producen telomerasa, o adquieren otra forma para estabilizar sus telómeros.

Más adelante en este mismo capítulo, se examinarán las mutaciones y los mecanismos moleculares que proporcionan estas propiedades a las células cancerosas y también los factores ambientales que favorecen el desarrollo del cáncer.

Resumen

Por definición, las células cancerosas proliferan desafiando los controles normales, es decir, son neoplásicas y son capaces de invadir y colonizar los tejidos de su entorno, esto es, son malignas. Pueden originar tumores secundarios o metástasis, que ya resultan muy difíciles de erradicar quirúrgicamente o mediante irradiación local. Parece que la mayoría de cánceres se originan a partir de una sola célula que ha experimentado una mutación inicial, pero posteriormente la progenie de esta célula debe sufrir otros cambios, necesitando numerosas mutaciones adicionales y acontecimientos epigenéticos para convertirse en cancerosa. La célula original de un cáncer puede ser una célula progenitora del tejido, que ya dispone intrínsecamente de la capacidad para autorrenovarse, o una célula más diferenciada que ha adquirido esta capacidad para autorrenovarse de forma indefinida. La progresión tumoral dura por lo general muchos años y refleja la operación de un proceso evolutivo de tipo darwiniano en el cual las células somáticas sufren mutaciones y cambios epigenéticos acompañados por una selección natural.

Las células cancerosas adquieren una gran variedad de propiedades especiales al progresar, multiplicarse y extenderse. Estas propiedades incluyen alteraciones en las vías de señalización celular que capacitan a las células del tumor para ignorar las señales que proceden de su entorno y que normalmente mantienen la proliferación celular bajo un estricto control. Como parte del proceso evolutivo de la progresión tumoral, las células cancerosas adquieren defectos en la diferenciación y en los mecanismos de control que paran de forma permanente la división celular o inducen apoptosis en respuesta al estrés celular o al daño en el DNA. Todos estos cambios aumentan la capacidad de las células tumorales para sobrevivir, crecer, y dividirse en su tejido original y entonces metastatizar; este proceso requiere la supervivencia y la proliferación en entornos extraños. Sin embargo, la evolución de un tumor no depende simplemente de los cambios en las propias células tumorales; también depende de otras células presentes en el microentorno del tumor, llamadas de forma colectiva células del estroma, que incluyen los nuevos vasos sanguíneos que permiten al tumor crecer de tamaño y metastatizar a través de la sangre.

Puesto que son necesarias muchísimas mutaciones y cambios epigenéticos para proporcionar estos comportamientos anormales, no es sorprendente que casi todas las células cancerosas sean genéticamente inestables. La inestabilidad genética puede surgir de defectos en su capacidad para reparar el DNA dañado o corregir errores en la replicación de diversos tipos, que comportan cambios en la secuencia del DNA. También son comunes los defectos en la segregación de los cromosomas durante la mitosis, que comportan la inestabilidad de los cromosomas y cambios en el cariotipo. Esta inestabilidad genética está seleccionada para los clones de células aberrantes capaces de producir tumores, puesto que acelera en gran medida la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos posteriores necesarios para la progresión del tumor.

CAUSAS DEL CÁNCER QUE PODEMOS PREVENIR

El desarrollo de un cáncer comprende muchas etapas, cada una de las cuales está gobernada por varios factores: algunos de ellos dependen de la constitución genética de los individuos pero otros dependen de su entorno y del estilo de vida. Existe una cierta tendencia irreducible al cáncer a pesar de las circunstancias: nunca se pueden evitar totalmente las mutaciones puesto que son una consecuencia inevitable de las limitaciones fundamentales en la precisión en la replicación y reparación del DNA, como se describió en el Capítulo 5. Si un ser humano pudiera vivir lo suficiente, resultaría inevitable que al menos una de sus células acumulase suficientes mutaciones para desarrollar un cáncer.

De todas formas, se sabe que existen factores ambientales evitables, incluyendo la dieta, que pueden favorecer el desarrollo de muchos casos de esta enfermedad. Esto se demuestra claramente comparando la incidencia de cáncer en diferentes países: casi cualquier tipo de cáncer que es común en un país, se presenta con valores de incidencia varias veces menor en algún otro país. Las poblaciones de emigrantes tienden a adquirir el patrón de incidencia de cáncer típico del país de adopción, lo cual implica que las diferencias en cuanto a incidencia son debidas a factores ambientales y no genéticos. A partir de estos resultados, se estima que el 80-90% de cánceres se podrían evitar o al menos posponer su aparición **(Figura 20–20)**.

Por desgracia, los distintos tipos de cáncer tienen diferentes factores ambientales de riesgo y un país que escapa a uno de esos factores de riesgo no tiene mayor probabilidad que otros países de escapar del resto de factores. Sin embargo, esta situación no es inevitable. Existen algunos subgrupos de individuos cuyo modo de vida parece que reduce la tasa



(A)

factores ambientales y estilos de vida	cáncer	porcentaje de casos totales
• exposición en el trabajo	diversos tipos	1-2
• relacionados con el tabaco	pulmón, riñón, vejiga	24
• dieta: baja en vegetales, alta en sal, alta en nitratos	estómago, esófago	5
• dieta: alta en grasas, baja en fibra, comida basura	intestino, páncreas, próstata, mama	37
• tabaco y alcohol	boca, garganta	2

(B)

Figura 20–20 La incidencia del cáncer está influenciada por el ambiente. (A) En este mapa del mundo se muestra si la tasa de cáncer aumenta (*flechas rojas*) o disminuye (*flechas azules*) cuando una población específica se desplaza de un lugar a otro. Estas observaciones sugieren una importancia de los factores ambientales, incluyendo la dieta, en el riesgo de cáncer. (B) Algunos efectos estimados del ambiente y del estilo de vida en la incidencia de cáncer en los Estados Unidos. La tabla muestra el porcentaje de casos totales de cáncer atribuibles a un factor determinado. (B, adaptado de Cancer Facts and Figures, American Cancer Society, 1990. Con la autorización de American Cancer Society.)

total de muerte por cáncer entre los individuos de una edad determinada. En las actuales circunstancias, en Europa y Estados Unidos, una de cada cinco personas muere de cáncer. Por el contrario, la incidencia de cáncer entre los estrictos mormones de Utah (aunque es importante considerar que no entre los miembros no practicantes de la misma familia), que evitan el alcohol, el café, los cigarrillos, las drogas y el sexo casual, es de aproximadamente la mitad que entre los americanos en general. La incidencia de cáncer también es baja en ciertas poblaciones de África.

Aunque estas observaciones de las poblaciones humanas indican que el cáncer puede evitarse, sigue siendo difícil identificar los factores ambientales específicos del riesgo –a excepción del tabaco– o establecer cómo actúan. En primer lugar consideraremos lo que hemos aprendido acerca de los agentes externos que se conoce que producen cáncer. A continuación se comentarán algunos de los triunfos y dificultades para encontrar maneras de prevenir el cáncer. Se examinará el tratamiento del cáncer en el último apartado, tras haber examinado la biología molecular de la enfermedad.

Casi todos, pero no todos, los agentes que dañan el DNA producen cáncer

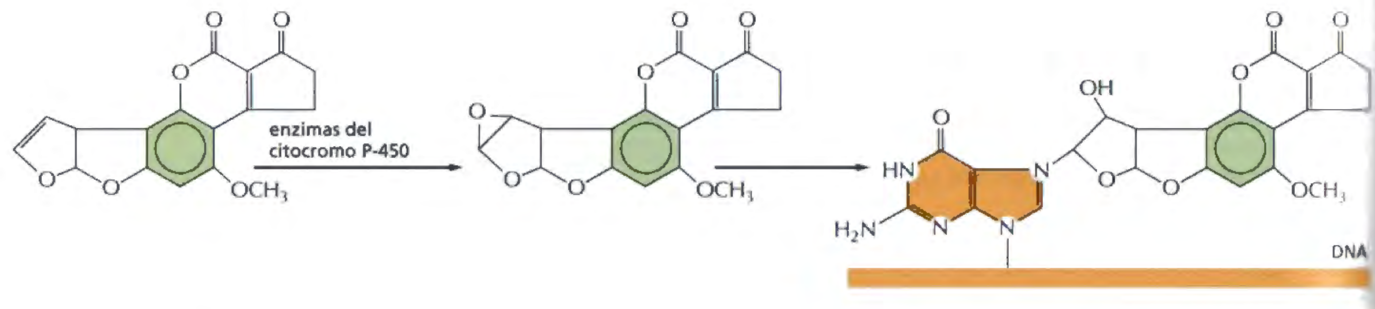
Los agentes que producen cáncer, conocidos como **carcinógenos**, son muchos y variados, y es fácil entender que lo sean aquellos que provocan algún daño en el DNA, ya que producen mutaciones. Son mutágenos de este tipo los carcinógenos químicos y diversos tipos de radiación: la luz UV procedente del sol, y también las radiaciones ionizantes como los rayos γ o las partículas α de las desintegraciones radiactivas.

Se ha demostrado que muchos tipos distintos de agentes químicos son carcinogénicos cuando son administrados a animales por vía oral o se aplican de forma repetida sobre su piel. Entre ellos se encuentran los hidrocarburos aromáticos y sus derivados tales como las aminas aromáticas, las nitrosoaminas y agentes alquilantes como el gas mostaza. Aunque estos agentes químicos tienen estructuras diversas, comparten una propiedad común: provocan mutaciones. En un ensayo habitual de mutagénesis, el carcinógeno se mezcla con un extracto activado preparado a partir de células de hígado de rata (para mimetizar el procesamiento bioquímico que se produce en un animal intacto; descrito más adelante) y la mezcla se añade a un cultivo de bacterias especialmente diseñado para este tipo de ensayo; entonces se determina la tasa de mutación en las bacterias (**Figura 20–21**). La mayoría de los agentes considerados mutágenos mediante este sencillo y rápido ensayo en bacterias, también provocan mutaciones o aberraciones cromosómicas cuando son ensayados en células animales. Cuando se analizan los datos de mutagenicidad procedentes de distintas fuentes se observa que la mayoría de carcinógenos son mutágenos.

Unos cuantos de estos carcinógenos actúan directamente sobre el DNA, pero por lo general los más potentes son relativamente inertes en términos químicos; se convierten en dañinos tras ser transformados a una forma más reactiva por los procesos metabólicos del hígado, catalizados por un conjunto de enzimas intracelulares conocido como *oxidasas citocromo P-450*. Estas enzimas ayudan al organismo a eliminar las toxinas ingeridas trans-



Figura 20–21 Ensayo de Ames para determinar la capacidad mutagénica. El ensayo utiliza una cepa de la bacteria *Salmonella* que para poder vivir necesita histidina en el medio debido a un defecto en un gen necesario para la síntesis de histidina. Los agentes mutágenos pueden producir otro cambio en este gen que revierta el defecto y generar una bacteria que no necesita histidina. Para aumentar la sensibilidad del ensayo, la bacteria también tiene un defecto en su mecanismo de reparación del DNA, lo que la hace especialmente susceptible a agentes que dañen el DNA. La mayoría de compuestos que son mutagénicos en ensayos como éste también son cancerígenos.



(A) AFLATOXINA — AFLATOXINA-2,3-EPÓXIDO — AGENTE CANCERÍGENO UNIDO A GUANINA EN EL DNA

formándolas en compuestos de fácil excreción y menos perjudiciales. Lamentablemente, su actividad sobre ciertas sustancias químicas genera productos que son altamente mutágenos. Algunos de los carcinógenos que se activan de esta forma son la *aflatoxina B1* de los hongos y el *benzo[a]pireno*, un agente químico que produce cáncer y que se encuentra en el alquitrán y en el humo del tabaco (**Figura 20–22**).

- CLORURO DE VINILO:
 angiosarcoma de hígado
- BENCENO:
 leucemias agudas
- ARSÉNICO:
 carcinomas de piel, cáncer de vejiga
- ASBESTOS:
 mesotelioma
- RADIO:
 osteosarcoma

(B)

Figura 20–22 Algunos carcinógenos conocidos. (A) Activación de un carcinógeno. Muchos agentes cancerígenos químicos para reaccionar con el DNA y causar mutaciones tienen que ser activados previamente por una transformación metabólica. El compuesto que se presenta aquí es la *aflatoxina B1*, una toxina de un moho (*Aspergillus flavus oryzae*) que crece sobre el grano y los cacahuetes cuando se almacenan en condiciones húmedas en áreas tropicales. Parece que esta sustancia contribuye al desarrollo de cáncer de hígado en los trópicos y se asocia a mutaciones específicas del gen supresor de tumores *p53*. (B) Distintos carcinógenos provocan distintos tipos de cáncer. (B, datos de Cancer and the Environment: Gene Environment Interactions. National Academies Press, 2002. Con la autorización de National Academies Press.)

Los iniciadores de tumores dañan el DNA, los promotores tumorales no

No todas las sustancias que propician el desarrollo del cáncer son mutágenos. Algunas de las evidencias más claras sobre este punto proceden de estudios realizados hace bastante tiempo acerca de los agentes químicos causantes de cáncer en la piel de ratón, donde es muy fácil observar los distintos estadios de la progresión tumoral. El cáncer de piel en el ratón puede producirse aplicando repetidamente sobre la piel un carcinógeno químico mutagénico, como el benzo[a]pireno, o el compuesto relacionado, dimetilbenzo[a]antraceno (DMBA). Sin embargo, por lo general una sola aplicación de estos mutágenos no produce por sí sola ningún tumor o ninguna otra anormalidad permanente. A pesar de ello, esta sustancia causa alteraciones genéticas latentes, lo cual se puede detectar a través de una mayor incidencia de cáncer cuando las células están expuestas ya sea a tratamientos posteriores con la misma sustancia o a otro tipo de agresiones bastante distintas. Un carcinógeno que siembra la semilla del cáncer de esta forma actúa como un **iniciador tumoral**.

El mero hecho de herir una zona de la piel que ha sido expuesta una sola vez a uno de estos iniciadores puede inducir, mediante la estimulación de la proliferación celular, el desarrollo de cáncer a partir de algunas de las células del borde de la herida. Las células inflamatorias se dirigen hacia esta herida y se considera que intervienen en una parte del efecto promotor del cáncer, como hemos mencionado. Otra posibilidad es la exposición repetida durante un periodo de meses a ciertas sustancias conocidas como **promotores tumorales**, compuestos químicos que por sí mismos no son mutagénicos, pero que pueden producir de forma selectiva cáncer en una piel que previamente ha sido expuesta a un iniciador tumoral. Los promotores tumorales más estudiados son los *ésteres de forbol* como el acetato de tetradecanoilforbol (TPA: ***t**etradecanoyl**p**horbol **a**cetate*), que se comportan como activadores artificiales de la *proteína quinasa C* (*PKC*) y, por tanto, activan parte de la vía de señalización intracelular del fosfatidilinositol (tratado en el Capítulo 15). Estas sustancias sólo causan cáncer con una frecuencia alta si se aplican después de un tratamiento con un iniciador mutagénico (**Figura 20–23**).

Aparentemente, el efecto inmediato de un promotor tumoral es inducir una respuesta inflamatoria que comportará la secreción tanto de factores de crecimiento como de proteasas en el entorno local. Estos compuestos actúan de manera directa e indirecta sobre las células estimulando la división celular (o provocando que las células que se diferenciarían normalmente parando su división, se continúen dividiendo). En una región de la piel expuesta previamente a un iniciador, la proliferación provoca el crecimiento de una gran cantidad de pequeños tumores benignos parecidos a verrugas, denominados *papilomas*. Cuanto mayor es la dosis previa del iniciador, mayor es el número de papilomas inducido; parece que cada papiloma está formado por un solo clon de células descendiente de una célula mutante producida por el iniciador. Como se podría esperar para el daño genético, los cambios secretos provocados por los iniciadores tumorales son irreversibles; por esta

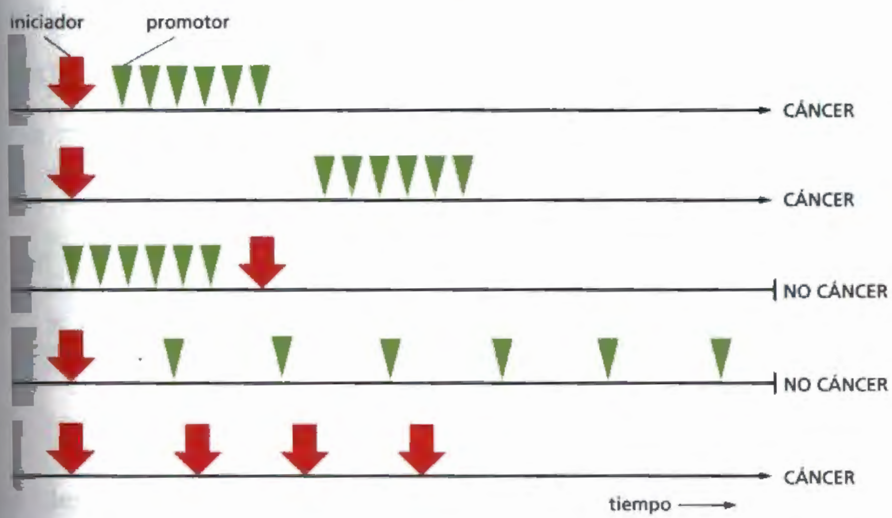


Figura 20–23 Algunas listas de condiciones posibles de exposición a un iniciador tumoral (mutagénico) y a un promotor tumoral (no mutagénico) y sus consecuencias. Tan sólo aparece cáncer si la exposición al promotor sigue a la exposición del iniciador y sólo si la intensidad de la exposición al promotor excede un cierto umbral. También se puede producir cáncer como resultado de la exposición repetida al iniciador.

razón, pueden ser descubiertos mediante tratamiento con un promotor tumoral incluso después de un largo periodo de tiempo.

No se conoce con certeza cómo actúan los promotores, pero se sabe que promotores tumorales distintos actúan de forma diferente. Una posibilidad es que simplemente estimulen la expresión de genes inductores de la proliferación, que habían sufrido mutación antes de la aplicación del promotor pero no se habían expresado: una mutación que haga que un producto génico sea hiperactivo no producirá efectos hasta que ese gen se exprese. Otra posibilidad es que el promotor tumoral altere temporalmente la forma en la que la célula reacciona al producto del gen mutado, ya sea liberando a la célula de la influencia inhibidora o induciendo la producción de un cofactor necesario para la proliferación del producto del gen mutado. Sea cual sea el mecanismo, el resultado es que la célula mutante es capaz de crecer y dividirse y producir un gran clon de células (**Figura 20–24**).

Un papiloma típico puede contener cerca de 10^5 células. Si se interrumpe la exposición al promotor tumoral, casi todos los papilomas entran en regresión y la piel recupera una apariencia casi normal. Sin embargo, en unos cuantos tipos de papilomas se producen cambios adicionales que permiten que el crecimiento y la división celular continúen de forma incontrolada, incluso después de que se haya retirado el promotor. Parece que estos cambios se originan de vez en cuando en células de papiloma individuales, con una frecuencia aproximadamente igual a la esperada para las mutaciones espontáneas.

De esta forma, una pequeña proporción de los papilomas progresan hasta convertirse en cánceres. Así pues, parece que el promotor tumoral favorece el desarrollo del cáncer, al menos en este sistema, expandiendo la población de células que presentan una mutación inicial: cuanto mayor sea el número de células y cuanto más se dividan, mayor será la probabilidad de que al menos una de ellas sufra otra mutación o cambio epigenético que la adelante un paso en el camino hacia la malignidad.

Aunque los cánceres que se producen de forma espontánea no surgen necesariamente a través de la secuencia específica de los distintos pasos de iniciación y promoción que acabamos de describir, su evolución puede estar dirigida por principios similares. Estos cánceres espontáneos también evolucionarán a una velocidad que depende no sólo de la frecuencia de cambios genéticos y epigenéticos sino también de la influencia local que afecta la supervivencia, el crecimiento, la proliferación y la expansión de estas células alteradas.



Figura 20–24 Efecto de un promotor tumoral. El promotor tumoral genera un ambiente local que expande la población de células mutantes, incrementando además la probabilidad de progresión tumoral mediante cambios genéticos posteriores.

Los virus y otras infecciones contribuyen a la formación de cánceres humanos en una proporción significativa

Una pequeña pero significativa proporción de cánceres humanos, quizás un 15% del total mundial, se originan mediante mecanismos en los que participan virus, hacterias o parásitos. Los principales culpables, como se muestra en la **Tabla 20–1**, son los virus de DNA. Las evidencias de esta participación proceden de la detección de virus en los pacientes de cáncer y

Tabla 20-1 Virus asociados con cánceres humanos

VIRUS	TUMOR ASOCIADO	ÁREAS DE ALTA INCIDENCIA
Virus de DNA		
Familia de los papovavirus		
Papilomavirus (muchas cepas distintas)	verrugas (benignas) carcinoma de cuello uterino	mundial mundial
Familia de los hepadnavirus		
Virus de la hepatitis-B	cáncer de hígado (carcinoma hepatocelular)	Sudeste de Asia, África tropical
Virus de la hepatitis-C	cáncer de hígado (carciroma hepatocelular)	mundial
Familia de los herpesvirus		
Virus de Epstein-Barr	linfoma de Burkitt (cáncer de los linfocitos B) carcinoma de nasofaringe	Oeste de África, Papúa Nueva Guinea Sur de China, Groenlandia
Virus de RNA		
Familia de los retrovirus		
Virus tipo I de la leucemia de células T (HTLV-I)	leucemia de las células T, de adultos/linfoma	Japón, Antillas
Virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1, el virus del sida)	sarcoma de Kaposi	África Central y del Sur

Para todos los virus indicados, el número de personas infectadas es mucho mayor que el número de personas que desarrollan cáncer: los virus deben actuar conjuntamente con otros factores. Además, es probable algunos de los virus contribuyan a la formación de un cáncer sólo de forma indirecta; por ejemplo, el HIV-1, destruyendo las defensas inmunes mediadas por células, permite que las células endoteliales sean transformadas por otro virus (un tipo de virus del herpes) y progresen como tumor en lugar de ser destruidas por el sistema inmune.

de estudios epidemiológicos. El cáncer de hígado, por ejemplo, es común en partes del mundo (África y el Sudeste asiático) en las que son frecuentes las infecciones por el virus de la hepatitis B y en estas regiones el cáncer se produce casi exclusivamente en personas que presentan síntomas de infección crónica por este virus. La infección crónica con el virus de la hepatitis C, que ha infectado 170 millones de personas en el mundo, también está asociada con la aparición del cáncer de hígado.

A menudo resulta difícil descifrar cuál es el papel preciso y concreto de los virus asociados a un cáncer, ya que entre la infección vírica inicial y el desarrollo del cáncer transcurren muchos años. Además, el virus sólo es responsable de una serie de etapas de la progresión del cáncer, ya que también están implicados otros factores ambientales y accidentes genéticos. Como se explicará más adelante, el DNA vírico contiene genes que pueden alterar el control de la división de la célula huésped y provocar una proliferación celular descontrolada. Entre los DNA víricos que actúan de este modo se encuentran los papilomas víricos humanos. Algunos de estos virus provocan verrugas mientras que otros infectan el cuello uterino y están implicados en el desarrollo de los carcinomas de cérvix.

En algunos otros cánceres parece que los virus provocarían también otras acciones indirectas promotoras del tumor. Por ejemplo, los virus de la hepatitis B y C puede favorecer el desarrollo del cáncer de hígado provocando una inflamación crónica (hepatitis), que estimula la división celular en el hígado e incrementa los efectos más directos de los virus en la proliferación celular.

En el sida, el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV: *human immunodeficiency virus*) estimula el desarrollo de un cáncer raro llamado sarcoma de Kaposi; el proceso que sigue destruye el sistema inmune y permite infecciones secundarias como las del virus del herpes (HHV-8) que pueden ejercer una acción carcinogénica directa. Las infecciones crónicas de parásitos y bacterias también pueden favorecer el desarrollo de algunos cánceres. Por ejemplo, la infección crónica del estómago por la bacteria *Helicobacter pylori*, productora de úlceras, puede ser una causa importante del cáncer de estómago. En algunas partes del mundo el cáncer de vejiga está asociado a la infección por *Schistosoma haematobium*, un gusano parásito.

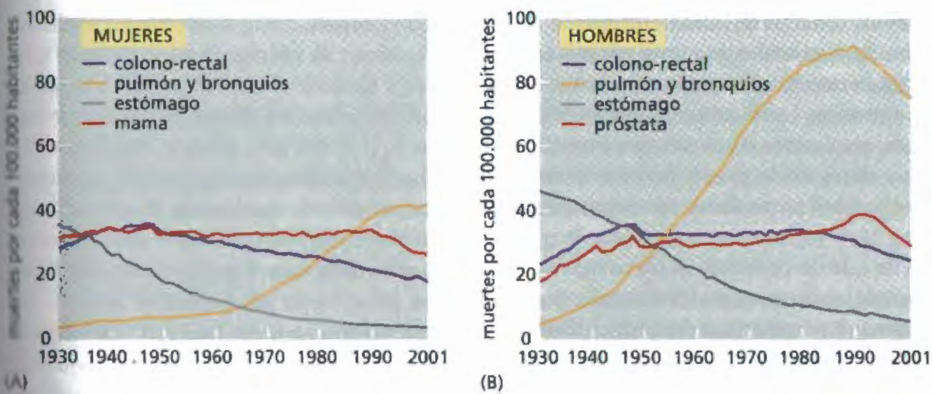


Figura 20-25 Tasas de mortalidad por cáncer, ajustadas a una misma edad, en Estados Unidos entre 1930-2001. Se indican las tasas de muerte, ajustadas a una misma edad de la población de Estados Unidos para (A) mujeres y (B) hombres. Obsérvese el incremento dramático de cáncer de pulmón en ambos sexos, consecuencia del humo del tabaco, y la disminución de mortalidad por cáncer de estómago, posiblemente relacionado con los cambios en la dieta o con patrones de infección con *Helicobacter*. Algunas de las reducciones recientes en las tasas de mortalidad de otros cánceres pueden estar relacionadas con las mejoras en su detección y tratamiento. Estos datos ajustados a la edad hay que compensarlos con el inevitable aumento de la proporción de cánceres resultado de una mayor esperanza de vida de las poblaciones. (Adaptado del Cancer Facts and Figures 2005. Con la autorización de American Cancer Society.)

La identificación de los carcinógenos revela formas de evitar el cáncer

Actualmente el humo del tabaco es, con diferencia, el agente ambiental causante de cáncer más importante en el mundo. Contiene tanto carcinógenos como promotores tumorales. Todavía no se conocen otros agentes químicos causantes de cáncer en humanos de un nivel comparable a éste. A veces se cree que las principales causas ambientales del cáncer son productos derivados de nuestra forma de vida actual, altamente industrializada –el incremento de la polución, la utilización masiva de aditivos alimentarios, etc.– pero todavía existen muy pocas evidencias que confirmen este punto de vista. La idea procede en parte de la identificación de algunos materiales con gran capacidad carcinogénica utilizados en la industria, como la 2-naftilamina y el asbesto. Sin embargo, con la excepción del incremento en el cáncer inducido por el humo del tabaco y de una clara disminución del cáncer de estómago que refleja una disminución de la tasa de infección por *Helicobacter pylori*, la incidencia de la mayoría de cánceres más comunes en individuos de una misma edad, prácticamente no ha variado en los últimos cien años (**Figura 20–25**).

La mayoría de factores carcinogénicos significativos no destacan por ser característicos del mundo moderno. El carcinógeno más potente conocido, a través de ciertos ensayos, es la aflatoxina B1 (véase Figura 20–22). Se sintetiza por hongos que contaminan de forma natural algunos alimentos, como los cacahuetes tropicales y es una causa muy importante de cáncer de hígado en África y Asia. Algunos factores que aceleran la aparición del cáncer son intrínsecos al organismo. Así para las mujeres, el riesgo de cáncer está influenciado poderosamente por las hormonas reproductoras producidas en distintas etapas de la vida y existe una correlación directa entre la historia reproductora y la incidencia del cáncer de mama (**Figura 20–26**). Es probable que las hormonas que intervienen en la reproducción afecten la incidencia del cáncer de mama influenciando la proliferación celular en la mama. Obviamente, al intentar identificar los agentes ambientales causante de cáncer debemos mantener la mente totalmente abierta.

La epidemiología –el análisis de la frecuencia de las enfermedades dentro de las poblaciones– sigue siendo la principal herramienta para encontrar las causas ambientales del cáncer humano. La aproximación ha tenido un éxito notable y todavía es muy prometedora. Solamente al revelar el papel del tabaco, la epidemiología ha mostrado una forma de reducir en más de un 25% la tasa total de muertes por cáncer en América del Norte y en Europa. La aproximación epidemiológica da mejores resultados cuando es posible aplicarla a una población uniforme en la cual es fácil distinguir entre los individuos que han sido expuestos al agente de los que no, y cuando el agente sometido a investigación es responsable de la mayoría de casos de un cierto tipo de cáncer. Por ejemplo, a principios del siglo XX todos los hombres que habían estado trabajando en una industria británica destilando 2-naftilamina (y que, por tanto, habían estado sometidos a una exposición prolongada) desarrollaron cáncer de vejiga (véase Figura 20–8); la conexión fue relativamente fácil de establecer puesto que tanto el agente químico como el tipo de cáncer no eran muy frecuentes en la población general.

Por el contrario, resulta muy difícil identificar sólo mediante la epidemiología los factores ambientales diarios que favorecen el desarrollo de los cánceres más comunes: probablemente la mayoría de estos factores son agentes a los que todos nosotros estamos expuestos

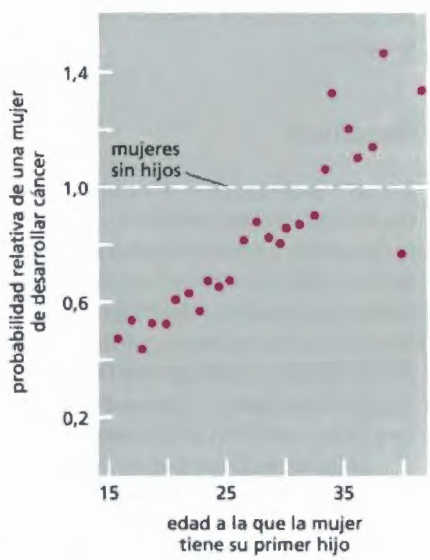


Figura 20-26 Efectos del parto sobre el riesgo de padecer cáncer de mama. La probabilidad relativa de desarrollar cáncer de mama en algún momento de la vida de una mujer está representada en función de la edad a la que dio a luz su primer hijo. La gráfica muestra el valor de la probabilidad respecto a la de las mujeres sin hijos. Cuanto mayor es el periodo de exposición a las hormonas reproductoras hasta tener el primer hijo, mayor es el riesgo de tener cáncer de mama. Parece que la primera gestación completa puede provocar alteraciones permanentes en el estado de diferenciación de las células de la mama, modificando la respuesta posterior a las hormonas. Otras líneas de evidencias epidemiológicas refuerzan la idea de que la exposición a ciertas combinaciones de hormonas reproductoras, especialmente a los estrógenos, pueden favorecer el desarrollo de cáncer de mama. (De J. Cairns, Cancer: Science and Society. San Francisco: W.H. Freeman, 1978. Conforme a B. MacMahon, P. Cole y J. Brown, *J. Natl. Cancer Inst.* 50:21-42, 1973. Con la autorización de Oxford University Press.)

habitualmente en un grado elevado y es probable muchos de ellos contribuyan de forma conjunta a la incidencia de un cáncer determinado. Si el hecho de comer naranjas duplica o reduce a la mitad el riesgo de cáncer colon-rectal, es improbable que lo detectemos, a menos que haya una razón previa para sospechar la conexión. Lo mismo podríamos decir para la mayoría de sustancias que comemos, bebemos, respiramos o aplicamos a nuestro cuerpo. Las evidencias epidemiológicas son totalmente claras en un punto dietético: como hemos mencionado, comer demasiado conduce a la obesidad y este factor incrementa significativamente el riesgo de cáncer.

Incluso cuando existen evidencias claras de que un producto es carcinógeno, ya sea a través de estudios epidemiológicos o de ensayos de laboratorio, es difícil decidir qué nivel de exposición es aceptable para la especie humana. Es extraordinariamente difícil calcular cuántos casos de cáncer humano puede producir una cierta cantidad de un producto determinado; establecer el equilibrio entre el riesgo y la utilidad del producto todavía es más difícil. Por ejemplo, en los ensayos en animales parece que ciertos fungicidas utilizados en agricultura son algo carcinogénicos a dosis elevadas. Pero se ha calculado que si no se utilizaran, la contaminación de los alimentos por metabolitos de los hongos, como por ejemplo la aflatoxina B1, provocaría más casos de cáncer que los residuos de los fungicidas que puedan quedar en los alimentos.

De todas formas, los esfuerzos para identificar a los potenciales carcinógenos aún desempeñan un papel central en la lucha para prevenir el cáncer. La prevención no es sólo mejor que su curación sino que para muchos tipos de cáncer parece ser mucho más fácil de conseguir.

Resumen

Los agentes ambientales aceleran el desarrollo de tumores y su progresión. Pueden actuar como iniciadores o como promotores tumorales. Los promotores tumorales inducen una respuesta inflamatoria y generan un ambiente local que altera la expresión génica, estimula la proliferación celular y aumenta la población de células mutantes generadas por el iniciador. La mayoría de los agentes ambientales conocidos que producen cáncer son mutagénicos, incluyendo los carcinógenos químicos y diversas formas de radiación, tales como la luz UV y las radiaciones ionizantes. Dado que muchísimos factores ambientales contribuyen al desarrollo de un cáncer determinado y alguno de ellos se encuentran bajo nuestro control, es posible prevenir una gran proporción de cánceres.

La observación de que las poblaciones de emigrantes adoptan los patrones de cáncer del país que los acoge, sugiere claramente que la mayoría de cánceres podrían evitarse cambiando la comida que ingerimos u otros factores ambientales. La epidemiología es una herramienta muy útil para la identificación de estos efectos ambientales en los cánceres humanos. La aproximación epidemiológica no requiere conocer cómo actúan los agentes productores de cáncer y puede incluir factores que no son entidades químicas, como estilos de vida o ciertos tipos de parto. Los individuos pueden evitar la mayoría de estos factores ambientales de riesgo identificados de esta forma. Incluyen el humo del tabaco y algunas infecciones provocadas por virus que causan cáncer como los papilomavirus o los virus de la hepatitis B y C. Sin embargo, puesto que la mayoría de factores que afectan al riesgo de cáncer son muy difíciles de identificar, todavía faltan muchos datos relevantes en relación a los factores ambientales que afectan la incidencia del cáncer.

DESCUBRIMIENTO DE LOS GENES CRÍTICOS DEL CÁNCER

El cáncer depende de la acumulación de cambios bereditarios en las células somáticas. Para comprenderlo a nivel molecular, es necesario identificar las mutaciones y los cambios epigenéticos implicados y descubrir cómo originan el comportamiento celular canceroso. Encontrar a las células relevantes es fácil: las células mutantes son favorecidas por la selección natural y llaman la atención puesto que pueden originar tumores. Pero, ¿cómo identificar al pequeño número de genes con cambios promotores de tumores entre el resto de genes de la célula cancerosa? En cualquier búsqueda de un gen portador de un fenotipo mutante aparece un problema parecido al de encontrar una aguja en un pajar, pero en el caso

del cáncer el trabajo es particularmente complejo. Un cáncer característico depende de un gran número de mutaciones y de cambios epigenéticos –por lo general algo distintos de un paciente a otro– y la introducción de uno de estos genes en una célula normal no es suficiente para transformarla en cancerosa. Además, la cooperación entre distintos genes alterados dificulta todavía más estudiar el significado de un cambio hereditario en un gen individual. Para empeorar la situación, una célula tumoral determinada también posee un gran número de mutaciones somáticas producto de la inestabilidad genética, de forma que puede resultar muy difícil distinguir los cambios sin significado de los cambios que tendrán un papel importante en la aparición de la enfermedad.

A pesar de todas estas dificultades, se han podido identificar muchos genes –algunos cientos– que habitualmente se encuentran alterados en los cánceres humanos, aunque se sabe que todavía quedan muchos otros por descubrir. Llamaremos a estos genes, a falta de un término mejor, **genes críticos del cáncer**, término que incluye a todos los genes cuyas mutaciones contribuyen a provocar la enfermedad. Nuestro conocimiento sobre estos genes se ha ido acumulando poco a poco a través de muchos y variados circuitos, desde las investigaciones acerca del desarrollo embrionario hasta los estudios de las infecciones que provocan cáncer en el pollo. El análisis de algunas formas de cáncer hereditario poco frecuentes aunque muy reveladoras, ha permitido aumentar el conocimiento acerca de este tema. Recientemente, la secuenciación del DNA de múltiples casos de algunos tipos específicos de cáncer ha empezado a proporcionar un esquema más sistemático de los cambios genéticos que son una característica común en esta enfermedad.

En esta sección, se analizan tanto los métodos utilizados para identificar los genes críticos del cáncer como las diversas formas de cambios hereditarios que presentan estos genes en el desarrollo del cáncer.

La identificación de mutaciones que suponen ganancia de función y de mutaciones que suponen pérdida de función requiere métodos distintos

Los genes críticos del cáncer se agrupan en dos grandes clases en función de si el riesgo de cáncer se produce por un exceso de actividad de su producto génico o por una falta de actividad de este producto. Los genes del primer tipo, es decir, aquellos que conducen a un cáncer debido a una ganancia de su función, se llaman **protooncogenes**; el mismo gen hiperactivo o sobreexpresado, que ha mutado es conocido como **oncogén**. Los genes que pertenecen al segundo grupo, en los cuales la pérdida de la función del gen puede provocar el cáncer, se han denominado **genes supresores de tumores**. Una tercera clase de genes, cuyos efectos son más indirectos, son aquellos cuyas mutaciones provocan una inestabilidad genómica, una clase que se describe como *genes de mantenimiento de DNA*.

Tanto las mutaciones en los oncogenes como en los genes supresores de tumores producen efectos parecidos sobre la proliferación celular, la supervivencia y también en el desarrollo del tumor. Así pues, desde el punto de vista de la célula cancerosa, oncogenes y genes supresores de tumores –y las mutaciones que los afectan– son la cara y la cruz de una misma moneda. Sin embargo, las técnicas necesarias para identificarlos son distintas y dependen de si el gen es hiperactivo o hipoactivo en el cáncer.

La mutación de una sola copia de un protooncogén, que lo transforma en un oncogén, tiene sobre la célula un efecto dominante favorecedor del crecimiento (**Figura 20–27A**). Así, el oncogén puede ser detectado por su efecto al ser *añadido* –por ejemplo mediante transfección del DNA o infectando la célula con un vector vírico– al genoma de una célula apropiada. Por otro lado, en el caso de un gen supresor de tumores, por lo general las mutaciones que provocan cáncer son recesivas: a menudo (aunque no siempre) las dos copias del gen han desaparecido o están inactivadas en la célula somática diploide antes de que el efecto sea observado (Figura 20–27B). Se trata de aproximaciones distintas para descubrir lo que se ha *perdido* en la célula tumoral.

En algunos casos, una gran anormalidad cromosómica específica, visible con el microscopio, se encuentra asociada de forma repetida a un tipo determinado de cáncer. Este hallazgo puede proporcionar una pista para la localización del oncogén que está activado como resultado de una reorganización de los cromosomas (como en el caso de la translocación responsable de la leucemia mielógena crónica, mencionada anteriormente). Otra opción es que una deleción visible de un segmento cromosómico puede revelar el lugar de un gen supresor de tumores delecionado.

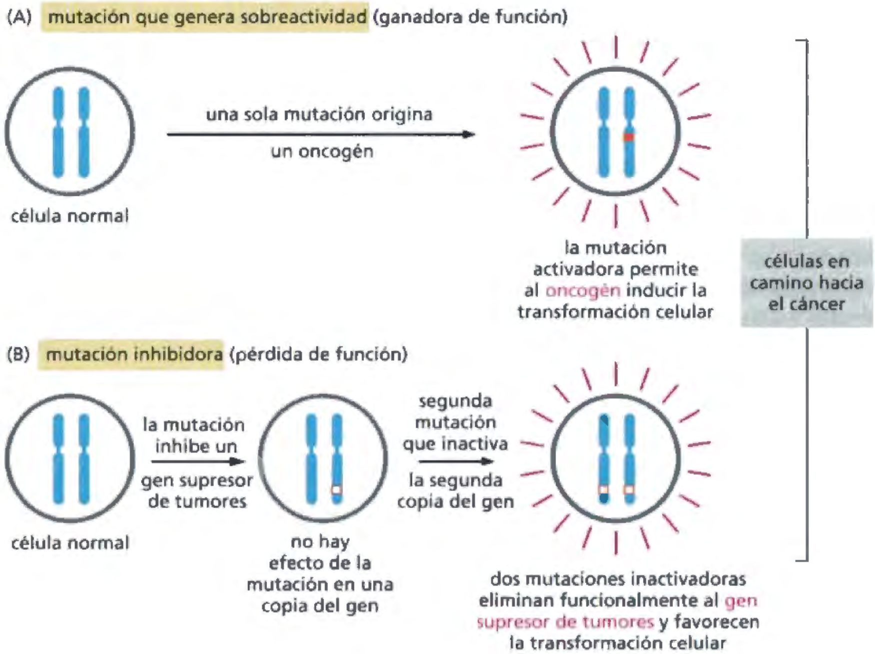


Figura 20–27 Las mutaciones críticas para el cáncer se agrupan en dos categorías fácilmente diferenciables, dominantes y recesivas. En este diagrama, las mutaciones activadoras están representadas como *cuadrados rojos llenos* mientras que las mutaciones inhibidoras se han representado como *cuadrados rojos vacíos*. (A) Oncogenes que actúan de forma dominante: una mutación que provoca un incremento de función en una sola copia de un gen crítico del cáncer puede conducir a la célula hacia el cáncer. (B) Por otro lado, las mutaciones en los genes supresores de tumores por lo general actúan de forma recesiva: para conducir a la célula hacia el cáncer tiene que perderse la función de los dos alelos del gen. Aunque en este diagrama, el segundo alelo del gen supresor tumoral está inactivado por mutación, a menudo la inactivación se produce por pérdida en el segundo cromosoma. No se muestra el hecho de que la mutación de algún gen supresor tumoral puede tener un efecto incluso cuando sólo está dañada una de las dos copias del gen.

Los retrovirus pueden actuar como vectores para los oncogenes que alteran el comportamiento celular

Los **virus tumorales** han desempeñado un papel importante en la búsqueda de las causas genéticas del cáncer humano. Aunque los virus no participan en la mayoría de tumores humanos más comunes, son uno de los agentes causales de cáncer más importantes en algunas especies animales. El análisis de estos virus tumorales en los animales ha permitido entender los mecanismos del cáncer en general y ha contribuido al descubrimiento de los oncogenes en particular.

Uno de los primeros virus animales implicados en el cáncer fue descubierto hace aproximadamente 100 años en los pollos que sufrían infecciones que provocaban tumores del tejido conjuntivo o sarcomas. El agente infeccioso fue caracterizado como un virus –el *virus del sarcoma de Rous*–y ahora sabemos que es un virus de RNA. Como otros muchos virus de RNA descubiertos desde entonces, es un **retrovirus**. Cuando infecta a una célula, su RNA es copiado a DNA mediante transcripción inversa; el DNA se inserta en el genoma del huésped donde puede mantenerse y heredarse a través de las distintas generaciones de células. El virus del sarcoma de Rous contiene un oncogén que induce cáncer en el pollo. Este oncogén no es necesario para la supervivencia o para la reproducción del virus, como se demostró al descubrir formas mutantes de este virus que se dividen normalmente pero no transforman a la célula huésped en cancerosa –un proceso llamado *transformación celular*. Se observó que alguno de estos mutantes tenían delecionado todo o una parte del gen que codifica una proteína llamada **Src** (pronunciado "Sarc"). Otras mutaciones en este gen hacen que el efecto transformante del virus sea dependiente de la temperatura: las células infectadas muestran un fenotipo transformado a 34 °C, pero recuperan el fenotipo normal al cabo de cuantas horas cuando la temperatura llega a los 39 °C.

¿Cuál es el origen de este gen? En el año 1975, cuando se utilizó como sonda una copia radiactiva del DNA de las secuencias del gen viral *Src*, para buscar secuencias íntimamente relacionadas mediante la técnica de hibridación DNA-DNA (véase Figura 8–36), se encontró que los genomas de las células de los vertebrados tenían secuencias muy parecidas, aunque no idénticas, a este gen vírico. El oncogén vírico se evidenció de forma accidental a partir del retrovirus del genoma de una célula huésped infectada previamente, pero el protooncogén de la células huésped (*c-Src*) había sufrido una mutación en el proceso y se había convertido en el oncogén (*v-Src*) (**Figura 20–28**). El descubrimiento de que el cáncer podría originarse a partir de una mutación de un gen específico, presente en el genoma de un animal normal, alteró profundamente y de forma irreversible el campo de la investigación del cáncer.

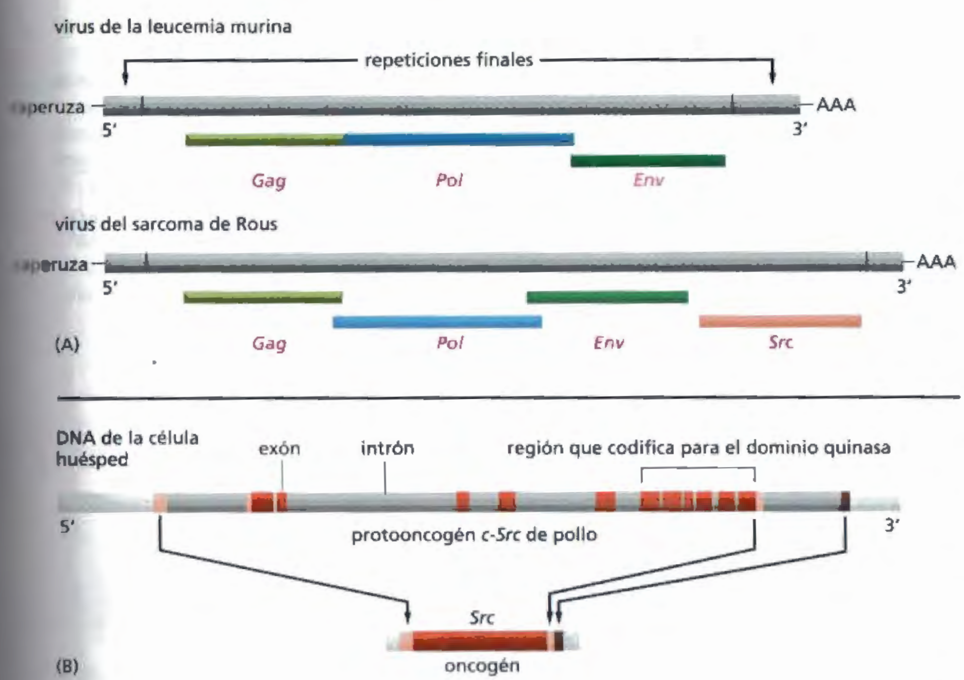


Figura 20–28 Estructura del virus del sarcoma de Rous. (A) Organización del genoma vírico comparada con la de un retrovirus común (el virus de la leucemia murina). El virus del sarcoma de Rous es poco usual entre los retrovirus que transportan oncogenes puesto que ha retenido los tres genes víricos para el ciclo de vida vírico normal: *Gag* (que produce una poliproteína que es hidrolizada generando las proteínas de la cápside), *Pol* (que produce la transcriptasa reversa y una enzima implicada en la integración del cromosoma vírico en el genoma del huésped) y *Env* (que produce la glucoproteína de la cubierta). En otros virus oncogénicos, uno o más de estos genes víricos se han perdido total o parcialmente cuando el retrovirus adquiere el oncogén transformante. De esta forma el virus transformante puede generar partículas infecciosas sólo en una célula que esté infectada de forma simultánea con un *virus colaborador* no transformante y no defectuoso, que proporciona las funciones que el otro virus ha perdido. (B) Las relaciones entre el oncogén *v-Src* y el protooncogén celular *Src* del cual deriva. Los intrones presentes en el *Src* celular han sido eliminados en *v-Src*; además, *v-Src* es portador de mutaciones que alteran la secuencia de aminoácidos de la proteína (no se muestra), transformándola en hiperactiva y alterando la regulación de su actividad tirosina quinasa específica (véase Figura 3–69). La proteína v-Src también se sobreexpresa puesto que el virus produce grandes cantidades de RNA.

Desde entonces se han identificado un gran número de otros oncogenes, en otros retrovirus y se han analizado de forma similar. Cada uno de ellos ha comportado el descubrimiento de su correspondiente protooncogén presente en las células animales normales.

Las distintas búsquedas de oncogenes han convergido en el mismo gen: *Ras*

Mientras algunos investigadores buscaban oncogenes en los retrovirus, otros escogieron una aproximación más directa y buscaron secuencias de DNA en las células tumorales humanas que podían provocar una proliferación descontrolada cuando se introducían en líneas celulares no tumorales. Por lo general, las células utilizadas eran fibroblastos. Parece que estas células, seleccionadas para proliferar de forma indefinida en cultivo, ya presentan un conjunto de alteraciones genéticas que forman parte del camino hacia la malignidad. Por esta razón, al añadir un solo oncogén es posible que se produzca un gran efecto.

Para detectar un oncogén de esta forma, el DNA es extraído de las células tumorales, fragmentado e introducido en las células en cultivo. Si alguno de los fragmentos contiene un oncogén, aparecerán pequeñas colonias de células con una proliferación anormal; puesto que las células que forman estas colonias tienen propiedades cancerosas, se dice que están *transformadas* o que han sufrido **transformación.** <CCGA> Cada colonia es un clon de células que se originó a partir de una primera célula portadora de un gen añadido, que libera a la célula de alguno de los controles sociales en la proliferación celular; las células transformadas que forman una colonia superan a las no transformadas del cultivo y se apilan capa sobre capa mientras proliferan (**Figura 20–29**).

Este ensayo condujo al aislamiento y secuenciación del primer oncogén humano, una versión mutada del protooncogén ***Ras.*** Actualmente se sabe que el gen *Ras* está mutado en cerca de uno de cado cinco cánceres humanos. El descubrimiento del oncogén humano *Ras* fue de los más dramáticos puesto que, tan sólo un poco antes, un gen *Ras* mutado había sido descubierto como el gen causante de tumores en un retrovirus que provoca sarcomas en los roedores. El descubrimiento a principios de la década de 1980 del mismo oncogén en células cancerosas humanas y en un virus tumoral animal fue espeluznante. La implicación de que el cáncer está provocado por mutaciones en un número limitado de genes críticos para el cáncer cambió nuestros conocimientos de la biología molecular del cáncer.

Como se indicó en el Capítulo 15, las proteínas Ras normales son GTPasas monoméricas que participan en la transmisión de señales desde los receptores de la superficie celular hacia el interior de la célula. <GAAC> Los oncogenes *Ras* aislados a partir de tumores humanos presentan una mutación puntual que genera una proteína Ras hiperactiva, que no se

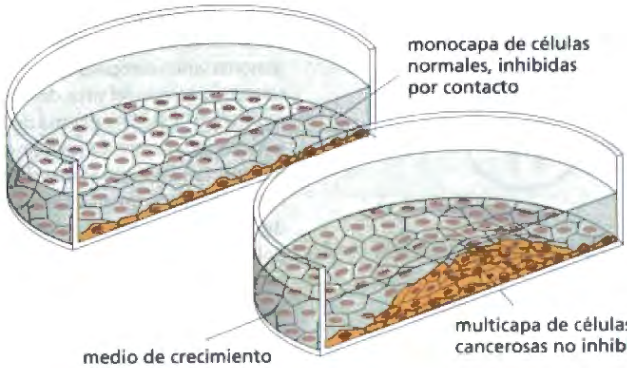


Figura 20–29 Pérdida de inhibición por contacto en un cultivo celular. La mayoría de las células normales dejan de crecer cuando han formado una monocapa que recubre toda la superficie del cultivo: la proliferación parece depender del contacto con la placa y puede ser inhibida por el contacto con otras células. Este fenómeno es conocido como "inhibición por contacto". Las células cancerosas, por el contrario, normalmente superan estas restricciones, continúan creciendo y se apilan unas sobre otras.

inactiva cuando el GTP unido es transformado a GDP. Puesto que este tipo de mutación produce una proteína hiperactiva, el efecto es dominante, esto es, basta con que en una célula esté mutada una de las dos copias del gen para que sufra el cambio. Puesto que los genes *Ras* están mutados en una gran cantidad de tumores humanos, todavía son unos de los genes críticos del cáncer más importantes.

Mediante los métodos que acabamos de describir y de otros métodos distintos, en la actualidad se conocen cientos de protooncogenes, es decir, genes que pueden convertirse en oncogenes mediante mutaciones activadoras y que pueden provocar cáncer.

Los genes supresores de tumores pueden ser identificados a través de estudios de raros síndromes cancerosos hereditarios

La identificación de un gen inactivado en una célula cancerosa determinada requiere una estrategia distinta a la mencionada para estudiar los genes que se transforman en hiperactivos: por ejemplo, no se puede utilizar el ensayo de transformación celular para identificar algo que simplemente no está. La clave que condujo al descubrimiento del primer gen supresor de tumores procedió de estudios de un tipo raro de cáncer humano, el **retinoblastoma**, que surge a partir de células de la retina del ojo convertidas en cancerosas por un número de mutaciones muy pequeño. Como sucede a menudo en biología, el descubrimiento se produjo a partir de la observación de un caso especial, pero rápidamente se convirtió en un referente universal. De hecho, los genes identificados en algunos síndromes raros de cáncer familiares se encuentran por lo general en los cánceres más comunes, donde a menudo actúan como supresores de tumores.

El retinoblastoma es típico de la infancia y los tumores se desarrollan a partir de células precursoras neurales en la retina inmadura. La padece uno de cada 20.000 niños. Se conocen dos formas de la enfermedad, una es hereditaria y la otra no lo es. En la forma hereditaria, generalmente aparecen de forma independiente muchos tumores que afectan a ambos ojos; en la no hereditaria sólo se ve afectado un ojo y por un único tumor. Unos pocos individuos con retinoblastoma tienen un cariotipo anormal visible, con una deleción en una banda específica del cromosoma 13 que, al heredarse, predispone al individuo a la enfermedad. También se han encontrado estas mismas deleciones en algunos pacientes con la enfermedad no hereditaria, observación que sugiere que el cáncer puede estar provocado por una pérdida de un gen crítico en esta región.

Utilizando la localización de esta deleción cromosómica, fue posible clonar y secuenciar el **gen *Rb***. Se descubrió entonces que los pacientes que padecen la versión hereditaria de la enfermedad presentan una deleción o una mutación con pérdida de función en una copia del gen *Rb* en todas las células del organismo. Estas células presentan predisposición a transformarse en cancerosas, pero no lo son mientras retengan funcional la otra copia del gen. Las células de la retina que se transforman en cancerosas presentan ambas copias del gen *Rb* mutadas, porque han sufrido una mutación somática además de la mutación original heredada, de forma que su copia buena ha sido eliminada.

Por el contrario, en los pacientes que tienen la forma no hereditaria de la enfermedad, las células no cancerosas no presentan ningún defecto en las copias del gen *Rb*, mientras que las células cancerosas tienen alteradas ambas copias del gen. Este retinoblastoma no hereditario es muy poco cumún, puesto que se necesitan dos acontecimientos indepen-

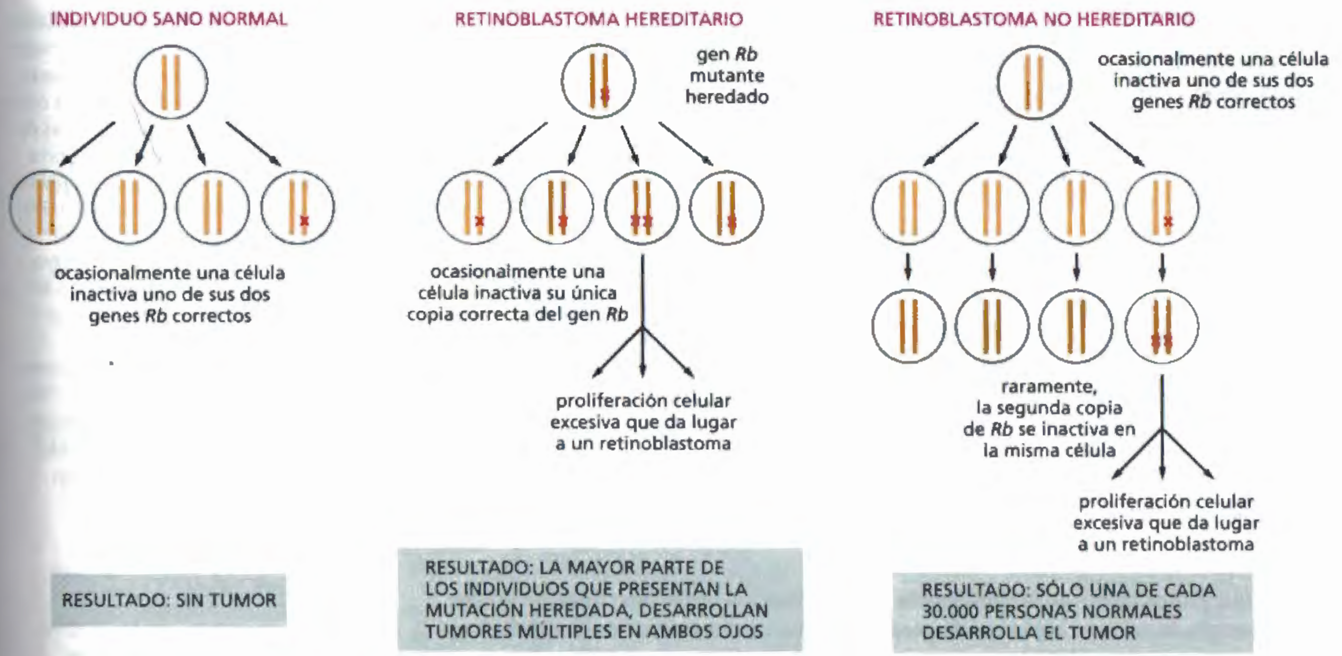


Figura 20–30 Mecanismos genéticos que provocan el retinoblastoma. En la forma hereditaria, todas las células del cuerpo carecen de una de las dos copias funcionales normales del gen supresor de tumores *Rb*, y los tumores se producen cuando la otra copia se pierde o se inactiva debido a una mutación somática (ya sea mediante mutación o silenciamiento epigenético). En la forma no hereditaria, todas las células contienen inicialmente dos copias funcionales del gen y el tumor surge porque se pierden o se inactivan ambas copias a través de la coincidencia de dos acontecimientos somáticos en una célula.

dientes que inactiven el mismo gen en dos cromosomas de un solo linaje celular de la retina (Figura 20–30). El gen *Rb* está mutado también en algunos de los tipos de cáncer más comunes que incluyen carcinomas de pulmón, mama y vejiga. Estos tumores surgen por una serie de cambios genéticos mucho más complejos que el retinoblastoma y su aparición se produce a una edad más avanzada. Sin embargo, parece que en todos ellos la pérdida de Rb es una etapa importante en la progresión hacia la malignidad.

El gen *Rb* codifica la **proteína Rb**, que es un regulador universal del ciclo celular y normalmente se expresa en casi todas las células del organismo (véase Figura 17–62). Actúa como uno de los frenos principales en el progreso hacia la división celular y su pérdida permite a las células la entrada en el ciclo de forma inapropiada, como describiremos más adelante.

Los genes supresores de tumores también pueden identificarse estudiando los tumores

La historia del gen *Rb* ilustra la forma en que se pueden utilizar los síndromes raros tumorales hereditarios para descubrir los genes supresores de tumores que son importantes en los cánceres esporádicos más comunes. De todas formas, ahora sabemos que sólo unos cuantos de estos genes importantes se han descubierto de esta forma. Una aproximación más directa para la identificación de estos genes implica comparar las células tumorales con las no tumorales de un mismo paciente y descubrir cuál de los 3 mil millones de nucleótidos del genoma humano se ha perdido, presenta una disfuncionalidad o está silenciado de forma anormal. A consecuencia de la inestabilidad genética de las células tumorales, por lo general se presentan una gran cantidad de pérdidas. La mayoría de los defectos se han producido al azar y accidentalmente debido a la propia inestabilidad genética. Por lo tanto, un gen supresor de tumores relevante sólo puede ser identificado si repetidamente se ha perdido, es defectuoso o está silenciado cuando no debería estarlo en muchos casos independientes de un tipo específico de cáncer. Buscar los genes supresores de tumores de este modo es una tarea ardua pero posible con las modernas técnicas de análisis del DNA (como se explicará más adelante). Docenas de genes supresores de tumores han sido ya caracterizados de esta forma y se han identificado muchos más.

Tanto mecanismos genéticos como epigenéticos pueden inactivar a los genes supresores de tumores

Lo que resulta peligroso es la inactivación de un gen supresor de tumores. Esta inactivación puede producirse de formas diferentes, mediante diferentes combinaciones de desórdenes

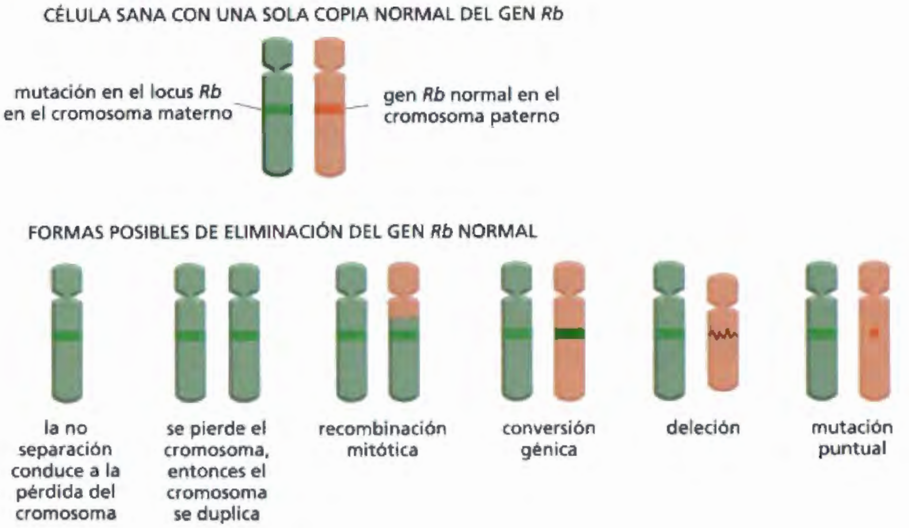


Figura 20–31 Seis caminos por los cuales se puede perder la copia correcta conservada de un gen supresor de tumores mediante cambios en la secuencia del DNA. Una célula defectuosa en una sola de las dos copias de un gen supresor de tumores, se comporta como una célula normal sana; los diagramas muestran cómo podría perderse la función de la otra copia del gen, haciéndose así propicia a desarrollar cáncer. Una séptima posibilidad, encontrada con frecuencia en algunos supresores tumorales, es que el gen puede ser silenciado mediante un cambio epigénetico sin que se presente ninguna alteración de la secuencia de DNA, como se ilustra en la Figura 20–32. (Según W.K. Cavenee et al., *Nature* 305: 779-784, 1983. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

genéticos que juntos provocan la eliminación o la inutilización de las dos copias de un gen. Así, por ejemplo, la primera copia puede perderse mediante deleción de un pequeño fragmento de un cromosoma o inactivarse a través de una mutación puntual. La segunda copia habitualmente es eliminada por un mecanismo menos específico y más probable: la célula pierde el cromosoma que lleva la copia normal por un error en la segregación de los cromosomas o el gen normal puede ser sustituido por una versión mutada mediante recombinación mitótica o conversión génica.

En la **Figura 20–31** se resume el abanico de posibilidades que permite la pérdida de la copia correcta de un gen supresor de tumores a través de cambios en la secuencia del DNA, utilizando el gen *Rb* como ejemplo. Es importante destacar que, excepto para la mutación puntual ilustrada en el extremo derecho de la figura, todas estas vías producen células portadoras de un solo tipo de secuencia de DNA en la región cromosómica donde se localizan sus genes *Rb*, una secuencia que es idéntica a la secuencia en el cromosoma mutado original.

Como se explicó en el Capítulo 4, la variación genética humana normal hace que el conjunto de cromosomas maternos sea distinguible con facilidad del conjunto de cromosomas paternos. Por término medio, las secuencias de DNA humano se diferencian –es decir, somos heterozigotos– aproximadamente en uno de cada mil nucleótidos. Cuando se pierde un fragmento grande de un cromosoma o se convierte en una secuencia de DNA en su cromosoma homólogo, como en la Figura 20–31, se produce una ***pérdida de la heterozigosis*** (*LOH*: ***loss of heterozygosity***): en esta zona sólo se mantiene una versión de cada una de las secuencias variables del DNA. Gracias al proyecto del Genoma Humano se han localizado millones de sitios habituales de heterozigosis: cada uno de estos lugares se caracteriza por una secuencia de DNA específica que se sabe que es polimórfica, es decir, que en la población humana se produce en dos o más versiones ligeramente distintas. A partir de una muestra de DNA tumoral se puede estudiar qué versión de estas secuencias polimórficas contiene. Lo mismo se puede hacer, a efectos de comparación, con una muestra de DNA procedente de un tejido no canceroso del mismo paciente. La ausencia de heterozigosis en una región del genoma que presenta muchos lugares de polimorfismo, o la ausencia de una secuencia marcadora genética que se presenta en el DNA de las células no tumorales, marcan el camino hacia una región cromosómica que contiene un gen supresor de tumores. Sin embargo, debido a su inestabilidad genética, las células tumorales presentan a menudo una pérdida de heterogeneidad para muchas regiones cromosómicas distintas. De este modo, por lo general la detección de genes supresores de tumores requiere la eliminación de una gran cantidad de ruido de fondo.

Los cambios epigenéticos proporcionan otra importante forma de inactivar permanentemente un gen supresor de tumores. De manera habitual, el gen se empaqueta en la heterocromatina y los nucleótidos C de las secuencias CpG de su promotor se metilan de forma hereditaria (véase Figura 20–12). Estos mecanismos pueden silenciar un gen en una célula y en todas sus descendientes de forma irreversible. Dado un conjunto de posibles genes supresores de tumores, es relativamente fácil ensayar si sus promotores tienen cantidades anormales de DNA metilado. Los estudios de este tipo sugieren que el silenciamiento génico epigenético es un acontecimiento frecuente en la progresión tumoral; en la actualidad se

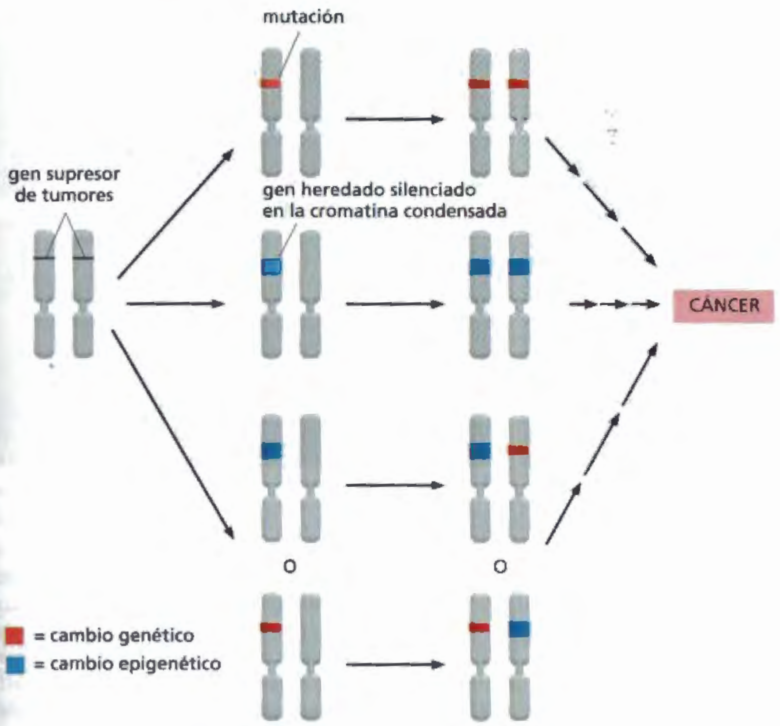


Figura 20–32 Las vías que implican la pérdida de función de un gen supresor de tumores en el cáncer incluyen tanto cambios genéticos como epigenéticos. Como se ha explicado en el Capítulo 4, el empaquetamiento de un gen en la cromatina condensada puede impedir su expresión y esta característica puede heredarse cuando la célula se divide (véase Figura 4–52). Como ya se ha indicado, los cambios que silencian un gen supresor de tumores pueden producirse en cualquier orden.

considera que, en la mayoría de cánceres humanos, los mecanismos epigenéticos permiten la inactivación de algunos genes supresores de tumores (**Figura 20–32**).

Los genes mutados en el cáncer se pueden convertir en hiperactivos de muchas formas distintas

En el caso de los protooncogenes, lo que conduce al cáncer es la activación del gen. La **Figura 20–33** resume los tipos de accidentes que pueden convertir un protooncogén en un oncogén. (1) Un pequeño cambio en la secuencia del DNA, como una mutación puntual o una deleción, pueden producir una proteína hiperactiva cuando esto tiene lugar dentro de una secuencia que la codifica, o comportar la sobreproducción de la proteína cuando el cambio se produce dentro de la región reguladora de este gen. (2) Los sucesos de amplificación génica, como por ejemplo los causados por errores en la replicación del DNA, pueden

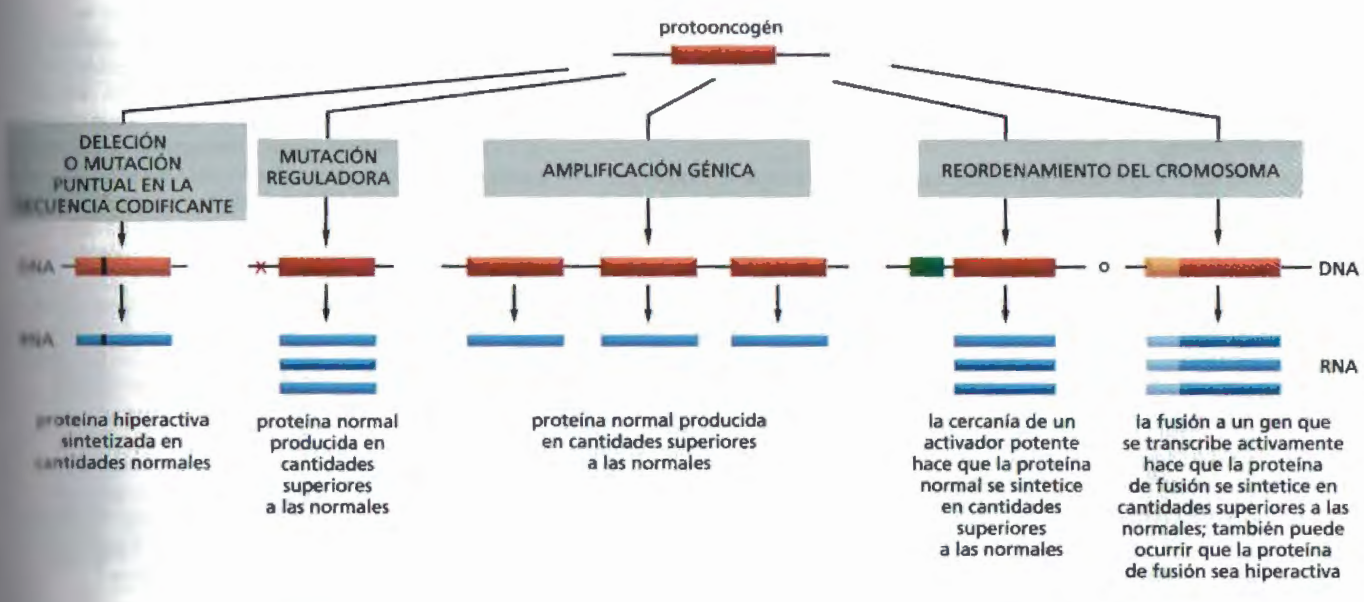
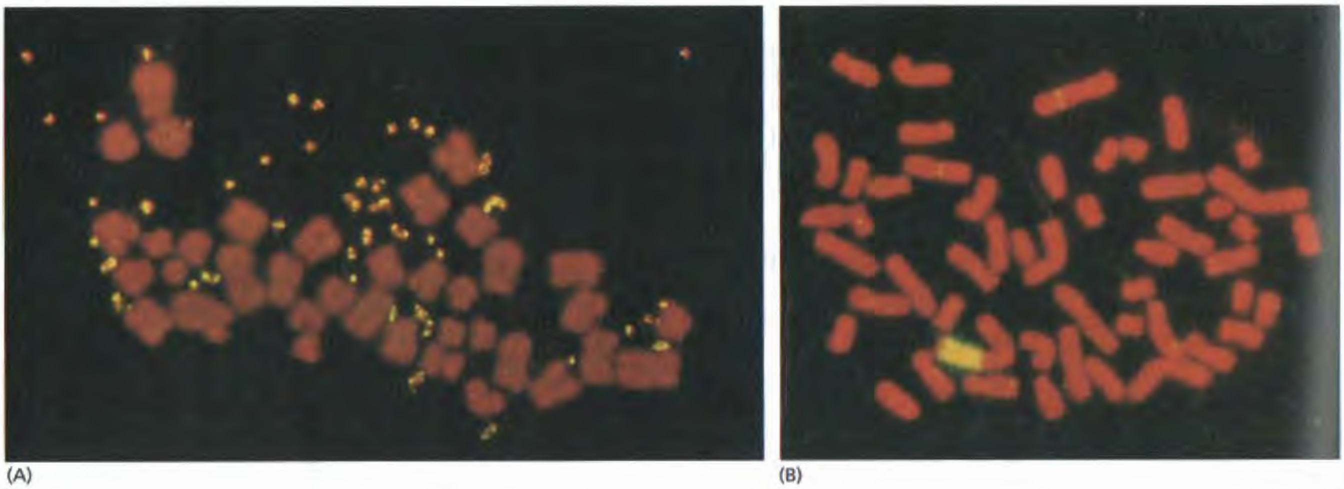


Figura 20–33 Tres tipos de accidente mediante los que un protooncogén se puede transformar a oncogén.



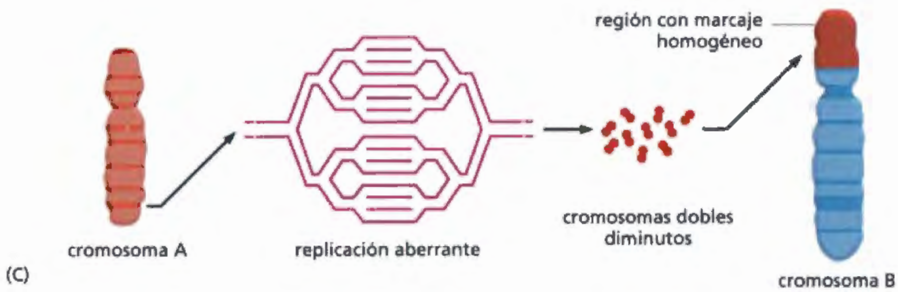


Figura 20–34 Cambios cromosómicos en células cancerosas resultado de una amplificación génica. En estos ejemplos, se ha amplificado el número de copias del protooncogén *Myc*. La amplificación de oncogenes es habitual en los carcinomas y a menudo puede observarse en forma de un cambio curioso en el cariotipo: se observa que la célula posee pares adicionales de cromosomas en miniatura –denominados, por ello, *cromosomas diminutos dobles*– o presenta una *región de marcaje homogéneo* interpolada en los patrones de banda normales de uno de sus cromosomas regulares. Ambas aberraciones consisten en amplificaciones masivas de las copias de segmentos pequeños del genoma. En la figura, los cromosomas se han marcado con un colorante *rojo* fluorescente, mientras que las múltiples copias del gen *Myc* se detectan por hibridación *in situ* con una sonda *amarilla* fluorescente. (A) Cariotipo de una célula en que las copias del gen *Myc* se presentan como cromosomas dobles diminutos (manchas *amarillas* apareadas). (B) Cariotipo de una célula en la que las múltiples copias del gen *Myc* aparecen como regiones de marcaje homogéneo (*amarillo*) interpoladas en uno de los cromosomas regulares. (Por lo general se pueden detectar copias de genes *Myc*, como una mancha amarilla diminuta, en cualquier lugar del genoma.) (C) Esquema que muestra cómo se produce una amplificación. Parece que en la replicación del DNA se produce un acontecimiento extraño y anormal que origina un cromosoma con copias extra de una región cromosómica. La reparación de esta estructura libera anillos de DNA que pueden replicarse y formar secuencias repetidas en tándem, produciendo cromosomas dobles diminutos. Como resultado de un segundo acontecimiento poco frecuente, el DNA de uno de estos cromosomas puede ser integrado en un nuevo lugar en un cromosoma normal produciendo una región de marcaje homogéneo. Otros procesos también amplifican genes, como los que se describen más adelante en la Figura 20–41. (A y B por cortesía de Denise Sheer.)

producir copias extra de un gen; este hecho puede implicar la sobreproducción de la proteína (**Figura 20–34**). (3) Una reorganización de los cromosomas, que incluya la rotura y nueva unión de la hélice de DNA, puede cambiar la región que codifica una proteína, produciendo una proteína de fusión hiperactiva o alterando las regiones de control para un gen, de forma que se produce en grandes cantidades una proteína normal.

Varios tipos específicos de anormalidades son características de determinados genes y de respuestas a determinados carcinógenos. Por ejemplo, el 90% de los tumores de piel inducidos en ratones al tratarles la piel con el iniciador tumoral dimetilbenzo[a]antraceno (DMBA), tienen un cambio de una A por una T exactamente en el mismo punto que el gen *Ras* mutado; seguramente de todas las mutaciones provocadas por el DMBA, sólo las de este punto activan de forma eficiente a las células de la piel a formar un tumor.

Por el contrario, el receptor para la proteína señalizadora extracelular conocida como *factor de crecimiento epidérmico* (*EGF: epidermal growth factor*) puede ser activado por una deleción que elimina una parte de su dominio extracelular. Estos receptores mutantes forman dímeros activos incluso en ausencia de EGF, de forma que inducen una señal estimuladora inapropiada, como un timbre que suena incluso cuando nadie presiona el botón. Las mutaciones de este tipo son comunes en muchos tumores cerebrales humanos conocidos como glioblastomas.

Por otro lado, la proteína Myc contribuye generalmente al cáncer por una sobreproducción de su forma normal. La proteína Myc actúa en el núcleo estimulando el crecimiento y la división celular como se describió en el Capítulo 17; así pues, cantidades excesivas de Myc pueden provocar la proliferación celular en circunstancias en las cuales una célula normal no se dividiría. La sobreproducción de Myc puede producirse de distintas maneras. En algunos casos, el gen está amplificado, es decir, errores en la replicación del DNA comportan la aparición de muchas copias del gen en una misma célula (véase Figura 20–34). Sin embargo, habitualmente la sobreproducción parece ser debida a un cambio en un elemento regulador que actúa sobre el gen. Por ejemplo, una translocación cromosómica puede, de forma inapropiada, contener secuencias reguladoras de genes muy poderosas cerca de la secuencia que codifica la proteína Myc, de forma que se producirán cantidades inusualmente grandes del mRNA de Myc. Así pues, en el linfoma de Burkitt una translocación coloca al gen *Myc* bajo las secuencias de control que por lo general regulan la expresión de anticuerpos de los linfocitos B. Como resultado de ello, las células B mutantes tienden a proli-

ferar en exceso y forman un tumor. Translocaciones cromosómicas específicas similares a ésta son habituales en muchos linfomas y leucemias.

La búsqueda de los genes críticos del cáncer continúa

La secuenciación del genoma humano ha abierto nuevas vías para el descubrimiento sistemático de los genes críticos del cáncer. Ahora es posible examinar cada uno de los aproximadamente 25.000 genes que existen en una línea celular tumoral determinada, o en muestras de tejidos de un conjunto de tumores del mismo tipo, a la búsqueda de anormalidades potencialmente significativas, mediante análisis automatizado ya sea del mRNA que producen las células o de su DNA genómico. Analizando un número importante de tumores distintos, debería ser posible identificar todos los genes que por lo general están alterados en los cánceres humanos. A pesar de su enorme coste, los esfuerzos realizados en la secuenciación a gran escala del DNA han empezado a identificar nuevos oncogenes humanos. Un ejemplo de ello es el descubrimiento que una forma hiperactiva de la proteína quinasa Raf (descrito en el Capítulo 15) está presente en un elevado porcentaje de melanomas y con menor frecuencia en otros tipos de cáncer.

De todas formas, la simple secuenciación del DNA no es la única manera de abordar el problema y existen otros nuevos métodos muy potentes, que parecen ser más eficientes para identificar nuevos oncogenes y genes supresores de tumores. Tres tipos de aproximaciones distintas parecen particularmente prometedoras.

1. La *hibridación genómica comparativa* (*CGH: comparative genomic hybridization*) utiliza el marcaje fluorescente de fragmentos de DNA extraídos de células normales y de células tumorales para identificar regiones del genoma que están amplificadas o delecionadas en un tipo particular de cáncer (**Figura 20–35**). Los fragmentos marcados se hibridan en los microchips de DNA de forma que cada mancha corresponde a una localización conocida en el genoma humano. Las diferentes manchas se iluminan con colores fluorescentes distintos, según la proporción entre las uniones de los fragmentos normales y cancerosos marcados. De esta forma, se pueden localizar regiones del genoma de la célula cancerosa que han sido amplificadas o delecionadas. Se busca así, de una forma más restringida, los genes candidatos en estas regiones que pueden contribuir al desarrollo del cáncer.

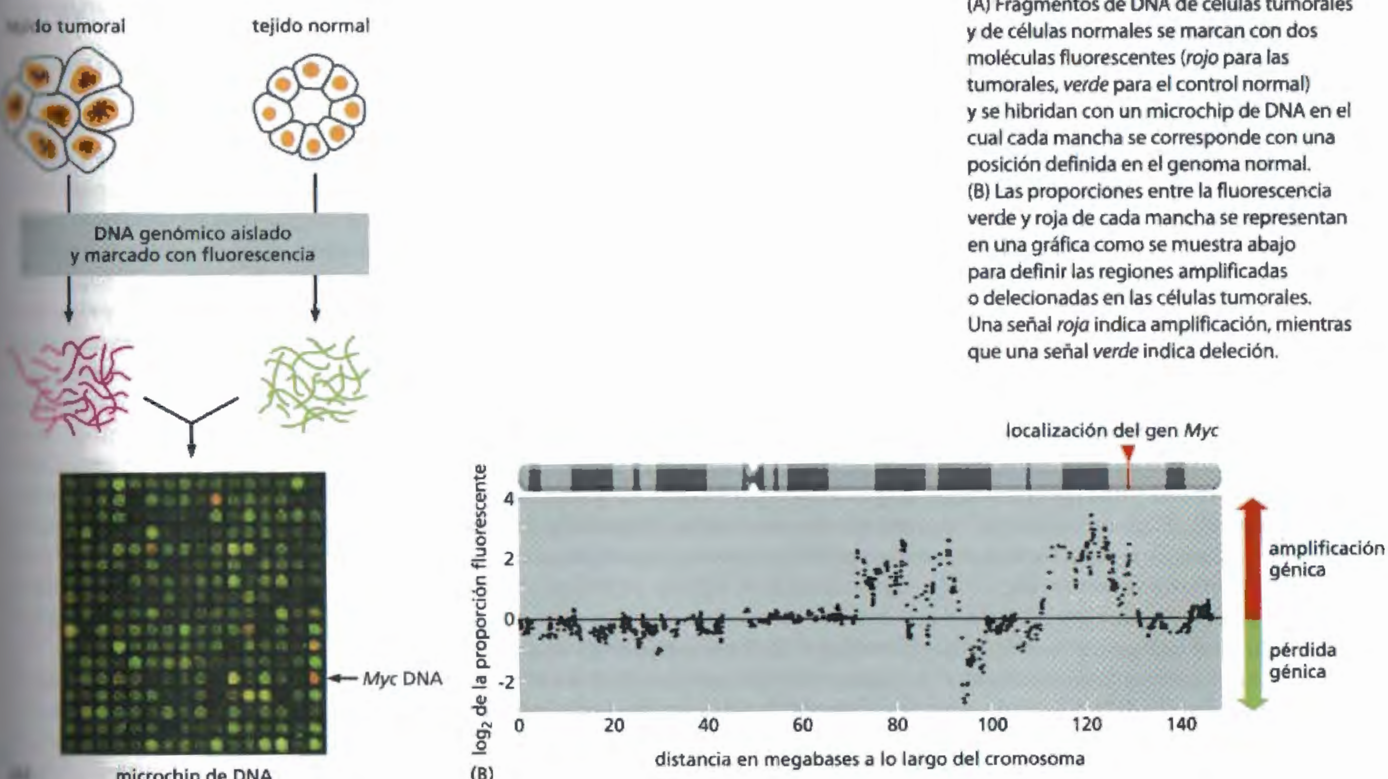


Figura 20–35 Hibridación genómica comparativa que permite detectar los cambios del DNA en las células tumorales. (A) Fragmentos de DNA de células tumorales y de células normales se marcan con dos moléculas fluorescentes (*rojo* para las tumorales, *verde* para el control normal) y se hibridan con un microchip de DNA en el cual cada mancha se corresponde con una posición definida en el genoma normal. (B) Las proporciones entre la fluorescencia verde y roja de cada mancha se representan en una gráfica como se muestra abajo para definir las regiones amplificadas o delecionadas en las células tumorales. Una señal *roja* indica amplificación, mientras que una señal *verde* indica deleción.

2. Los microchips de DNA se utilizan también para revelar cambios específicos en la expresión génica asociados con el cáncer. En este caso, se utiliza una población de mRNA celular para preparar la sonda para hibridación en lugar de su DNA cromosómico (véase Figura 8–76).
3. Finalmente, grandes búsquedas genéticas basadas en la tecnología del RNA de interferencia (RNAi) (descrito en el Capítulo 8) proporcionan una novedosa y potente aproximación funcional para identificar genes supresores de tumores. La expresión de pequeños RNA de interferencia (siRNA: *small interfering*) en una célula puede inactivar las dos copias de un gen, ya sea destruyendo su mRNA o inhibiendo su traducción (véase p. 571). Este método proporciona una forma eficiente, en principio, de identificar cualquier gen supresor tumoral cuya pérdida facilite la transformación cancerosa en un animal concreto o en la línea celular donde se ha ensayado.

Cualquiera que sea la aproximación utilizada para identificar los nuevos candidatos a genes críticos para el cáncer, todavía quedará la duda de si el gen realmente contribuye a producir el cáncer. Los ensayos en cultivos celulares en los que se analizan los efectos de una sobreproducción de un candidato a oncogén o la inhibición de un candidato a gen supresor tumoral pueden servir de ayuda. Sin embargo, los ensayos más convincentes proceden del uso de ratones transgénicos que sobreexpresan los oncogenes candidatos o de los ratones "*knockout*" que han perdido algún candidato a gen supresor tumoral. En ambos tipos de ratón, el desarrollo del cáncer debería estar acelerado si los genes son realmente culpables.

En principio, para la búsqueda de nuevos genes críticos del cáncer mediante las estrategias descritas, no es necesario conocer las funciones normales de los genes ni comprender el mecanismo mediante el que sus mutaciones provocan cáncer. De todas formas, a medida que se incrementa el conocimiento de la biología celular, resulta mucho más fácil adivinar cuáles son los genes sospechosos y analizar su grado de culpabilidad determinando directamente si están alterados con frecuencia en los cánceres específicos. El trabajo de encontrar los genes está totalmente relacionado con la problemática de descubrir lo que hacen y cómo, cuando se modifican, contribuyen al desarrollo del cáncer. Este es el objetivo del siguiente apartado.

Resumen

Los genes críticos del cáncer pueden clasificarse en dos grupos en función de si el desarrollo del cáncer se produce por un incremento o por una pérdida de su función. Las mutaciones que suponen una ganancia en la función y que convierten protooncogenes en oncogenes estimulan a las células a proliferar cuando no deberían hacerlo; las mutaciones que inducen una pérdida de función de los genes supresores de tumores liberan a las células de los controles que normalmente permiten mantener un número determinado de células. Los oncogenes tienen un efecto genético dominante; la mayoría de ellos fueron descubiertos porque provocan cáncer en animales cuando son introducidos en ellos mediante un retrovirus que originalmente era portador de una forma normal del gen (un protooncogén) de una célula huésped previa. Los oncogenes también pueden ser identificados mediante aberraciones cromosómicas características que pueden activar un protooncogén.

Las mutaciones en genes supresores de tumores por lo general son recesivas; las células tienden a comportarse normalmente hasta que las dos copias del gen son delecionadas, inactivadas o silenciadas epigenéticamente. Algunos de estos genes fueron identificados en síndromes tumorales hereditarios poco frecuentes, aunque su pérdida o inactivación es una característica común de muchos de los cánceres esporádicos. Los individuos que heredan una copia defectuosa y una copia funcional del gen supresor tienen una elevada predisposición al desarrollo del cáncer puesto que un simple cambio, en cualquier lugar del organismo, que elimine o inactive la copia correcta remanente, es suficiente para producir que una célula pierda la función supresora tumoral.

La búsqueda de genes críticos para el cáncer continúa con herramientas cada vez más potentes disponibles para rastrear de forma sistemática el DNA o el mRNA de las células cancerosas, buscando mutaciones significativas o una expresión génica alterada. Cuando ha sido reconocido un gen candidato, su importancia en el desarrollo del cáncer se puede estudiar en ratones mediante la sobreexpresión del gen en caso de un candidato a oncogén o inactivándolo en el caso de un gen candidato a supresor tumoral.

BASES MOLECULARES DEL COMPORTAMIENTO DE LAS CÉLULAS TUMORALES

Los "cazadores" de genes tumorales ven de forma distinta a los oncogenes y a los genes supresores de tumores –y también a las mutaciones y a los cambios epigenéticos que las provocan. Pero desde el punto de vista de la célula cancerosa son las dos caras de una misma moneda. El resultado final de algunas mutaciones en ambos tipos de genes puede ser un comportamiento celular parecido, puesto que la mayoría de mecanismos de control de la célula incluyen tanto componentes inhibidores (supresores de tumores), como estimuladores (protooncogenes). Si el objetivo es comprender cómo funciona la célula cancerosa, y hacerlo en términos de genética molecular, lo importante no es distinguir entre un gen supresor de tumores y un oncogén, sino entre genes críticos para el cáncer que actúan en distintas vías reguladoras y bioquímicas.

Algunas de las vías más importantes relacionadas con el cáncer transportan señales desde un ambiente celular (ya descrito en el Capítulo 15); otras son responsables de los programas internos celulares, como los que controlan el ciclo celular (tratado en el Capítulo 17) o la muerte celular (descrito en el Capitulo 18); otras, incluso, controlan los movimientos celulares (véase el Capítulo 16) o las interacciones mecánicas entre las células vecinas (véase el Capítulo 19). Las distintas vías están interrelacionadas de formas muy complejas. Buena parte de la información que tenemos sobre ellas ha sido obtenida gracias a la investigación sobre el cáncer; recíprocamente, los estudios sobre los aspectos básicos de la biología celular han cambiado la comprensión actual del cáncer.

En el primer apartado de este capítulo, se resumen en términos generales las propiedades que convierten a las células en cancerosas y se expone una lista de los tipos de comportamientos aberrantes que presenta una célula tumoral. También consideraremos cómo aparecen estas propiedades características a partir de las mutaciones que se han identificado en los genes críticos del cáncer y cómo se pueden determinar las funciones de estos genes dentro del contexto del cáncer. Finalizaremos este apartado con la descripción del cáncer de colon como ejemplo detallado, mostrando cómo una sucesión de cambios en genes críticos del cáncer permite evolucionar al tumor desde un patrón de comportamiento malo a uno peor.

Los estudios en embriones en desarrollo y en animales transgénicos permiten descubrir las funciones de los genes críticos del cáncer

Dado un gen mutado en un cáncer, necesitamos conocer tanto su funcionamiento en las células normales, como la forma en que las mutaciones del gen contribuyen al comportamiento anormal característico de la célula cancerosa. Por ejemplo, cuando se clonó por primera vez el gen *Rb*, todo lo que se conocía era que estaba mutado en el retinoblastoma. En el caso de *Ras*, se sabía que el gen mutado permitía a las células proliferar de forma excesiva e indefinida en cultivo, pero era un misterio cómo funcionaba la proteína Ras en las células normales o en las tumorales. El estudio del cáncer fue el punto de partida de los estudios que revelaron el papel importante que desempeñan los productos génicos, tanto para Rb como para Ras, en las células normales –Rb, como inhibidor del ciclo celular y Ras como componente central de las vías intracelulares de señalización.

Actualmente disponemos de mucha más información sobre las células, de forma que cuando se identifica un nuevo gen como crítico del cáncer, por lo general se nos hace familiar a partir de estudios realizados en otro contexto. Por ejemplo, muchos oncogenes y genes supresores de tumores se conocen a partir de su función durante el desarrollo embrionario. Los ejemplos incluyen componentes de casi todas las vías de señalización importantes en el desarrollo a través de las cuales las células se comunican (descrito en los Capítulos 15 y 22): Wnt, Hedgehog, TGFβ, Notch y las vías de señalización con receptores tirosina quinasa, que incluyen componentes codificados por genes críticos del cáncer, con Ras como elemento final de todas estas vías.

Ahora, retrospectivamente, podemos entender que este hallazgo no es una sorpresa. En el Capítulo 23 veremos que algunos mecanismos que controlan el desarrollo embrionario actúan en el organismo adulto normal controlando el recambio celular y manteniendo la homeostasis. Tanto el desarrollo de un animal pluricelular como su mantenimiento como adulto, dependen del crecimiento celular, la división celular, la diferenciación celular, la

muerte celular, el desplazamiento de las células y la adhesión celular; en otras palabras, de todos los aspectos del comportamiento celular cuya desorganización provoca cáncer. A menudo la biología del desarrollo, utilizando modelos animales como *Drosophila* y *C. elegans*, proporciona datos que revelan las funciones normales de los genes críticos del cáncer.

Sin embargo, en última instancia, urge conocer de qué forma las mutaciones en estos genes transforman a las células de los tejidos en cancerosas. Se ha podido obtener una cierta cantidad de información estudiando las células en cultivo o analizando muestras de los pacientes de cáncer. Pero los ratones transgénicos y "knockout" han resultado muy útiles para investigar cómo las mutaciones en varios genes críticos del cáncer afectan a los tejidos de un organismo.

Mediante métodos ya descritos en el Capítulo 8 se pueden obtener ratones transgénicos portadores de un oncogén en todas sus células. Los oncogenes introducidos de esta forma pueden ser expresados en la mayoría de tejidos o sólo en algunos de ellos, en función de la especificidad de su secuencia reguladora de DNA asociada. Los estudios de estos ratones revelan que un solo oncogén no es suficiente para transformar una célula normal en una célula cancerosa. Normalmente, en un ratón transgénico para los oncogenes *Myc* o *Ras*, algunos de los tejidos que expresan el oncogén presentan un incremento en la proliferación celular y, con el tiempo, algunas células ocasionales pueden sufrir cambios adicionales que originan un cáncer. Sin embargo, la gran mayoría de las células que expresan estos oncogenes en el ratón no producen cáncer. De todas formas, desde el punto de vista del animal completo, el oncogén heredado supone una amenaza muy seria porque conlleva un riesgo elevado de que aparezca un cáncer en algún lugar de su organismo. Los ratones que expresan ambos oncogenes *Myc* y *Ras* (obtenidos mediante apareamiento de un ratón portador del oncogén *Myc* y de un ratón portador del oncogén *Ras*) desarrollan cáncer mucho antes y con mucha mayor frecuencia que los ratones de las cepas paternas (**Figura 20-36**); sin embargo, de nuevo el cáncer se origina como tumores aislados entre células no cancerosas. Por tanto, incluso expresando dos oncogenes, las células tienen que sufrir cambios posteriores al azar para convertirse en cancerosas, lo que sugiere que para la tumorogénesis se necesitan varias mutaciones, como se ha demostrado por otras evidencias expuestas anteriormente.

Muchos genes supresores de tumores, como el *Rb*, han sido inactivados en el ratón. Como se ha comentado, las generaciones que han perdido una copia de un gen supresor de tumores presentan una elevada predisposición para el cáncer; los tumores que se forman presentan habitualmente una pérdida de heterozigosis, es decir, que han perdido la segunda copia del gen o la tienen inactivada. La desaparición de las dos copias de un gen supresor de tumores implica a menudo la muerte del organismo en una etapa aún embrionaria, lo que refleja el papel esencial que tienen estos genes durante el desarrollo. Para superar este problema y poder estudiar el efecto de las mutaciones homocigotas en los tejidos adultos, se pueden generar ratones portadores de mutaciones condicionales (véase Figura 5-79) de forma que un solo tejido u órgano presente el gen defectuoso, por ejemplo, el hígado. Otra opción es diseñar el ratón para que el defecto aparezca como respuesta a una señal experimental (un fármaco) que se administra en el momento adecuado. Mediante la utilización de estas técnicas, los ratones no sólo proporcionan información acerca de los mecanismos de formación de tumores sino que también son modelos en los que analizar y desarrollar nuevas terapias para el cáncer.

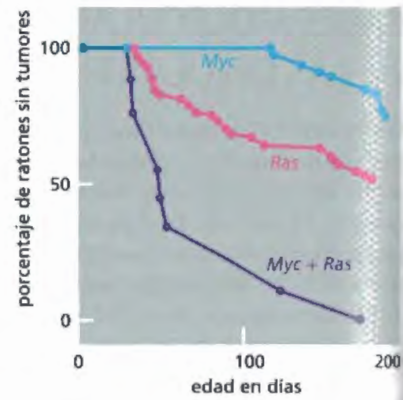


Figura 20-36 **Colaboración entre oncogenes en ratones transgénicos.** Las gráficas muestran la incidencia de tumores en tres cepas de ratones transgénicos, una portadora del oncogén *Myc*, otra del oncogén *Ras* y una tercera portadora de ambos oncogenes. Para estos experimentos primero se generaron dos líneas de ratones transgénicos. Una de ellas lleva insertada una copia de un oncogén generado fusionando el protooncogén *Myc* con el DNA regulador del virus tumoral para el tumor mamario de ratón (que produce la sobreexpresión de *Myc* en la glándula mamaria). La otra línea lleva insertada una copia del oncogén *Ras* bajo control del mismo elemento regulador. Los ratones de ambas cepas desarrollan tumores mucho más frecuentemente de lo normal, a menudo en la glándula mamaria o en las glándulas salivares. Por cruzamiento de las dos cepas se obtuvieron ratones que tenían de forma simultánea ambos oncogenes. Estos híbridos desarrollan tumores aún con mayor frecuencia, muy superior a la suma de las frecuencias para los dos oncogenes por separado. Sin embargo, los tumores se producen sólo después de un lapso de tiempo y sólo en una pequeña proporción de las células de los tejidos donde se expresan ambos genes. Aparentemente, para que se desarrolle el cáncer es necesario que, además de la presencia de los dos oncogenes, ocurran algunos cambios accidentales adicionales. (Según E. Sinn et al. *Cell* 49:465–475, 1987. Con la autorización de Elsevier.)

Muchos genes críticos del cáncer regulan la proliferación celular

Muchos genes críticos del cáncer codifican componentes de las vías que regulan el comportamiento social de las células en un animal, en particular, componentes de las vías de señalización a través de las cuales las influencias procedentes de las células vecinas controlan si una célula crece, se divide, se diferencia o muere (**Figura 20-37**). De hecho, muchos de los componentes de estas vías de señalización celular fueron identificados a través de la búsqueda de los genes que provocan cáncer. El listado completo de los productos de los protooncogenes y de los genes supresores de tumores contiene ejemplos de casi todos los tipos de moléculas implicados en la señalización celular: proteínas señalizadoras secretadas, receptores transmembrana, proteínas intracelulares que unen GTP, quinasas, proteínas reguladoras de genes y muchos otros tipos de proteínas. Muchas mutaciones que provocan cáncer alteran estos componentes, de forma que inducen señales de proliferación incluso cuando las células no lo necesitan y favorecen el crecimiento celular, la repli-

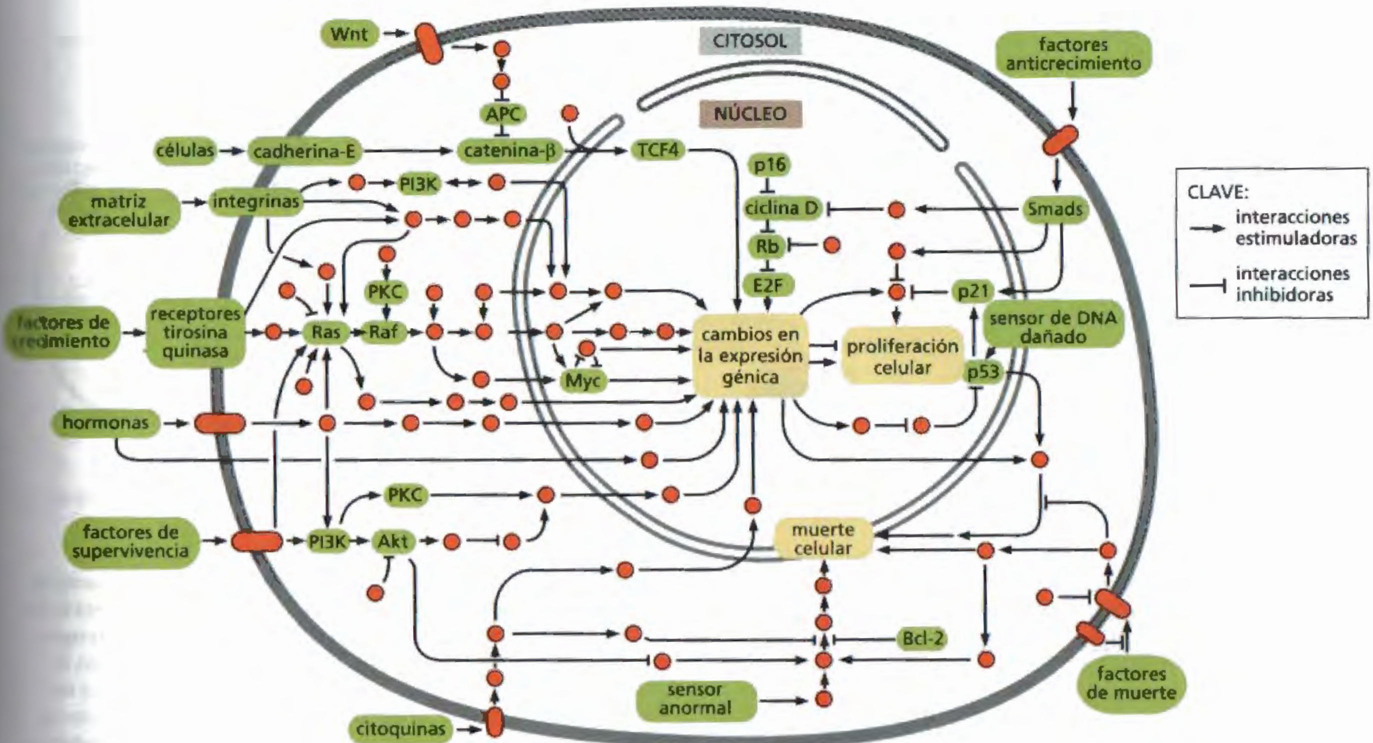


Figura 20-37 **Diagrama de las vías de señalización más importantes relacionadas con el cáncer en las células humanas, que indica las localizaciones celulares de algunas de las proteínas modificadas por mutación en los cánceres.** A menudo, en una misma vía actúan tanto oncogenes como genes supresores de tumores. Las proteínas señalizadoras individuales se indican en *rojo*; los componentes críticos del cáncer y los mecanismos de control descritos en este capítulo, en *verde*. Las interacciones estimuladoras e inhibidoras entre estas proteínas se designan como se indica. (Adaptado de D. Hanahan y R.A.Weinberg, *Cell* 100:57-70, 2000. Con la autorización de Elsevier.)

ción del DNA y una división celular anormal. Estos ejemplos incluyen las mutaciones de ganancia de función que activan de forma inapropiada el receptor de EGF y la proteína Ras, explicado anteriormente.

Los componentes de las vías de señalización que actúan inhibiendo la división celular son a menudo supresores tumorales. Un ejemplo muy bien estudiado es la vía de señalización del TGFβ (descrito en el Capítulo 15). Las mutaciones con pérdida de función en esta vía contribuyen al desarrollo de algunos tipos de cáncer humanos. El receptor de tipo II del TGFβ, por ejemplo, está mutado en algunos tipos de cáncer de colon y Smad 4 –una proteína señalizadora intracelular de la vía– está inactivado en los cánceres de páncreas y de algunos otros tejidos. Estos descubrimientos reflejan la función normal de la vía de TGFβ restringiendo la proliferación celular (véase Figura 23–26).

No es sorprendente que las mutaciones que afectan de forma directa el sistema de control central del ciclo celular sean características de la mayoría de cánceres. La proteína supresora de tumores Rb, mencionada anteriormente, controla un punto clave en el cual las células deciden entrar en el ciclo celular y replicar su DNA. Rb actúa de freno que restringe la entrada en la fase S mediante su unión a una proteína reguladora inhibidora de la familia de E2F, necesaria para que se transcriban los genes que codifican las proteínas necesarias para la entrada en la fase S. Normalmente, la inhibición de Rb desaparece en el momento oportuno a través de una fosforilación de la proteína mediada por diversas quinasas dependientes de ciclinas (Cdk: *cyclin-dependent kinase*), que inducen la liberación de Rb de su lugar de unión en las proteínas E2F (descrito en el Capítulo 17).

Como ya se ha indicado, muchas células cancerosas proliferan de forma anormal debido a que no disponen de Rb. Otras consiguen el mismo efecto adquiriendo mutaciones en otros componentes de la vía regulada por Rb (**Figura 20–38**). Así pues, en las células normales un complejo de ciclina D y la quinasa dependiente de ciclina, Cdk4 (G_1-Cdk) estimulan la progresión a través del ciclo celular fosforilando a Rb (véase Figura 17–62 y Tabla 17–1, p. 1063). La proteína *p16 (INK4)* –producida en condiciones de estrés– inhibe la progresión a través del ciclo impidiendo la formación de un complejo activo ciclina D-Cdk4; es un componente muy importante de la parada del ciclo celular producido en condiciones normales como respuesta al estrés. Algunos glioblastomas y tumores pulmonares presentan amplificaciones de los genes que codifican Cdk 4 o ciclina D, favoreciendo la proliferación celular. En los tumores en los que las mutaciones no inactivan al gen *p16*, a menudo la mutilación del DNA en su región reguladora silencia el gen; este fenómeno es un ejemplo de un cambio epigenético que contribuye al desarrollo del cáncer. La mutación en un solo componente de

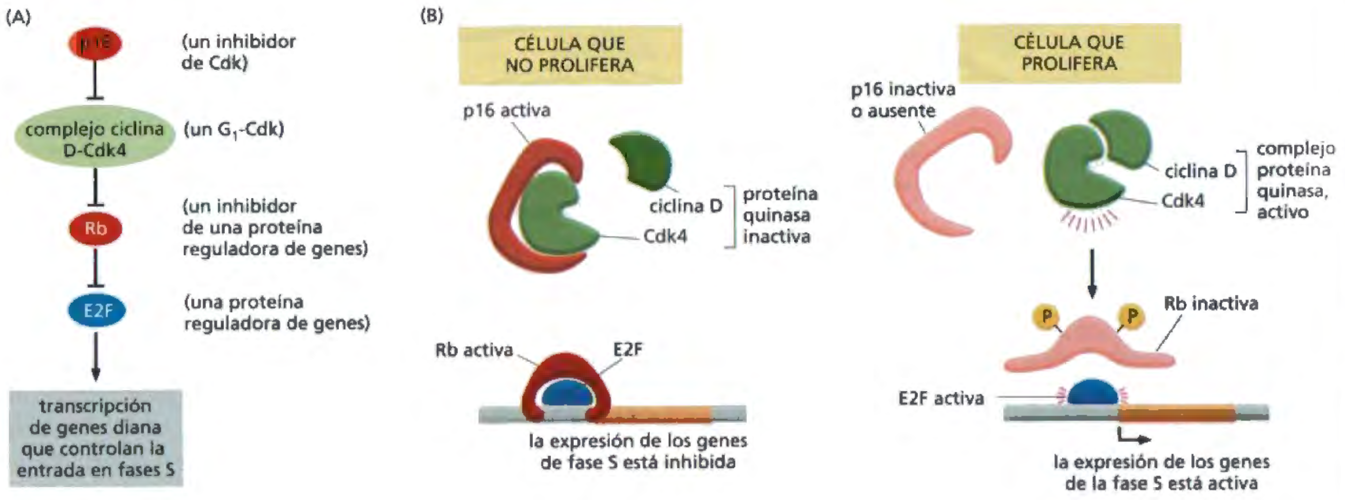


Figura 20–38 La vía por la que Rb controla la entrada en el ciclo celular presenta tanto protooncogenes como genes supresores de tumores. En los cánceres humanos se han encontrado mutaciones en todos los componentes de esta vía (los productos de los protooncogenes, en *verde*; los productos de los genes supresores de tumores, en *rojo*; E2F se muestra en *azul* puesto que tiene acciones estimuladoras o inhibidoras, en función de las proteínas a las que se une). En la mayoría de los casos sólo está alterado uno de los componentes en un tumor individual. (A) Visión simplificada de las relaciones de dependencia en esta vía; para más detalles véase la Figura 17–62. (B) Cuando no está fosforilada, la proteína Rb inhibe la entrada en el ciclo de división celular. El complejo Cdk4 y ciclina D fosforilan Rb, activando así la proliferación celular. Cuando una célula se encuentra en estado de estrés la proteína p16 impide la formación de un complejo Cdk 4-ciclina D activo e impide la proliferación. La inactivación de Rb o de p16 mediante mutación activa la división celular (de forma que cada uno de ellos puede ser considerado como un supresor de tumores) mientras que la sobreactividad de Cdk 4 o de ciclina D activan la división celular (por lo que pueden ser considerados como protooncogenes).

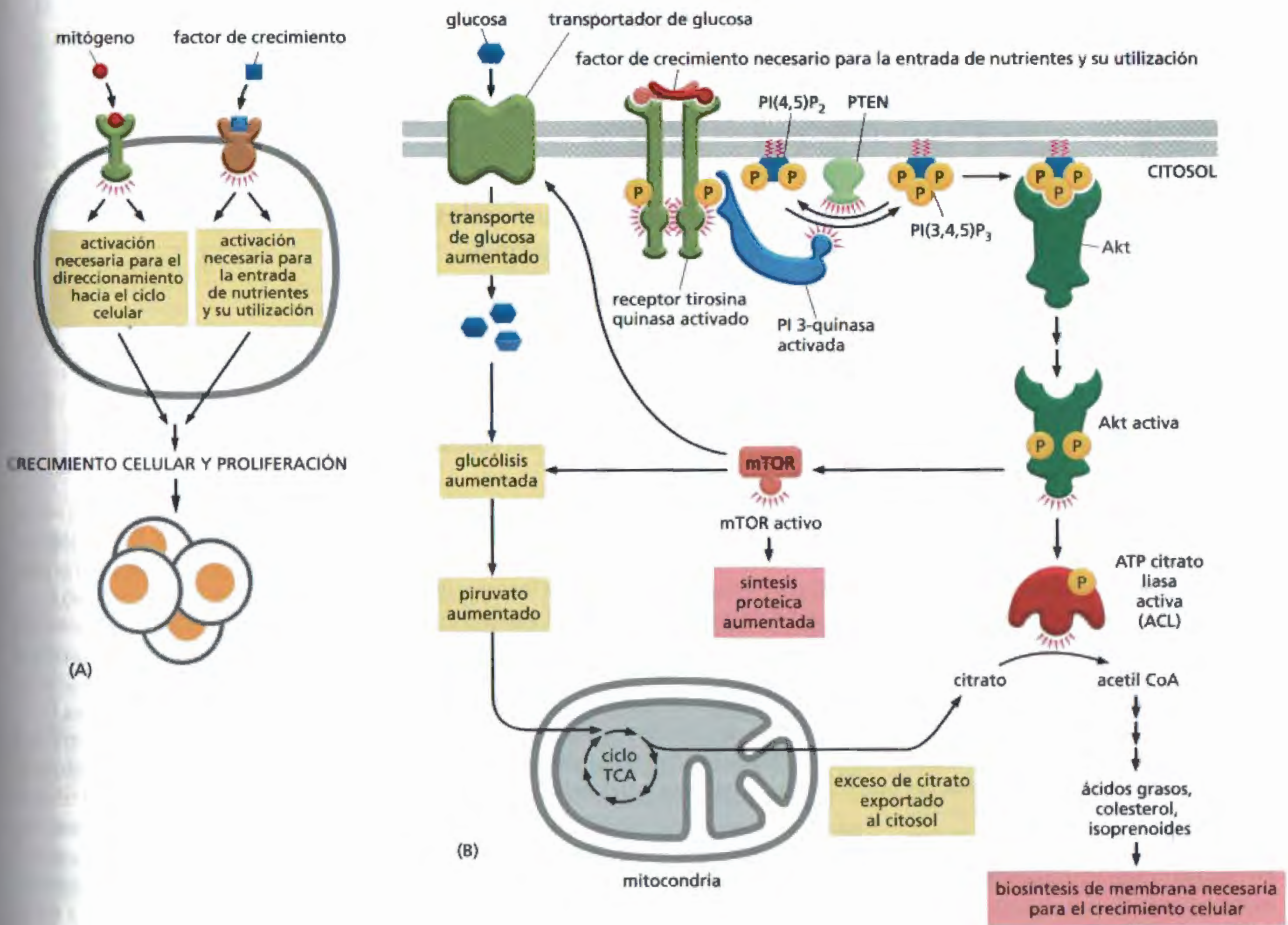
una determinada vía es suficiente para inactivar la vía y favorecer el cáncer. Como se esperaba, un cáncer raramente inactiva más de un componente de una vía: este hecho no proporcionaría ningún beneficio adicional para la evolución del cáncer.

Diferentes vías pueden mediar la desregulación de la progresión a través del ciclo celular y del crecimiento celular en las células cancerosas

Como se describe en el Capítulo 17, un sistema de control especial del ciclo celular asegura que las células eucariotas fabriquen una copia de cada uno de sus cromosomas y segreguen exactamente una copia de cada uno de ellos en cada una de las dos células hijas que se generan durante la división celular. La iniciación de este proceso requiere señales de progreso del ciclo celular que están cuidadosamente reguladas, de forma que el estado por defecto de cada célula en un organismo pluricelular es permanecer en el estado quiescente G_0 (véase p. 1103). Pero la proliferación celular necesita algo más que la progresión a través del ciclo; también necesita un crecimiento celular, que implica procesos anabólicos complejos a través de los cuales la célula sintetiza todas las macromoléculas necesarias a partir de precursores moleculares más pequeños. Si una célula se divide de forma anormal sin crecer primero, será cada vez más pequeña y finalmente morirá. El crecimiento continuado de un cáncer necesita cambios hereditarios que no sólo alteren la progresión a través del ciclo celular sino que también induzcan el crecimiento de la célula (**Figura 20–39**).

La vía de señalización intracelular de la fosfoinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa)/Akt es crítica para el control del crecimiento celular. Como describimos en el Capítulo 15, diversas proteínas señalizadoras extracelulares, incluyendo la insulina y los factores de crecimiento semejantes a la insulina, estimulan esta vía. En las células tumorales, sin embargo, la vía está activada mediante una mutación, de forma que la célula puede crecer en ausencia de estas señales. La activación anormal de la proteína quinasa Akt es crucial para la desregulación del proceso de crecimiento, puesto que esta activación no sólo estimula la síntesis de proteínas (véase Figura 17–65) sino que también aumenta la captación de glucosa (a través de una activación de mTOR) y la producción de acetil CoA en el citosol necesario para la síntesis de lípidos celulares (a través de la activación de ACL), como se pone de relieve en la Figura 20–39. Así pues, una mutación en un gen supresor de tumores que es habitual en muchos tipos distintos de cáncer es la pérdida de la fosfatasa PTEN, cuya función normal es limitar la activación de Akt mediante desfosforilación de las moléculas que fosforila la PI 3-quinasa

La activación anormal de la vía de PI 3-quinasa/Akt, que se produce por lo general de forma temprana en el proceso de progresión tumoral, explica la velocidad excesiva de glucólisis que se observa en las células tumorales, conocido como efecto Warburg. La captación excesiva de glucosa por las células tumorales, acompañada de la excreción del exceso de piruvato en forma de lactato, se utiliza para localizar los tumores gracias a las técnicas modernas de imagen del cuerpo entero (véase Figura 20–1).



Algunas mutaciones en los genes que regulan la apoptosis permiten a las células tumorales sobrevivir cuando no deberían hacerlo

El control del número de células depende del mantenimiento del equilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular. En los centros germinales de los nódulos linfáticos, las células B proliferan muy rápidamente, pero la mayoría de la progenie es eliminada por apoptosis. La regulación correcta de la apoptosis es esencial para mantener el balance normal entre los nacimientos y las muertes celulares en los tejidos que presentan un recambio continuo. También tiene un papel muy importante en la eliminación de las células dañadas o sometidas a estrés. Ya describimos en el Capítulo 18 que en los organismos pluricelulares las células mueren por apoptosis cuando advierten que algo no está funcionando de forma adecuada –cuando su DNA ha sido seriamente dañado o cuando desaparecen las señales de supervivencia que les indican que no se encuentran en el lugar adecuado. Como se ha mencionado (véase Figura 20–14), las células tumorales son relativamente resistentes a la apoptosis y esto les permite crecer cuando no deberían hacerlo.

Las mutaciones en los genes de control de la apoptosis son responsables de esta resistencia. Una proteína que normalmente inhibe la apoptosis, llamada Bcl2, fue descubierta porque su expresión se activa mediante una translocación cromosómica en un linfoma de células B. La translocación sitúa al gen *Bcl2* bajo el control de una secuencia reguladora de DNA que permite una sobreexpresión de la proteína. Este hecho permite sobrevivir a los linfocitos B cuando deberían morir por apoptosis, incrementa en gran medida el número de células B y contribuye al desarrollo de este tipo de cáncer.

Uno de los genes implicados en el control de la apoptosis está mutado de forma excepcional en un número muy amplio de cánceres. Este gen supresor tumoral codifica una proteína que forma parte de un punto de intersección crucial en la red de vías de control intracelular que gobiernan las respuestas celulares al daño en el DNA y a otros tipos de estrés

Figura 20–39 Las células pueden necesitar dos tipos de señales para proliferar. (A) Para multiplicarse con éxito, se sospecha que la mayoría de células normales necesitan tanto señales extracelulares que conduzcan a la célula hacia la progresión en el ciclo celular (se muestra un mitógeno en *rojo*) como señales celulares que induzcan el crecimiento celular (se muestra un factor de crecimiento en *azul*). (B) Diagrama del sistema de señalización formado por Akt que induce el crecimiento celular estimulando la captación de glucosa y su utilización, que incluye la transformación del exceso de ácido cítrico producido en la mitocondria a partir de los intermediarios del azúcar, en acetil CoA, que es necesario en el citosol para la síntesis de lípidos y la producción de nueva membrana. Como se indicó, la síntesis proteica también está incrementada. Este sistema se activa de forma anormal en una etapa temprana de la progresión tumoral.

celular, entre los que se cuentan la hipoxia (niveles bajos de oxígeno) y la falta de factores de crecimiento. Esta proteína es la proteína tumoral p53, producida por el gen *Tp53*, conocido normalmente como *p53*. Como se explicará a continuación, cuando *p53* es defectuoso, las células dañadas genéticamente en división no mueren sino que continúan dividiéndose y acumulan más alteraciones genéticas que pueden aumentar su malignidad.

Algunas mutaciones en el gen *p53* permiten a las células tumorales sobrevivir y proliferar aunque presenten alteraciones en su DNA

El gen ***p53*** –denominado así por el peso molecular de su producto proteico– puede ser el gen más importante para prevenir el cáncer humano. En casi todos los tumores humanos, el propio gen supresor tumoral o alguno de los componentes de la vía de p53 están mutados. ¿Qué hace que *p53* sea un gen tan crítico? La respuesta se encuentra en sus múltiples funciones en el control del ciclo celular, en la apoptosis y en el mantenimiento de la estabilidad genética –todos ellos aspectos fundamentales de la función de *p*53 que protegen al organismo de las consecuencias del daño celular y del riesgo de cáncer.

Al contrario que Rb, la mayoría de las células del organismo tienen muy poca cantidad de p53: aunque se produce síntesis de proteína, esta se degrada rápidamente. De hecho, la proteína p53 no es necesaria para el desarrollo normal. Los ratones que presentan mutadas o delecionadas ambas copias del gen, se desarrollan de forma normal en todos los aspectos excepto en uno: por lo general desarrollan cáncer antes de los 10 meses de edad. Estas observaciones sugieren que p53 debe tener una función que sólo es necesaria en circunstancias especiales. De hecho, cuando a las células normales se les priva de oxígeno o están expuestas a tratamientos que dañan el DNA, como la luz ultravioleta o los rayos gamma, incrementan la cantidad de p53 que presentan reduciendo la tasa de eliminación de la molécula. La acumulación de p53 también se ha observado en células en las que los oncogenes *Ras* y *Myc* están activos de forma extraordinaria y provocan un estímulo anormal para el proceso de división celular.

En todos estos casos, los niveles elevados de p53 actúan limitando el daño producido. En función de las circunstancias y del grado de la alteración, la proteína p53 puede inducir el suicidio por apoptosis –un acontecimiento relativamente inocuo para un organismo pluricelular– de una célula que está dañada o que está proliferando de forma anormal. También activa un mecanismo que impide que la célula se divida mientras el daño no sea reparado. De forma parecida, cuando los telómeros son demasiado cortos, p53 se activa y se inhiben las divisiones celulares posteriores, produciéndose el fenómeno de senescencia celular replicativa (**Figura 20–40**). La protección que proporciona p53 es una de las razones por las cuales las mutaciones que activan oncogenes como *Ras* y *Myc* no son suficientes por sí solas para generar un tumor.

La proteína p53 realiza su trabajo actuando como una proteína reguladora de genes. <TGAA> De hecho, las mutaciones más comunes de p53 observadas en los tumores humanos se encuentran en su dominio de unión al DNA, donde eliminan la capacidad de p53 para unirse a sus secuencias diana. Como se describió en el Capítulo 17, la proteína p53 ejerce sus efectos inhibidores en el ciclo celular, al menos en parte, uniéndose al DNA e induciendo la transcripción de *p21*, que codifica una proteína que se une a los complejos Cdk nece-

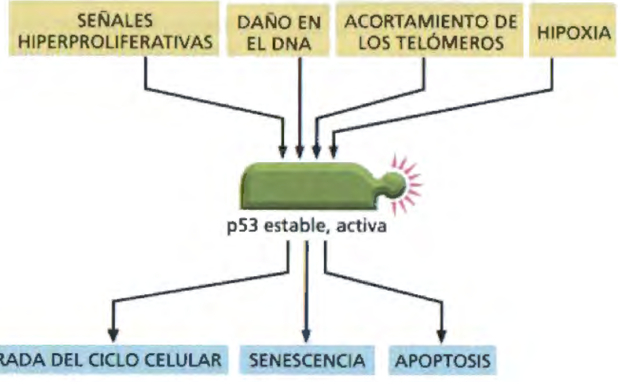


Figura 20–40 Modos de actuación del supresor de tumores p53. La proteína p53 es un sensor de estrés celular. Como respuesta a las señales de hiperproliferación, el daño en el DNA, la hipoxia y acortamiento de los telómeros, los niveles de p53 aumentan y provocan la parada del ciclo celular, la apoptosis o la senescencia celular replicativa. (Como se describió en el Capítulo 17, una célula senescente pierde progresivamente la capacidad para dividirse.) Todos estos procesos mantienen bajo control el crecimiento de un tumor.

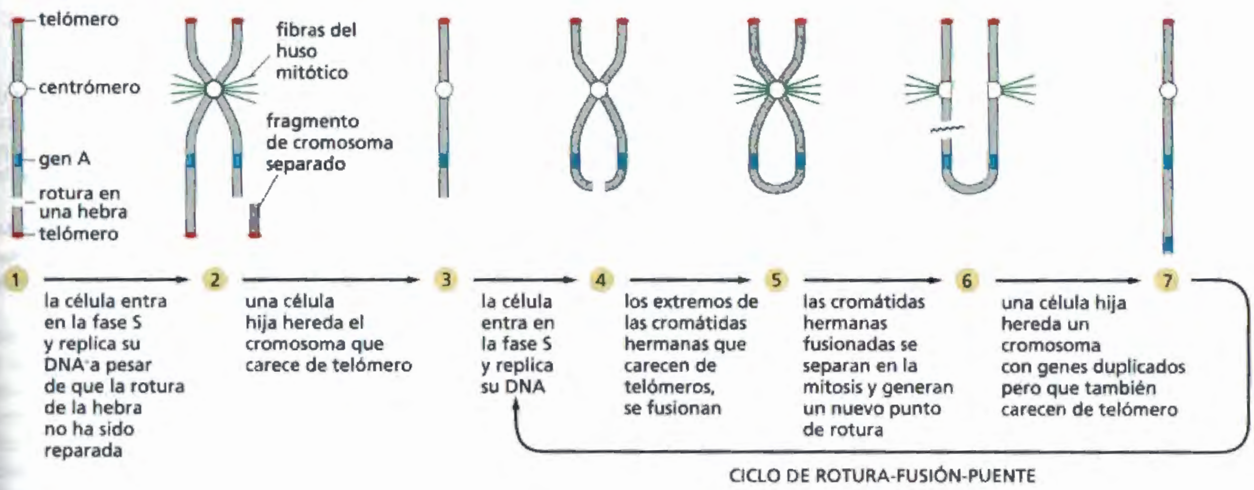


Figura 20–41 La replicación del DNA dañado puede conducir a anormalidades cromosómicas, como la amplificación génica y la pérdida de genes. El esquema muestra uno de los varios mecanismos posibles. El proceso empieza con el daño accidental del DNA en una célula que carece de proteína p53 funcional. En lugar de detenerse en el punto de control dependiente de p53 de la fase G_1 del ciclo de división celular, como haría una célula normal con el DNA dañado mientras su DNA no estuviera reparado, la célula que no tiene proteína p53 entra en la fase S con las consecuencias que se muestran. Cuando se ha generado un cromosoma que contiene una duplicación y carece de telómero, rondas repetidas de replicación, fusión de cromátidas y roturas desiguales (el llamado ciclo de rotura-fusión-puente) pueden incrementar aún más el número de copias de la región duplicada. Por lo tanto, la selección a favor de las células, que presentan un número aumentado de copias de un gen en la región afectada del cromosoma, dará lugar a mutantes en los que el gen se amplifica, obteniéndose un elevado número de copias. Las copias pueden llegar a ser visibles –tanto a través de un acontecimiento de recombinación como de una rotura no reparada de una hebra de DNA– como una región teñida homogéneamente en el cromosoma, o pueden delecionarse de su locus original y aparecer como cromosomas dobles diminutos individuales (véase Figura 20–34). El desorden cromosómico también puede comportar la pérdida de genes, de forma que la selección favorece a las células que han perdido los supresores tumorales.

sarios para la progresión a través del ciclo celular. Al bloquear la actividad quinasa de estos complejos Cdk, la proteína p21 impide que la célula entre en la fase S y, en consecuencia, inhibe la replicación de su DNA.

Los mecanismos mediante los cuales p53 induce apoptosis son mucho más complejos; puede estimular la expresión de muchos genes proapoptóticos, pero también puede unirse e inactivar a las proteínas antiapoptóticas Bcl2 en la superficie de la mitocondria, facilitando así la apoptosis (descrito en el Capítulo 18).

Las células que tienen alteraciones en la proteína p53 no presentan estas respuestas a p53 dependientes del estrés. Escapan a la apoptosis y aunque su DNA esté dañado, continúan dividiéndose y replicando el DNA de forma ininterrumpida sin que se pueda reparar ni el daño inicial, ni las lesiones posteriores que van apareciendo. Como resultado de todo ello pueden morir o, lo que es aún peor, pueden sobrevivir y proliferar con el genoma alterado (**Figura 20–41**). Estas mutilaciones genéticas pueden comportar tanto la pérdida de genes supresores de tumores como la activación de oncogenes. Las células sin p53 son menos sensibles a las irradiaciones y a muchos fármacos antitumorales, que provocarían su muerte o impedirían su proliferación.

Resumiendo, la proteína p53 ayuda a los organismos pluricelulares a reparar el daño en el DNA y otros desórdenes celulares, actuando como controlador de la proliferación celular en circunstancias que podrían ser peligrosas para las células. Así pues, la pérdida de actividad de la proteína p53 es peligrosa porque puede producir cáncer por cuatro razones distintas. Primero, porque permite a las células mutadas continuar dividiéndose. Segundo, porque les permite escapar a la apoptosis. Tercero, porque conduce a la inestabilidad genética característica de las células tumorales, permitiendo que las mutaciones que favorecen el cáncer se acumulen a medida que las células se van dividiendo. Y cuarto, hace que las células tumorales de algunos tipos de tumores sean resistentes a los fármacos antitumorales y a las irradiaciones. Muchas otras mutaciones pueden contribuir a uno u otro de estos comportamiento alterados, pero las mutaciones en p53 contribuyen a todos ellos.

Los virus tumorales de DNA bloquean la actividad de los genes clave supresores de tumores

Los virus tumorales de DNA pueden producir cáncer interfiriendo en los controles celulares de ciclo celular y apoptosis, incluyendo los que dependen de la proteína p53. Para comprender esta carcinogénesis vírica es importante entender la historia vital de los virus. La mayoría de virus de DNA utilizan la maquinaria de replicación de la célula huésped para replicar sus propios genomas. Para producir muchas partículas infecciosas a partir de una sola célula huésped, el DNA del virus tiene que controlar esta maquinaria y activarla superando las restricciones normales de la replicación del DNA y por lo general matando a la célula huésped en el proceso. Muchos virus de DNA sólo se reproducen de esta forma. Sin embargo, algunos virus también tienen otra opción: propagar su genoma de forma tranquila, como un pasajero bien educado dentro de la célula huésped, replicándose en paralelo al DNA celular durante los ciclos normales de división de la célula. Estos virus, de

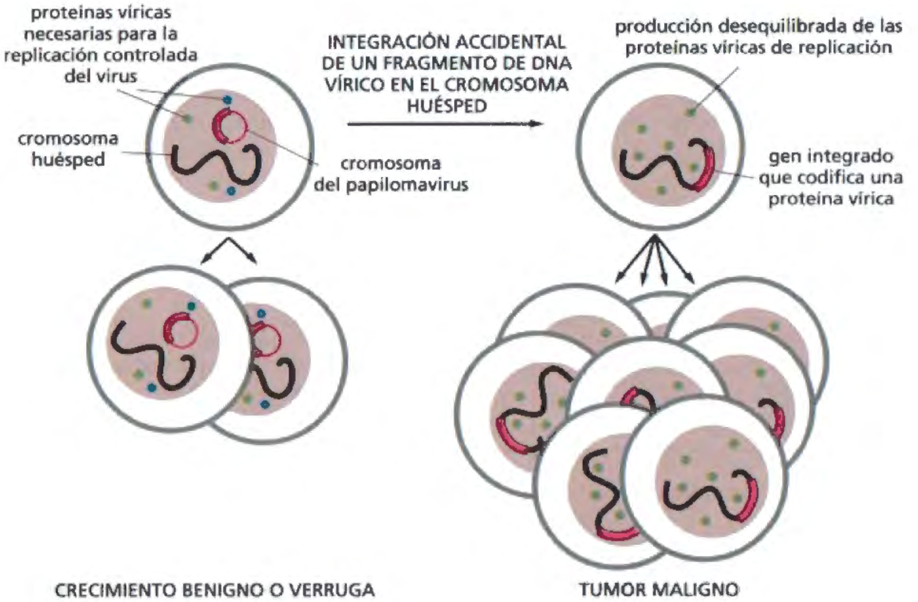


Figura 20–42 De qué manera ciertos papilomavirus podrían desencadenar el cáncer del cuello de útero. Los papilomavirus tienen cromosomas de DNA circulares de doble cadena con unos 8000 pares de nucleótidos. Normalmente, estos cromosomas se mantienen estables en las células basales del epitelio como plásmidos cuya replicación está controlada, manteniéndose en el mismo estadio que los cromosomas de la célula huésped (*izquierda*). Accidentes poco frecuentes causan la integración de un fragmento del plásmido en el cromosoma del huésped y alteran el entorno de los genes virales en las células basales. Este fenómeno (o posiblemente algunas otras causas) desorganizan el control de la expresión del gen vírico. La producción descontrolada de proteínas de replicación víricas interfiere con el control de la división celular y facilita así la génesis de un cáncer (*derecha*).

acuerdo con sus circunstancias, pueden escoger entre estos dos modos de existencia, permaneciendo latentes e inofensivos durante mucho tiempo o proliferando en células ocasionales en un proceso que mata a la célula huésped y genera un gran número de partículas infecciosas.

Estos DNA víricos, que presentan la capacidad de replicar su DNA en forma de pasajeros quiescentes en una fase latente de replicación vírica, pueden integrar su genoma vírico en uno o más de los cromosomas del huésped, o pueden tener la capacidad para formar plásmidos extracromosómicos que se replican con los cromosomas del huésped durante la fase latente.

Independientemente del tipo de "vida" que siguen los virus de DNA, su intención no es matar al organismo huésped. Pero en los virus con fase de latencia, se pueden producir accidentes que activen de froma prematura algunas de las proteínas víricas que los virus utilizarían en su fase replicativa para permitir que el DNA vírico se replique de forma independiente del ciclo celular. Este tipo de accidente puede inducir una proliferación persistente de la célula huésped que provocará cáncer; a los virus de DNA susceptibles de sufrir estos accidentes se les ha llamado **virus tumorales de DNA**.

Los **papilomavirus**, por ejemplo, son los responsables de las verrugas humanas y son especialmente importantes como factor causal clave en los carcinomas de cuello uterino (cerca de un 6% de los tumores humanos). Los papilomavirus infectan el epitelio cervical y se mantienen en una fase latente en las células basales de la epidermis en forma de plásmidos extracromosómicos que se replican a la vez que los cromosomas. Las partículas víricas infecciosas se generan a través de un cambio replicativo en las capas epiteliales más externas, en las que las células empiezan a diferenciarse antes de ser eliminadas en la superficie. En este punto, la división celular tiene que pararse, pero los virus interfieren con este mecanismo de parada permitiendo la replicación rápida de su propio genoma. Por lo general, este fenómeno está restringido a las capas epiteliales exteriores por lo que resulta relativamente inofensivo, como ocurre en una verruga. Sin embargo, a veces, un accidente genético provoca que los genes víricos que codifican las proteínas que impiden la parada del ciclo celular, se integren en el cromosoma huésped y se transformen en activos en las láminas basales, donde se encuentran las células progenitoras. Este hecho puede provocar un cáncer en el que los genes víricos actúan como oncogenes (**Figura 20–42**).

En los papilomavirus, los genes responsables de este proceso se llaman *E6* y *E7*. Los productos proteicos de estos oncogenes víricos interactúan con muchas proteínas de las células huésped, pero particularmente se unen a los productos proteicos de dos genes supresores de tumores clave en la célula huésped, inactivándolos y permitiendo a la célula replicar su DNA y dividirse de forma descontrolada. Una de estas proteínas huésped es Rb: mediante su unión a Rb, la proteína vírica E7 impide que Rb se una a las proteínas inhibidoras E2F mencionadas, que permiten una entrada incontrolada en la fase S. La otra proteína huésped inactivada por los virus es p53; mediante la unión a p53, la proteína vírica E6 destruye la pro-

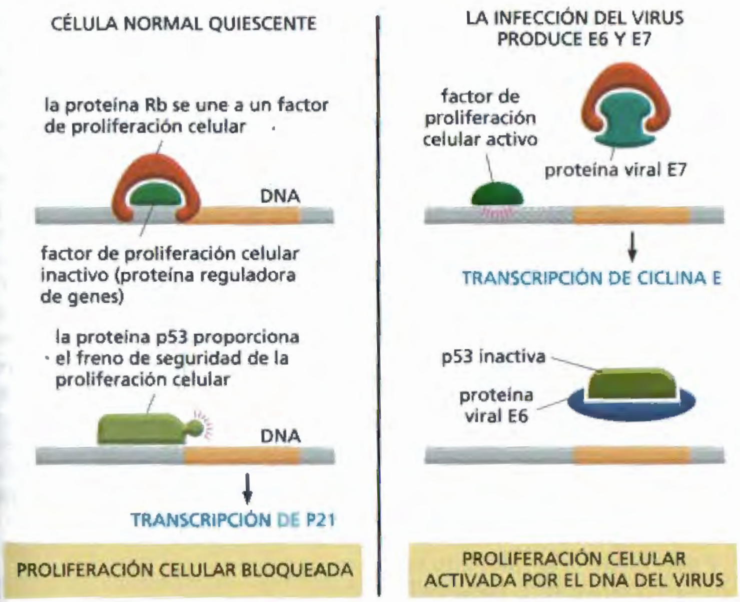


Figura 20–43 Activación de la proliferación celular por un virus tumoral de DNA. El papilomavirus produce dos proteínas víricas, E6 y E7, que secuestran las proteínas del huésped Rb y p53, respectivamente. La unión de la proteína E6 comporta la ubiquitinación de su pareja p53 e induce la proteolisis de p53 (no se muestra). El virus SV40 (un virus relacionado que infecta a los monos) utiliza una sola proteína, llamada antígeno T, para secuestrar las mismas proteínas.

proteína p53 (**Figura 20–43**), permitiendo que la célula anormal sobreviva, se divida, y así acumule de forma progresiva un número mayor de anormalidades. Otros virus de DNA tumorales utilizan mecanismos parecidos para inhibir Rb y p53, lo que subraya la importancia de la inactivación de estas dos vías supresoras de tumores liberando las restricciones normales de la proliferación celular. Es sorprendente que casi todos los cánceres humanos tengan también inactivadas ambas vías, habitualmente con sólo un componente afectado en cada una de ellas.

Las mutaciones que permiten las metástasis todavía constituyen un misterio

Quizá la falta de información más significativa que todavía tenemos en el conocimiento sobre el cáncer está relacionado con la capacidad de invasión y la metástasis. Es necesario identificar claramente las mutaciones que permiten a las células, de forma específica, invadir los tejidos circundantes y expandirse por el organismo para formar metástasis. De hecho, incluso se desconoce cuáles son las propiedades que tiene que adquirir una célula cancerosa para convertirse en metastásica. Un punto de vista extremo es que las células tumorales del organismo para producir metástasis no necesitan más cambios genéticos que los necesarios para debilitar los controles normales de crecimiento celular, división celular y muerte celular. Algunos experimentos que utilizan los microchips de DNA, para comparar los mRNA expresados en las metástasis y en los tumores primarios, confirman este punto de vista. El punto de vista opuesto a éste, defendido más habitualmente, sostiene que la metástasis constituye una característica muy difícil y compleja para las células, por lo que requieren una gran cantidad de nuevas mutaciones –tantas y tan variadas dependiendo de las circunstancias, que es muy difícil descubrirlas de forma individual.

Un cambio molecular en las células tumorales metastásicas de una gran variedad de tumores –incluyendo melanomas y carcinomas de mama, estómago e hígado– es una sobreexpresión de la GTPasa de la familia de Rho, *RhoC*, que colabora en la motilidad celular mediada por la actina. En algunos casos, la inhibición de la actividad de RhoC en estas células es suficiente para bloquear su capacidad metastásica. Sin embargo, todavía no se conoce con exactitud cómo RhoC contribuye a favorecer la metástasis.

Las metástasis presentan problemas distintos en los distintos tipos celulares. Para una célula de la línea blanca sanguínea, que por lo general viaja por el organismo a través de la circulación, la metástasis debería ser más fácil que para la célula de un carcinoma que tiene que escapar del epitelio. Como se indicó anteriormente, es útil diferenciar dos fases en la progresión del tumor necesarias para que un carcinoma produzca metástasis. Primero, las células tumorales tienen que escapar de los confines habituales del epitelio donde se han producido e invadir los tejidos circundantes. En la segunda etapa, tienen que viajar a lugares lejanos a través de la sangre o la linfa y establecer *metástasis*.

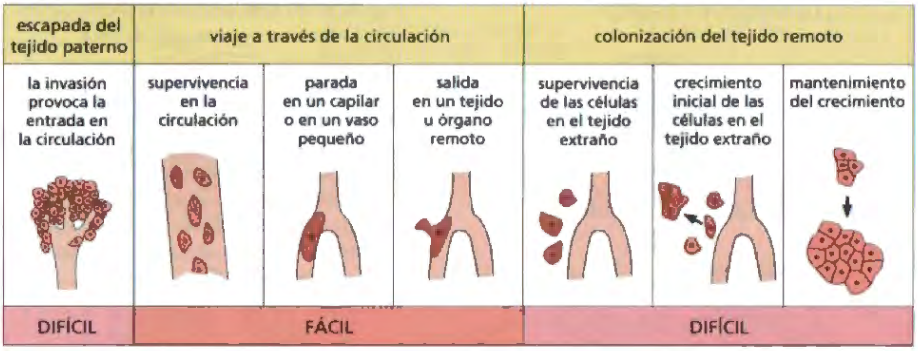


Figura 20–44 Las barreras a la metástasis. Estudios de células tumorales marcadas –que abandonan el lugar del tumor, entran en la circulación y establecen metástasis– muestran que etapas del proceso metastático –resaltadas en la Figura 20–17– son difíciles o "ineficientes", en el sentido de que son etapas en las que se pierde un gran número de células. En estas etapas difíciles, las células altamente metastáticas son seleccionadas por su posibilidad de sobrevivir con éxito respecto de las células no metastáticas. Parece que la capacidad de escapar del tejido en el que se originaron y de sobrevivir y crecer en un tejido ajeno son propiedades clave que las células tienen que adquirir para convertirse en metastáticas. (Adaptado de A.F. Chambers et al., *Breast Cancer Res.* 2:400-407, 2000. Con la autorización de BioMed Central Ltd.)

La primera etapa, la invasión local, requiere la desaparición de los mecanismos que habitualmente mantienen juntas las células en un epitelio. Como hemos mencionado, esta etapa se parece al proceso conocido como *transición epitelio-mesénquima (EMT)* que se produce durante el desarrollo normal, en el cual las células epiteliales sufren unos cambios morfológicos que las convierten en menos adhesivas y más migratorias (descrito en el Capítulo 19). En el corazón de estas transiciones encontramos cambios en la expresión del gen de la *cadherina-E*. La función más importante de la proteína cadherina-E es la adhesión célula-célula y es especialmente importante en la unión de las células epiteliales a través de las uniones adherentes (véase Figura 19–15). En algunos carcinomas de estómago y de mama, el gen de la *cadherina-E* ha sido identificado como un gen supresor de tumores. El comportamiento anormal de las células tumorales que han perdido la proteína puede revertirse parcialmente, al menos en cultivo: si se introduce un gen funcional de *cadherina-E* en estas células tumorales, pierden algunas de las propiedades invasoras y empiezan a unirse de forma más parecida a como lo hacen las células normales. Así pues, la pérdida de *cadherina-E* puede favorecer el cáncer contribuyendo especialmente a la invasión local.

La entrada de las células tumorales en la circulación se ve facilitada por la presencia de un conjunto de vasos sanguíneos muy densos y algunas veces de vasos linfáticos, que los tumores atraen hacia sí mediante la secreción de factores angiogénicos como el VEGF, como ya se ha descrito; la fragilidad y debilidad anormales de estos nuevos vasos ayuda a las células a transformarse en invasoras, de forma que entran y se desplazan con facilidad por la circulación sanguínea y linfática. Las últimas etapas de la metástasis, que incluyen la salida de los vasos sanguíneos o linfáticos y la colonización eficiente de los lugares remotos por estas células, son mucho más difíciles de estudiar. Para descubrir cuáles son las últimas etapas en las metástasis de las células tumorales que tienen grandes dificultades, se pueden marcar las células con un marcador fluorescente o con la proteína fluorescente verde (GFP), inyectarlas en el torrente sanguíneo de un ratón y observar qué sucede. En estos experimentos, se observa que la mayoría de las células sobreviven en la circulación, se introducen en los vasos de pequeño calibre y salen de ellos hacia los tejidos circundantes con independencia de si procedían de un tumor metastático o no metastático. Algunas células mueren inmediatamente al entrar en el tejido ajeno, otras sobreviven a la entrada en el tejido ajeno pero no pueden proliferar; otras se dividen unas cuantas veces y luego se detienen formando micrometástasis, formadas por un número de células que va de diez a algunos miles. En este punto, las células metastásicas superan a las no metastásicas y forman los tumores, indicando que la capacidad para continuar proliferando en un tejido ajeno (proceso llamado *colonización*) es una propiedad clave que las células tumorales tienen que adquirir para transformarse en metastásicas (**Figura 20–44**).

El reto está en usar ensayos similares para descubrir a nivel molecular qué diferencia a una célula que coloniza de otra que no puede hacerlo. Una posibilidad, analizada anteriormente, es que las células capaces de colonizar son miembros poco habituales de la población tumoral parental que poseen las características de células progenitoras tumorales. Parece que esto sería parte de la historia, como ya hemos explicado. Pero, aunque conocemos los marcadores que permiten identificar a las células progenitoras tumorales, al menos en algunos cánceres, todavía no comprendemos qué es lo que les proporciona las propiedades especiales de célula progenitora. Esta cuestión forma parte de un gran problema en el conocimiento de las células progenitoras en general, tratado extensamente en el Capítulo 23. En cualquier caso, resulta muy difícil determinar qué cambios genéticos o epigenéticos son necesarios para permitir que las células madre cancerosas colonicen los tejidos.

Los tumores colono-rectales evolucionan lentamente a través de una sucesión de cambios visibles

Al comienzo del capítulo se expuso que la mayoría de tumores se desarrollan gradualmente desde una sola célula anormal y progresan de benignos a malignos mediante la acumulación de un número independiente de accidentes genéticos. Después de describir cuáles son estos accidentes y cambios desde un punto de vista molecular y cómo contribuyen al comportamiento canceroso, se examinará ahora con más detalle uno de los cánceres humanos más comunes, para ilustrar y ahondar en algunos de los principios generales y de los mecanismos moleculares de los que hemos tratado, y para ver cómo podemos darle un sentido a la historia natural de la enfermedad desde este punto de vista. Tomamos como ejemplo el **cáncer colono-rectal**, en el cual se han podido seguir *in vivo* las etapas de la progresión tumoral mediante colonoscopia (dispositivo de fibra óptica para visualizar el interior del colon y del recto) y se ha estudiado cuidadosamente a nivel molecular. Este modelo, basado en estudios tanto de las formas esporádicas como de las hereditarias de la enfermedad, sirve como paradigma para ilustrar la naturaleza progresiva del desarrollo de un tumor y permite asociar estadios morfológicos específicos con cambios hereditarios en la función de algunos genes concretos.

Los tumores colono-rectales aparecen en el epitelio que bordea el colon (intestino grueso) y el recto (la parte más baja del intestino). La organización de este tejido es muy parecida a la del intestino delgado, descrita con detalle en el Capítulo 23 (pp. 1436-1442). Ambas regiones del epitelio del intestino se renuevan a una velocidad extraordinariamente rápida, tardando una semana para sustituir por completo toda la capa epitelial. En ambas zonas, la renovación depende de células progenitoras que yacen en profundos surcos del epitelio, llamados criptas intestinales. Las señales que mantienen las células progenitoras y controlan la organización normal y la renovación del epitelio están empezando a ser comprendidas, como explicamos en el Capítulo 23. Este hecho es en su mayor parte gracias a los descubrimientos proporcionados por la investigación del cáncer. Las mutaciones que interrumpen las señales organizadoras normales inician el proceso de progresión tumoral en la mayoría de cánceres colono-rectales.

Los cánceres colono-rectales son muy comunes, por lo general provocan más de 60.000 muertes al año en Estados Unidos y representan cerca del 10% del total de muertes por cáncer. Como la mayoría de los cánceres, no son diagnosticados hasta edades avanzadas (el 90% después de los 55 años). Sin embargo, el examen rutinario de los individuos adultos mediante colonoscopia a menudo revela pequeños tumores benignos, o adenomas, del epitelio intestinal que forman unas protrusiones de tejido conocidas como *pólipos* (**Figura 20–45**A; véase también Figura 23–23). Se cree que estos pólipos adenomatosos son los precursores de una gran proporción de los tumores colono-rectales. Puesto que habitualmente la progresión de la enfermedad es muy lenta, existe un periodo de entre 10 y 35 años en los cuales el tumor, de lento crecimiento, puede ser detectado sin que todavía se haya transformado en maligno. Así, cuando se examina a las personas mediante colonoscopia a los 50 años y se les extirpan los pólipos –un proceso quirúrgico rápido y fácil– la incidencia posterior de cáncer colono-rectal es muy baja –de acuerdo con algunos estudios, menos de una cuarta parte lo desarrolla.

El cáncer de colon constituye un buen ejemplo del fenómeno de la progresión tumoral que hemos descrito. En los pólipos de menos de 1 cm de diámetro, las células y su disposición en el epitelio parecen casi normales. En los pólipos más grandes se encuentran células anormalmente indiferenciadas y que forman estructuras de organización alterada. Algunas veces pueden diferenciarse dos o más partes dentro de un mismo pólipo, una de ellas de apariencia normal y la otra totalmente cancerosa, como si se hubieran producido a partir de un subclon mutado dentro del clon original de células adenomatosas. En los estadios finales de la enfermedad, las células tumorales se transforman en invasoras, rompen la lámina basal y se dispersan a través de la capa muscular que rodea el intestino (véase Figura 20–45B); por último, forman metástasis hacia los nódulos linfáticos, el hígado, el pulmón y otros tejidos.

Algunas lesiones genéticas clave son comunes a una gran cantidad de cánceres colono-rectales

¿Cuáles son las mutaciones que se acumulan con el tiempo y que producen toda esta cadena de acontecimientos? De todos los genes implicados en el cáncer colono-rectal, frecuen-

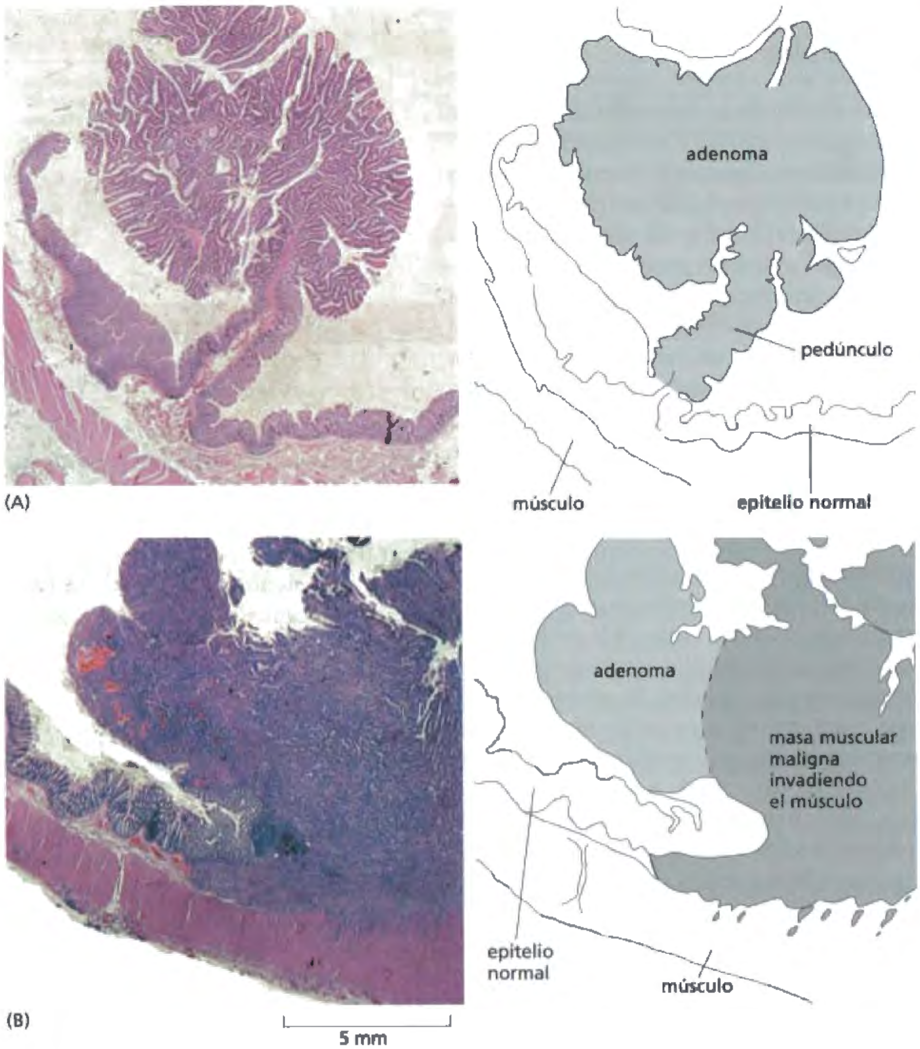


Figura 20–45 Sección transversal que muestra los estadios en el desarrollo de un cáncer de colon típico. (A) Pólipo adenomatoso del colon. El pólipo sobresale en el lumen del colon –el espacio del interior del colon. El resto de la pared del colon está recubierta con epitelio de colon normal; en el pólipo el epitelio aparece algo anormal. (B) Carcinoma que ha empezado a invadir la capa muscular subyacente. (Cortesía de Paul Edwards.)

temente tres se encuentran mutados, el protooncogén *K-Ras* (un miembro de la familia génica de *Ras*) y los genes supresores de tumores *p53* y *Apc* (descrito más adelante). En un número menor de tumores de colon participan otros genes (**Tabla 20–2**). Y aún quedan otros por identificar.

Una aproximación para descubrir las mutaciones responsables del cáncer colono-rectal consiste en rastrear las células en búsqueda de anormalidades en los genes que ya se conocen o se sospecha que pueden estar implicados en los tumores. Este tipo de análisis genético ha permitido descubrir que cerca del 40% de los tumores colono-rectales presentan una mutación puntual específica del gen *K-Ras*, que lo transforma en un oncogén, y cerca del 60% presenta mutaciones o deleciones que inactivan *p53*.

Tabla 20–2 Algunas anormalidades genéticas detectadas en células de cáncer colono-rectal

GEN	CLASE	VÍA AFECTADA	CÁNCERES HUMANOS DE COLON (%)
K-Ras	oncogén	señalización receptores tirosina quinasa	40
catenina-β[1]	oncogén	señalización Wnt	5-10
Apc[1]	supresor de tumores	señalización Wnt	> 80
p53	supresor de tumores	respuesta al estrés y al daño en el DNA	60
receptor II del TGFβ[2]	supresor de tumores	señalización del TGFβ	10
Smad4[2]	supresor de tumores	señalización del TGFβ	30
MLH1 y otros genes de reparación del DNA	supresor de tumores (estabilidad genética)	reparación del DNA	15 (a menudo silenciados por metilación)

Los genes con el mismo superíndice actúan en la misma vía y, por lo tanto, en cada cáncer sólo se encuentra mutado uno de los componentes.

Como se ha explicado anteriormente, otra aproximación para encontrar los genes críticos del cáncer consiste en analizar las alteraciones genéticas en aquellas raras familias que muestran una predisposición hereditaria al cáncer colono-rectal. El primero de estos síndromes colono-rectales hereditarios por estudiar se conoce como *poliposis coli adenonamotosa familiar* (*FAP: familiar adenomatous polyposis*), en el que aparecen cientos o miles de pólipos a lo largo de todo el colon (**Figura 20–46**). Aparecen de forma temprana en la vida adulta, y si no son extirpados, es casi inevitable que uno o más de ellos progrese y se convierta en maligno; por término medio pasan 12 años desde la primera detección de los pólipos hasta el diagnóstico del cáncer. La enfermedad es debida a una deleción o inactivación del gen supresor de tumores *Apc*, llamado así por el síndrome al que da lugar. Los individuos que padecen FAP presentan mutaciones inactivadoras o deleciones de una copia del gen *Apc* en todas las células de su organismo y presentan pérdida de heterozigosis en los tumores, incluso en los pólipos benignos. La mayoría de pacientes con cáncer colono-rectal no presentan la forma hereditaria. Pero más del 80% de estos tumores (aunque no en las células normales) tienen inactivadas ambas copias del gen *Apc* mediante mutaciones adquiridas a lo largo de la vida. Así pues, por un camino parecido al comentado en el caso del retinoblastoma, la mutación de *Apc* representa uno de los factores centrales en el cáncer colono-rectal.

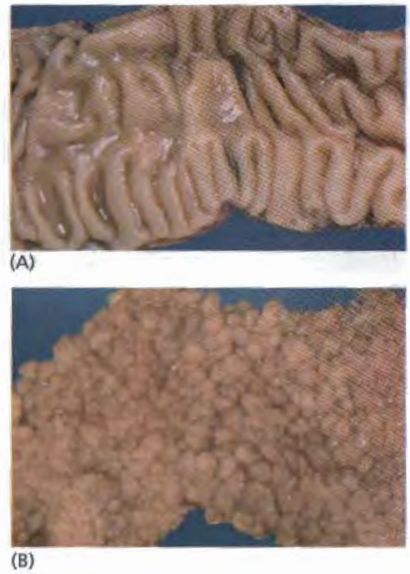


Figura 20–46 Colon de un paciente con poliposis adenomatosa familiar comparado con un colon normal. (A) El colon normal está ligeramente ondulado pero con una superficie lisa. (B) El colon polipósico está cubierto por completo por cientos de pólipos (un de ellos se muestra en la Figura 20–45), cada uno de los cuales parece una diminuta coliflor cuando se observa a simple vista. (Cortesía de Andrew Wyllie y Mark Arends.)

Como hemos indicado, incluso cuando no existe síndrome hereditario, los genes supresores de tumores también pueden ser identificados buscando cambios genéticos adquiridos durante la evolución de las células tumorales. Un análisis sistemático de los tumores colono-rectales revela que regiones determinadas de ciertos cromosomas presentan frecuentemente las mismas secuencias de DNA en los cromosomas heredados tanto paternos como maternos. Esta pérdida de heterozigosis sugiere que estas regiones presentan genes supresores de tumores. Una de estas regiones es la del gen *Apc*. Otra región de este tipo es la del gen *Smad4*, que se encuentra mutado en cerca del 30% de los cánceres de colon; su eliminación bloquea el efecto inhibidor del crecimiento de la vía de TGFβ. En los tumores de colon se pierden o se ganan fragmentos específicos de otros cromosomas que serán dianas donde buscar genes críticos para el cáncer adicionales.

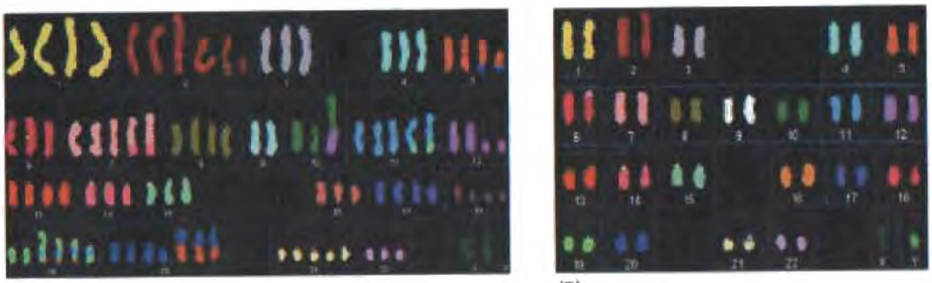
A medida que se amplía el conocimiento sobre los genes y sus funciones, se ha podido diseñar otra aproximación fructífera que se centra en la búsqueda de genes que codifican proteínas que interactúan con proteínas codificadas por genes conocidos críticos para cáncer, esperando que estos genes también puedan ser dianas para las mutaciones. Actualmente sabemos que la proteína Apc es un componente inhibidor de la *vía de señalización de Wnt* (tratado en el Capítulo 15). Actúa uniéndose a la *catenina-β*, otro componente de la vía y ayuda a inducir su degradación. Inhibiendo la catenina-β, Apc impide que la catenina–β migre hacia el núcleo donde actúa como regulador transcripcional para mantener el estado de célula progenitora, como describimos en el Capítulo 23. La pérdida de Apc comporta un exceso de catenina-β libre y, en consecuencia, una expansión incontrolada de la población de células progenitoras y un incremento masivo del número y el tamaño de las criptas intestinales (véase Figura 23–23).

Cuando se secuenció el gen de la *catenina-β* en un conjunto de tumores colono-rectales, una elevada proporción de los escasos tumores que no presentaban mutaciones en *Apc* tenían mutaciones activadoras en el gen de la *catenina-β*. Por tanto, más que un solo oncogén o un solo gen supresor de tumores de la vía, lo que es crítico para el inicio de este cáncer es una actividad excesiva de la vía de señalización de Wnt. Este dato está de acuerdo con el principio general de que en un cáncer determinado raramente se producen mutaciones en más de un componente en una vía crítica para la tumorogénesis, ya que no supone ninguna ventaja competitiva.

Sin embargo ¿por qué el gen *Apc* en particular es el responsable más común en el cáncer colono-rectal? La proteína Apc es grande e interactúa no sólo con la catenina–β sino también con otros componentes celulares incluyendo a los microtúbulos. Parece que la pérdida de Apc aumenta la frecuencia de defectos en el huso mitótico que comportan anormalidades en los cromosomas cuando la célula se divide. Este efecto promotor del cáncer, adicional e independiente, podría explicar por qué las mutaciones de *Apc* aparecen tan frecuentemente como la causa del cáncer colono-rectal.

Algunos cánceres colono-rectales presentan errores en el apareamiento del DNA durante su reparación

Además de la enfermedad hereditaria (FAP) asociada con las mutaciones de *Apc*, existe un segundo tipo, más común, de predisposición hereditaria al carcinoma de colon, en la que el



(A) (B)

Figura 20–47 Conjuntos de cromosomas (cariotipos) de cánceres de colon que muestran distintos tipos de inestabilidades genéticas. (A) Cariotipo de un cáncer típico con grandes anormalidades en el número de cromosomas y en su estructura. También puede existir una variación considerable de una célula a otra (no se muestra). (B) Cariotipo de un tumor que presenta un conjunto cromosómico estable con pocas anomalías. Sus defectos son casi invisibles puesto que se han generado en la reparación del DNA dañado. Todos los cromosomas de la figura fueron marcados como en la Figura 20–13, que marca el DNA de cada cromosoma humano mediante una combinación de marcadores fluorescentes. (Cortesía de Wael Abdel-Rahman y Paul Edwards.)

curso de los acontecimientos es muy distinto al descrito para el caso de la FAP. En esta condición, conocida como *cáncer colono-rectal no polipósico hereditario* o *HNPCC* (***h****ereditary* ***n****onpolyposis* ***c****olorectal* ***c****ancer*), la probabilidad de desarrollar el tumor se incrementa sin que aumente el número de pólipos colono-rectales (adenomas). Además, las células cancerosas del tumor que se desarrollan son poco habituales, puesto que presentan un cariotipo normal (o casi normal); al contrario, la inmensa mayoría de tumores colono-rectales en pacientes que no presentan HNPCC tienen grandes anormalidades cromosómicas, con múltiples translocaciones, deleciones y más cromosomas de lo normal (**Figura 20–47**).

Las mutaciones que predisponen a los individuos con HNPCC al cáncer colono-rectal se encuentran en algunos genes que codifican componentes clave en los *sistemas de reparación de la doble cadena de DNA* en humanos, homólogos en cuanto a estructura y función a *MutL* y *MutS* de las bacterias y de las levaduras (véase Figura 5–20). Sólo es defectuosa una de las dos copias del gen, de forma que los errores de replicación son eliminados de forma eficiente en la mayoría de las células del paciente. Sin embargo, como ya se ha indicado para otros genes supresores de tumores, los individuos tienen un riesgo elevado, ya que una pérdida o alteración de forma accidental de la copia correcta del gen, elevará inmediatamente la velocidad de mutación espontánea cientos de veces o más (descrito en el Capítulo 5). Estas células genéticamente inestables continuarán avanzando en los procesos de mutación y selección natural que permite que algunos clones se transformen en malignos.

Este tipo particular de inestabilidad genética produce cambios invisible en los cromosomas –los más notorios son en nucleótidos individuales o en repeticiones de uno o dos nucleótidos como AAAA... o CACACA... Una vez reconocido el fenómeno, se ha encontrado que cerca del 15% de los tumores colono-rectales que padecen los individuos normales, sin ninguna mutación hereditaria, son de este tipo.

Así pues la inestabilidad genética encontrada en la mayoría de tumores colono-rectales se puede adquirir de dos formas distintas. La mayoría de cánceres presentan una forma de inestabilidad cromosómica que comporta alteraciones visibles en los cromosomas, mientras que en otros la inestabilidad se produce a una escala mucho menor y refleja un defecto en el sistema de reparación del DNA. Muchos carcinomas presentan inestabilidad genética o una reparación defectuosa pero en pocas ocasiones ambas cosas a la vez. Este hecho demuestra claramente que la inestabilidad genética no es un producto accidental del comportamiento maligno, sino una causa que contribuye a él y que las células cancerosas pueden adquirir de formas muy distintas.

Las etapas de la progresión tumoral se correlacionan con determinadas mutaciones

¿Cuál es la secuencia en que *K-Ras*, *p53*, *Apc* y otros genes identificados en el cáncer colono-rectal sufren sus mutaciones, y cuál es la contribución de cada uno de ellos al comportamiento incontrolado de una célula cancerosa? No existe una respuesta sencilla para esta pregunta porque el cáncer colono-rectal puede aparecer por más de una vía: en algunos casos, la primera mutación que conducirá al cáncer puede encontrarse en el sistema de reparación del DNA; en otros casos, radica en un gen que controla el crecimiento. De todas formas, como hemos señalado anteriormente, una característica general es que la inestabilidad genética o la tendencia a proliferar de forma anormal pueden aparecer de formas distintas por mutaciones en genes diferentes.

Sin embargo, algunos de los acontecimientos son comunes en el cáncer colono-rectal y aparecen en un orden característico. En la mayoría de casos, las mutaciones que inactivan el

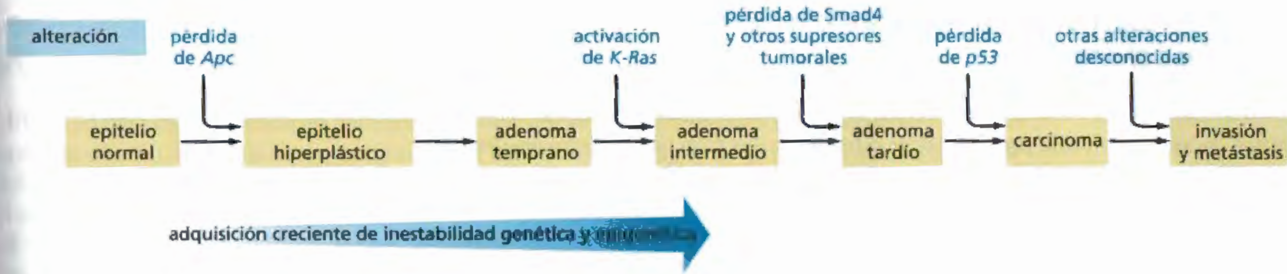


Figura 20–48 Secuencia típica sugerida para los cambios genéticos que marcan el desarrollo de un carcinoma colono-rectal. Este esquema simplificado proporciona una idea general de la forma en la que las mutaciones y los tumores se desarrollan conjuntamente. Sin embargo existen otros genes mutantes que no se muestran y además el cáncer de colon puede progresar a través de secuencias de mutaciones diferentes.

en *Apc* aparecen primero o al menos en una fase temprana del desarrollo del tumor puesto que se pueden detectar en los pólipos benignos de pequeño tamaño con la misma frecuencia que en los grandes tumores malignos. Los cambios hereditarios que implican una inestabilidad genética o epigenética también aparecen de manera temprana en la progresión tumoral, ya que son necesarios para dirigir las etapas posteriores.

Parece que las mutaciones que activan el oncogén *K-Ras* se producen más tarde que las de *Apc*, ya que son poco frecuentes en los pólipos pequeños pero muy habituales en los pólipos de gran tamaño que presentan patrones histológicos y de diferenciación anormales. Cuando estas células tumorales malignas que presentan la mutación de *Ras* crecen en cultivo, presentan las características típicas de las células transformadas, como la capacidad de proliferar sin anclaje a un sustrato. La pérdida del gen supresor tumoral *Smad4* y las mutaciones inactivadoras de *p53* se producirían más adelante, dado que son muy raras en los pólipos y muy comunes en los carcinomas (**Figura 20–48**). Como se ha explicado, la pérdida de la función de *p53* permite a las células cancerosas acumular mutaciones adicionales y evitar la apoptosis y la parada del ciclo celular.

En resumen, aunque el número exacto de mutaciones variará de un cáncer colono-rectal a otro, la carcinogénesis colono-rectal requiere ciertas alteraciones genéticas que alteran los mecanismos de control particulares y el orden en el que se producen estas alteraciones no es al azar (**Figura 20–49**).

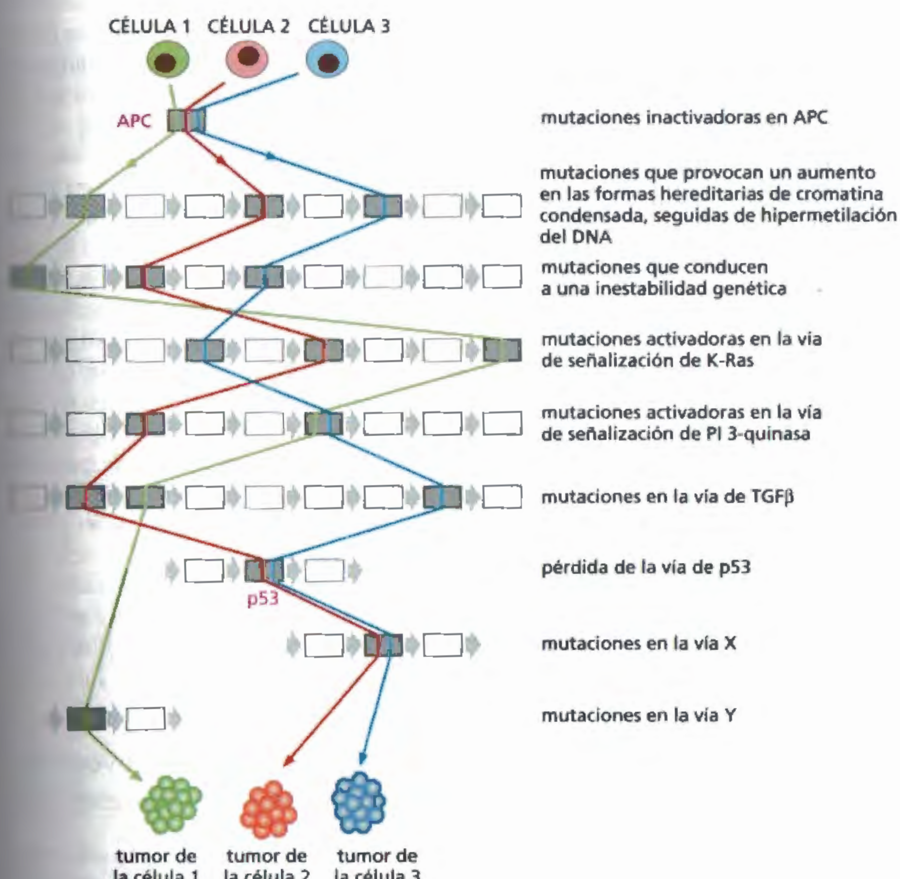


Figura 20–49 La naturaleza general de la progresión tumoral a nivel molecular. Cada fila de este diagrama representa una vía bioquímica, de forma que, a menudo, el cambio de una proteína (*caja rectangular*) por alteración de su gen es suficiente para generar un efecto completo. Las tres vías (*líneas verticales coloreadas*) se han dibujado para indicar las mutaciones que un clon de células tumorales acumula mientras progresa hacia el cáncer. Este diagrama se ha representado a partir de algunos de los acontecimientos conocidos en el desarrollo del cáncer colono-rectal, pero no debe considerarse de forma literal. Los puntos más importantes serán aquellos en los que, en los tumores de colon individuales mientras desarrollan las metástasis, muchos genes diferentes estarán alterados, de forma que los tumores no serán exactamente iguales, pero existen algunos patrones comunes. En particular, tanto las vías de señalización que están alteradas, como el orden general en el que aparecen estos cambios, a menudo son parecidos en los distintos tumores.

Cada cáncer se caracteriza por su propia colección de lesiones genéticas

Como se ilustró para el cáncer colono-rectal, la clasificación tradicional de los tumores es simplista. Incluso en un solo tipo de cáncer existe una colección heterogénea de alteraciones, con algunas características comunes, pero presentando cada una de ellas su propia colección de lesiones genéticas. Por ejemplo, en el cáncer de pulmón conocido como *cáncer de pulmón de células pequeñas*, se encuentran mutaciones en *p53*, *Rb* y *Myc* y en al menos otros cinco oncogenes o genes supresores de tumores conocidos. En pacientes diferentes se han encontrado combinaciones distintas de mutaciones y corresponden a tumores que reaccionan de forma distinta al tratamiento.

En principio, la biología molecular proporciona las herramientas para encontrar de forma precisa los genes que han sido amplificados, delecionados, mutados y desregulados en las células tumorales de un paciente determinado. Como veremos en la próxima sección, muy pronto esta información puede ser muy importante para el diagnóstico y el tratamiento igual que lo es para la identificación de los microorganismos en pacientes con enfermedades infecciosas.

Resumen

Los estudios en embriones en desarrollo y en animales transgénicos han resultado de gran ayuda para identificar las funciones de muchos genes críticos del cáncer. La mayoría de oncogenes y genes supresores de tumores mutados en el cáncer codifican componentes de las vías de control social que regulan cuándo la célula crece, se divide, se diferencia o muere. Otros genes denominados de forma general "genes de mantenimiento del DNA" mantienen la integridad del genoma. Los cambios moleculares que permiten a las células producir metástasis todavía son desconocidos.

Los virus de DNA como los papilomavirus pueden favorecer el desarrollo de cáncer codificando proteínas que inhiben los productos de algunos genes supresores de tumores. Las proteínas víricas se unen e inhiben la proteína Rb, que normalmente actúa de freno en la división celular, y la proteína p53, que por lo general induce la parada del ciclo celular o la apoptosis cuando se produce un daño en el DNA u otro tipo de estrés celular. La pérdida o la inactivación de la vía de p53, que se produce en casi todos los cánceres humanos espontáneos, es en especial peligrosa, porque permite a las células con daños genéticos escapar a la apoptosis y continuar su proliferación. La inactivación de la vía de Rb también se produce en la mayoría de cánceres humanos, lo que ilustra lo fundamentales que son estas vías en la protección contra el cáncer.

A menudo es posible correlacionar las etapas de la progresión tumoral con mutaciones que activan oncogenes específicos o inactivan genes específicos supresores de tumores; el cáncer colono-rectal proporciona uno de los ejemplos que conocemos más a fondo. Sin embargo, en tipos distintos de cáncer e incluso en pacientes diferentes con el mismo tipo de cáncer, se encuentran diferentes combinaciones de mutaciones y de cambios epigenéticos, lo que refleja que el azar es el conductor de los cambios hereditarios que se producen. De todas formas, la mayoría de los cambios se han encontrado repetidamente; este hallazgo sugiere que existen un número limitado de maneras de romper nuestras defensas contra el cáncer.

EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER: PRESENTE Y FUTURO

Los crecientes conocimientos sobre la biología del cáncer se pueden aplicar para hacer frente a la enfermedad en tres niveles: prevención, diagnóstico y tratamiento. Es mejor prevenir que curar y, como hemos explicado, la mayoría de tumores pueden prevenirse, especialmente evitando el consumo de tabaco. Además, a menudo, los tumores pueden ser detectados en su fase inicial de desarrollo mediante exploraciones y pueden ser extirpados antes de que se produzcan las metástasis, como en los tumores uterinos, por ejemplo. Los actuales ensayos moleculares de gran sensibilidad prometen crear nuevas oportunidades para una mejor prevención y tratamiento mediante un diagnóstico más temprano y más preciso. Los avances en los métodos de diagnóstico junto con cambios en el estilo de vida, ofrecen las mejores e inmediatas perspectivas para reducir la tasa de muerte por cáncer, pero no existe la certeza de que sean totalmente efectivas alguna vez. Así pues, en los próximos años, continuará existiendo esta enfermedad maligna y seguirán siendo necesarios los tratamientos para el cáncer.

La búsqueda de tratamientos para el cáncer es difícil pero no desesperada

La dificultad para curar el cáncer es parecida a la de erradicar las malas hierbas. Las células cancerosas pueden ser eliminadas quirúrgicamente o destruidas con agentes químicos o radiaciones, pero es muy difícil eliminarlas todas. La cirugía difícilmente elimina todas y cada una de las metástasis y, por lo general, los tratamientos que matan a las células cancerosas también son tóxicos para las células normales. Además, como se ha señalado, mientras que a menudo la inmensa mayoría de las células cancerosas pueden ser eliminadas mediante irradiación o quimioterapia, la pequeña población de células cancerosas progenitoras de división lenta pueden ser mucho más difíciles de eliminar de esta manera; aunque sólo queden unas cuantas células cancerosas progenitoras, pueden regenerar el tumor. Además, a diferencia de las células normales, las células tumorales mutan rápidamente y a menudo desarrollan resistencia a los fármacos y a las radiaciones que se utilizan para combatirlas.

A pesar de estas dificultades, existen algunos tratamientos a base de fármacos anticancerosos (solos o combinados con otros tratamientos) que resultan eficaces para algunos de los tumores que antes eran más letales, como, por ejemplo, el linfoma de Hodgkin, el cáncer testicular, los coriocarcinomas y algunas leucemias y otros tumores infantiles. Para los tipos de tumores en los que parece que su cura está muy lejos de nuestro alcance, existen tratamientos que prolongan la vida o al menos alivian el dolor. Pero, ¿qué perspectivas tenemos de mejorar y encontrar curas para la mayoría de tumores más habituales que todavía provocan grandes sufrimientos y muchas muertes trágicas?

Las terapias tradicionales aprovechan la inestabilidad genética y la pérdida del control del ciclo celular de las células cancerosas

Las terapias antitumorales necesitan aprovechar algunas de las anormalidades moleculares de las células tumorales que las distinguen de las células normales. Una de estas características es la inestabilidad genética, provocada por una anormalidad en el mantenimiento de los cromosomas, en los controles del ciclo celular o en la reparación del DNA. Es interesante destacar que la mayoría de terapias que funcionan para el tratamiento del cáncer se basan en estos defectos moleculares, aunque no eran conocidos por los investigadores que desarrollaron los tratamientos. La mayoría de fármacos antitumorales y de radiaciones ionizantes dañan el DNA. Estos tratamientos matan sobre todo algunos tipos de células cancerosas puesto que estas células mutadas presentan menos capacidad de sobrevivir si son dañadas. Por ejemplo cuando a unas células normales se las somete a radiaciones, sufrirán daños en su DNA, pero se podrán mantener sin dividirse hasta que el daño sea reparado. Esta parada del ciclo celular es un ejemplo de *respuesta celular a un control de ciclo* descrito en el Capítulo 17. Las células cancerosas presentan alteraciones en distintas fases del control del ciclo celular y continúan dividiéndose después de la irradiación; casi todas estas células morirán unos cuantos días después como consecuencia de los graves daños genéticos que han experimentado.

No obstante mientras que algunos defectos moleculares presentes en las células tumorales incrementan su sensibilidad hacia los agentes citotóxicos, otros aumentan su resistencia. Por ejemplo, una parte de las muertes celulares inducidas por el daño en el DNA, se producen por apoptosis, y las células cancerosas adquieren a menudo defectos en los sistemas de control que activan la apoptosis. Como se ha explicado anteriormente, por ejemplo, el daño en el DNA inducido por los fármacos anticancerosos o por la irradiación, por lo general activa a *p53* que puede inducir apoptosis. Así pues, la inactivación de la vía de *p53* que se produce en muchos tumores hace que ciertos tipos de células cancerosas sean menos sensibles a estos agentes. La respuesta de las células tumorales a los tratamientos es muy variada y probablemente refleja los distintos tipos de defectos que presentan en la reparación de su DNA, en los controles del ciclo celular y en el control de la apoptosis.

Los nuevos fármacos aprovechan las causas específicas de la inestabilidad genética de los tumores

Puesto que somos capaces de establecer cada vez con más exactitud las alteraciones específicas de las células cancerosas que las distinguen de sus vecinas normales, es factible utilizar

este conocimiento para diseñar terapias que eliminen a las células del cáncer sin afectar a las células normales. Una de las características de las células tumorales, como hemos explicado, es su inestabilidad genética; esta es una de las características que les permite progresar y proliferar peligrosamente. Pero al mismo tiempo es un defecto –una vulnerabilidad que podemos utilizar para eliminarlas.

Las células tumorales necesitan realizar un largo y difícil camino para producir metástasis: deben presentar alteraciones en los procesos de mantenimiento de su DNA lo bastante graves como para permitirles acumular nuevas mutaciones a una gran velocidad, pero no tan graves como para que mueran por la pérdida frecuente de los genes necesarios para su supervivencia. Puesto que existen cientos de genes necesarios para mantener las secuencias de DNA y las estructuras cromosómicas con una fidelidad elevada (descrito en los Capítulos 4 y 5), sería previsible que hubiera docenas de rutas distintas para que una célula tumoral particular adquiriera su inestabilidad genética. Además, estos caminos deberían ser mutuamente excluyentes: cuando una célula fuera genéticamente inestable a un nivel moderado, es probable que aumentara su riesgo de muerte si inactivara genes de mantenimiento del DNA adicionales. Si estas células hicieran esto, morirían y se perderían de la población tumoral.

Estudios detallados de los mecanismos de mantenimiento del DNA analizados en el Capítulo 5 revelan una cantidad sorprendente de redundancias aparentes, con varias vías para reparar cada tipo de daño en el DNA. Así pues, la eliminación de una vía en particular de reparación del DNA es, por lo general, menos desastrosa de lo que se podría esperar, puesto que existen vías alternativas de reparación. Hemos visto, por ejemplo, cómo se paran las horquillas de replicación de DNA cuando encuentran una rotura de una cadena sencilla en una cadena patrón y cómo las células evitan el desastre que se hubiera producido en caso contrario. Primero, disponen de la maquinaria necesaria para escapar del problema reparando de forma directa las roturas de las cadenas sencillas; si este mecanismo fracasa, pueden reparar las horquillas paradas mediante recombinación homóloga (véase Figura 5–53). Supongamos que las células de un determinado cáncer se han convertido en genéticamente inestables adquiriendo una mutación que reduce su capacidad de reparar las hebras mediante recombinación homóloga. ¿Sería posible erradicar este cáncer tratándolo con un fármaco que inhibiera la reparación de las roturas de las cadenas sencillas e incrementara el número de horquillas paradas? Las consecuencias no serían malas para las células normales que pueden reparar las horquillas mientras que serían letales para las células cancerosas que no pueden hacerlo.

Aunque esta posibilidad sería demasiada buena para ser verdad, precisamente parece que es la estrategia que funciona para eliminar las células de los cánceres que tienen inactivados los genes supresores tumorales *Brca1* y *Brca2*. Como se describió en el Capítulo 5, Brca2 es una proteína accesoria que interactúa con la proteína Rad51 (el análogo de RecA en humanos) al principio de los acontecimientos de recombinación general. Brca2 es otra proteína necesaria para este proceso de reparación. *Rb*, *Brca1* y *Brca2* fueron descubiertos como mutaciones que predisponían a los humanos a padecer cáncer; en este caso, a los cánceres de mama y ovarios (aunque a diferencia de *Rb*, parece que están implicados en una proporción pequeña de estos tumores). Los individuos que heredan una copia mutada de *Brca1* o *Brca2* desarrollan tumores que han inactivado la segunda copia del mismo gen, posiblemente porque este cambio hace que las células sean inestables en términos genéticos y avancen hacia la progresión del tumor.

Los fármacos que inhiben una enzima llamada PARP (*poly ADP-ribose polymerase*) tienen un efecto importante en las células de estos tumores y las eliminan con una gran selectividad. Esto se atribuye al hecho de que PARP es necesaria para la reparación de las roturas de las cadenas sencillas de DNA. Quizás sorprendentemente, la inhibición de PARP parece tener muy poco efecto en las células normales; así el ratón transgénico que no tiene PARP1 –el miembro más importante de la familia implicado en la reparación del DNA– se mantiene saludable en las condiciones del laboratorio. Este resultado sugiere que, mientras que la vía de reparación que necesita PARP proporciona una primera línea de defensa contra las roturas en la cadena de DNA, estas roturas pueden ser fácilmente reparadas mediante una vía de recombinación genética en las células normales (**Figura 20–50**). Por el contrario, las células tumorales que han adquirido su inestabilidad genética perdiendo Brca1 o Brca2 han perdido esta segunda línea de defensa y son entonces específicamente sensibles a los inhibidores de PARP (es decir, han perdido la vía de reparación 2 de la Figura 20–50).

La inhibición de PARP todavía está en fase clínica como tratamiento del cáncer en humanos y parece que sólo puede aplicarse a una pequeña proporción de casos de cáncer. Sin em-

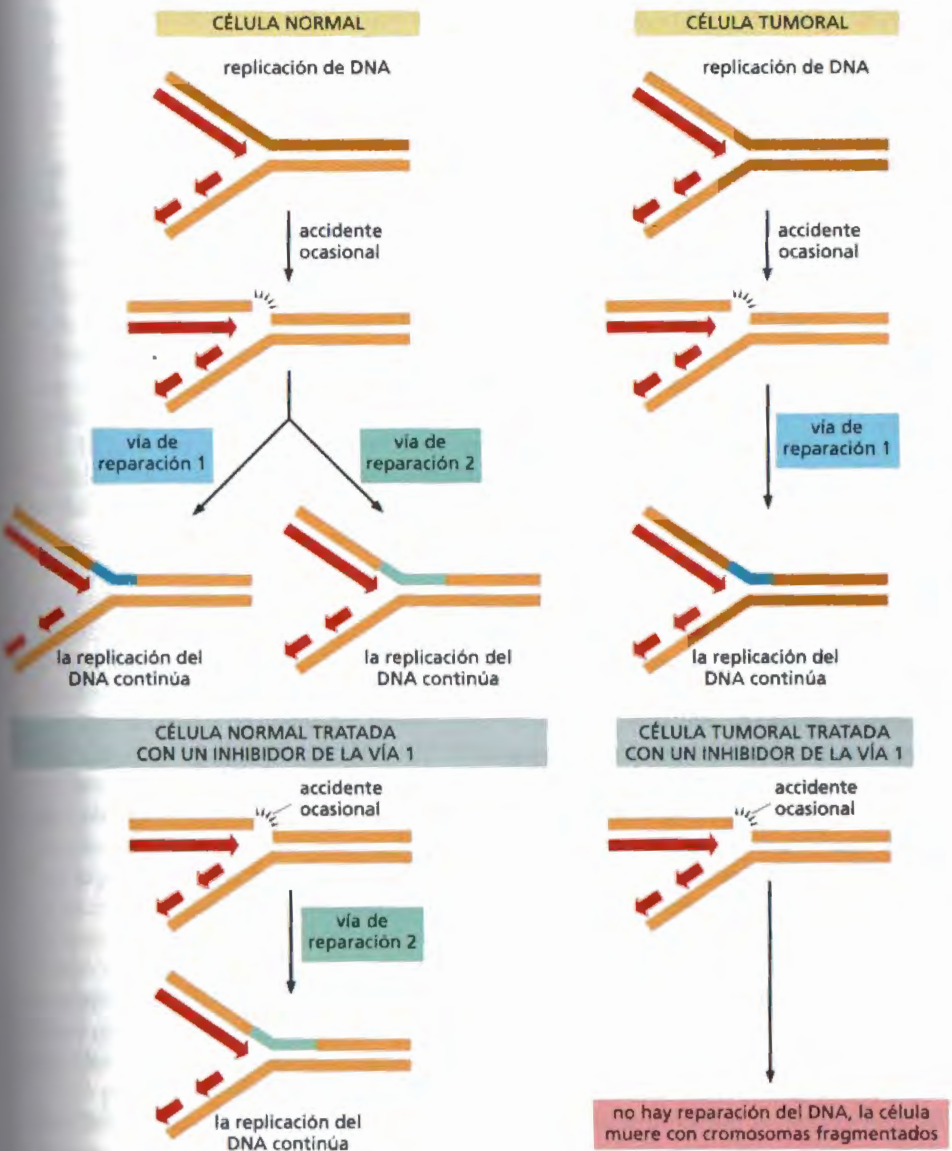


Figura 20-50 La terapia antitumoral puede aprovechar la inestabilidad genética del tumor. Como se explicó en el Capítulo 5, el mantenimiento de las secuencias de DNA es tan crítico para la vida, que las células han desarrollado muchas vías para reparar el DNA dañado y evitar errores en la replicación. Una horquilla de replicación se para cuando encuentra una rotura en la cadena patrón de DNA. En este ejemplo, las células normales tienen dos vías de reparación diferentes que pueden solucionar el problema y prevenir una mutación a partir de las nuevas secuencias de síntesis de DNA. Por tanto, no se ven afectadas cuando son tratadas con un fármaco que bloquea la vía de reparación 1. Por el contrario, la inactivación de la vía de reparación 2 fue seleccionada durante la evolución de las células tumorales (puesto que las transforma en genéticamente inestables). En consecuencia, mediante el tratamiento con un fármaco que bloquea la vía de reparación 1 sólo serán eliminadas las células tumorales. Si una célula tratada no muere por apoptosis, lo harán sus hijas porque heredarán los cromosomas fragmentados e incompletos.

En este caso, que ilustra un ejemplo esquemático más general, la función de la vía de reparación 1 (que necesita de la proteína PARP descrita en el texto) es eliminar las roturas accidentales que se producen en una cadena sencilla de DNA *antes* de que las encuentre alguna horquilla de replicación en desplazamiento; la vía 2 es el proceso dependiente de recombinación para reparar las horquillas de replicación ilustrado en la Figura 5-53 (que necesita de las proteínas Brca1 y Brca2; para detalles, véase H.E. Bryant et al., *Nature* 434:913-916, 2005 y H. Farmer et al., *Nature* 434:917-921, 2005.)

embargo, es un ejemplo del tipo de terapia racional y con una aproximación altamente selectiva que empieza a ser posible, ofreciendo así esperanza para muchos otros tipos de cáncer. Para ampliar este tipo de aproximación necesitaremos nuevas herramientas que permitan determinar la causa precisa de la inestabilidad genética de los tumores individuales y también el desarrollo de muchos más fármacos que ataquen las vías de reparación del DNA alternativas.

La inestabilidad genética permite a los cánceres ser progresivamente más resistentes a las terapias

La inestabilidad genética en sí misma puede ser buena y puede ser mala para la terapia antitumoral. Aunque parece proporcionar el talón de Aquiles que las terapias pueden utilizar, también puede hacer más difícil la erradicación de un cáncer. Una tasa demasiado elevada de mutación tiende a convertir la población de células cancerosas en heterogénea; este hecho puede dificultar la eliminación de toda la población con un solo tipo de tratamiento. Además, permite a muchos cánceres desarrollar resistencia a las drogas terapéuticas a una velocidad alarmante.

Para dificultar la situación, a menudo las células que han sido expuestas a un fármaco antitumoral desarrollan resistencia no sólo a este fármaco sino a otros fármacos a los que no han sido expuestas. Este fenómeno de **resistencia a multifármacos** se correlaciona con frecuencia con la amplificación de una parte del genoma que contiene un gen llamado *Mdr1*. Este gen codifica una ATPasa transportadora unida a la membrana plasmática de la

superfamilia de transportadores ABC (descrito en el Capítulo 11), que bombea fármacos lipofílicos hacia el exterior de la célula. La sobreproducción de esta proteína (o de algún otro miembro de la familia) por una célula cancerosa puede impedir la acumulación intracelular de la mayoría de fármacos citotóxicos e insensibilizar a la célula a estos fármacos. La amplificación de otros tipos de genes también puede proporcionar a la célula cancerosa una ventaja selectiva. Por ejemplo, el gen que codifica la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR: ***dihydroxifolate reductase***) puede amplificarse en las células cancerosas tratadas con el fármaco antitumoral *metotrexato.* El metotrexato se une e inhibe la capacidad de DHFR de unirse al ácido fólico; la amplificación aumenta exageradamente la cantidad de enzima y reduce la sensibilidad de las células al fármaco.

A partir del conocimiento de la biología del cáncer pueden desarrollarse nuevas terapias

Los conocimientos actuales, en constante incremento, sobre la biología de la célula tumoral y de la progresión tumoral, conducirán gradualmente a mejores tratamientos para combatir la enfermedad, que no sólo irán dirigidos a los defectos en el ciclo celular y a los procesos de reparación del DNA. Por ejemplo, en la actualidad se están utilizando ampliamente en humanos los antagonistas de estrógenos (como p. ej., el *tamoxifeno*) y fármacos que bloquean la síntesis de estrógenos para prevenir o impedir la recurrencia del cáncer de mama en aquellos tumores que han sido analizados y se ha encontrado que expresan receptores de estrógenos. Estos componentes antiestrogénicos no matan de forma directa a las células tumorales, pero impiden que el estrógeno favorezca la proliferación celular.

Sin embargo, las mayores esperanzas se depositan en la posibilidad de encontrar maneras más selectivas y potentes para eliminar directamente las células cancerosas. Una gran variedad de nuevas y aventureras maneras para atacar las células tumorales han demostrado su capacidad de funcionamiento en modelos concretos –normalmente reduciendo o impidiendo el crecimiento de tumores humanos transplantados en ratones inmunosuprimidos. Muchas de estas estrategias han sido excluidas de uso médico, porque no funcionan en humanos, tienen muchos efectus secundarios o simplemente son difíciles de aplicar. Sin embargo, parece que algunos de ellos tienen éxito en la clínica. Por ejemplo, algunas células tumorales son muy dependientes de un tipo particular de proteína que producen en exceso, fenómeno conocido como *adicción oncogénica.* El bloqueo de la actividad de esta proteína puede ser una forma eficiente de tratar el cáncer, si ello no afecta a los tejidos normales. Por ejemplo, cerca del 25% de los tumores de mama expresan grandes cantidades de la proteína Her2, un receptor tirosina quinasa relacionado con el receptor de EGF, que por lo general participa en el desarrollo del epitelio mamario. Anticuerpos monoclonales que inhiben la función de Her2 y disminuyen el crecimiento de los tumores de mama que sobreexpresan Her2 actualmente han sido aprobados como terapia para tratar este tipo de cáncer.

Otra aproximación para destruir dianas tumorales consiste en dirigir un compuesto tóxico a las células tumorales. Anticuerpos contra proteínas como Her2, que son abundantes en la superficie de las células tumorales, pueden llevar una toxina o transportar una enzima que transforme un "profármaco" inocuo en una molécula tóxica. En este último caso, una sola molécula de enzima puede generar un gran número de toxinas en la superficie de la célula tumoral; estas moléculas también pueden difundir hacia las células tumorales vecinas, eliminándolas, aunque el anticuerpo no se haya unido directamente a ellas.

Es difícil fabricar grandes cantidades de anticuerpos, son muy caros de producir y comprar y tienen que administrarse mediante inyecciones. El objetivo final en la terapia contra el cáncer es desarrollar pequeñas moléculas que eliminen de forma específica a las células cancerosas. Los inhibidores de PARP mencionados son un ejemplo de ello; pero para atacar a la mayoría de tumores con tratamientos sencillos a base de fármacos necesitaremos una gran colección de moléculas pequeñas diferentes, diseñadas contra los distintos tipos de cáncer.

Se pueden diseñar pequeñas moléculas dirigidas específicamente a proteínas oncogénicas

A medida que el conocimiento sobre las moléculas específicas implicadas en la génesis de un cáncer particular aumenta, existe un esfuerzo elevado para desarrollar terapias dirigidas

contra las proteínas oncogénicas que son esenciales para que la célula cancerosa sobreviva y prolifere –aprovechando el fenómeno de adicción oncogénica mencionado previamente. El gran éxito de este tipo de terapia dirigida, ha generado grandes esperanzas para su uso en el futuro.

La leucemia mieloide crónica (CML) está asociada con una translocación cromosómica visible como el cromosoma Filadelfia (véase Figura 20–5). Este hecho es consecuencia de la rotura de un cromosoma y su posterior unión en los lugares de dos genes determinados, llamados *Abl* y *Bcr*. La fusión de ambos genes da lugar a una proteína quimera formada por el extremo N-terminal del fragmento de Bcr fusionado con el fragmento C-terminal de Abl (**Figura 20–51**). Abl es una tirosina quinasa implicada en la señalización celular. La sustitución de Bcr en la parte N-terminal la hace hiperactiva, con lo cual estimula de forma inadecuada la proliferación de los precursores hemopoyéticos e impide su muerte por apoptosis, que debería producirse en condiciones normales. Entonces se genera un número excesivo de células blancas que se liberan al torrente sanguíneo y producen la CML.

La proteína quimera Abl-Bcr es una diana obvia para el ataque terapéutico. La búsqueda de fármacos sintéticos que puedan inhibir la actividad de las proteínas quinasa ha permitido descubrir un fármaco, llamado **Gleevec**, que bloquea Bcr-Abl (**Figura 20–52**). Cuando se administró este fármaco a pacientes con CML, casi todos presentaron una respuesta excelente, con una eliminación aparente de las células que presentaban el cromosoma Filadelfia en alrededor del 80% de los pacientes. La respuesta parece perdurar en el tiempo: después de años de tratamiento continuado, la mayoría de pacientes no han progresado hacia las etapas finales de la enfermedad; aunque aparecen algunos tumores resistentes a Gleevec con una probabilidad de al menos un 5% por año.

Los resultados no fueron tan buenos para aquellos pacientes que ya habían progresado hacia una fase aguda de la leucemia mieloide, conocida como crisis blástica, en la que ya se ha establecido una inestabilidad genética, por lo que la evolución de la enfermedad es mucho más rápida. Estos pacientes respondieron inicialmente pero después presentaron recurrencia puesto que las células tumorales desarrollaron resistencia al Gleevec. Está resistencia está por lo general asociada con mutaciones secundarias en la parte del gen *Bcr-Abl* que codifica el dominio quinasa, impidiendo la capacidad del Gleevec para unir la quinasa Bcr-Abl. Actualmente se ha desarrollado una segunda generación de inhibidores que funcionan de forma eficiente en estos mutantes resistentes al Gleevec. Por último, un cóctel de agentes múltiples que bloquean la acción de Bcr-Abl de forma cooperativa puede proporcionar la clave para un tratamiento con éxito, impidiendo la selección de células cancerosas resistentes a los fármacos en todas las etapas de la enfermedad.

A pesar de las complicaciones con la resistencia a los fármacos, el éxito extraordinario del Gleevec para los pacientes de la fase crónica (temprana) de la enfermedad es suficiente para apoyar el principio siguiente: cuando comprendamos con precisión cuáles son las lesiones genéticas que se producen en el cáncer, podremos empezar a diseñar métodos racionales y efectivos para combatirlo. Esta historia de éxitos ha estimulado los esfuerzos para identificar pequeñas moléculas inhibidoras para otras proteínas quinasa oncogénicas que podrían ser dianas efectivas para nuevos fármacos antitumorales. Un segundo ejemplo de

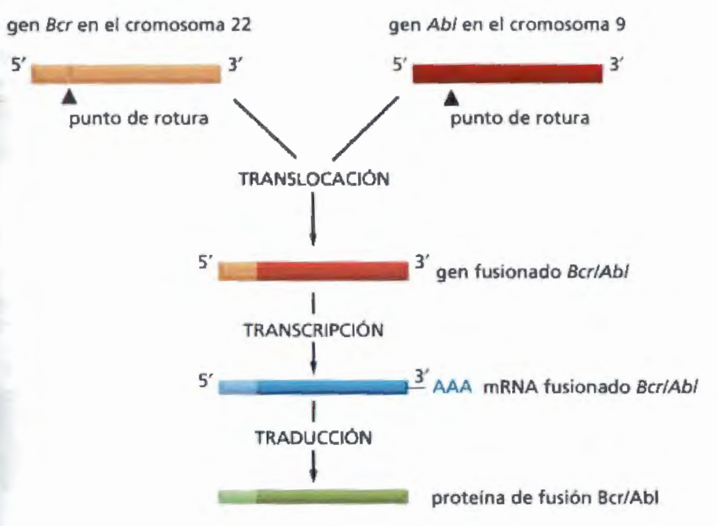


Figura 20–51 La conversión del protooncogén *Abl* en un oncogén, en pacientes con leucemia mieloide crónica. La translocación cromosómica responsable une el gen *Bcr* del cromosoma 22 con el gen *Abl* del cromosoma 9 y genera así un cromosoma Filadelfia (véase Figura 20–5). La proteína de fusión resultante tiene el extremo amino terminal de la proteína Bcr unido al extremo carboxilo terminal de la proteína tirosina quinasa Abl; por lo tanto, el dominio quinasa Abl resulta activo de una forma no apropiada, produciendo una proliferación excesiva de un clon de células hematopoyéticas en la médula ósea.

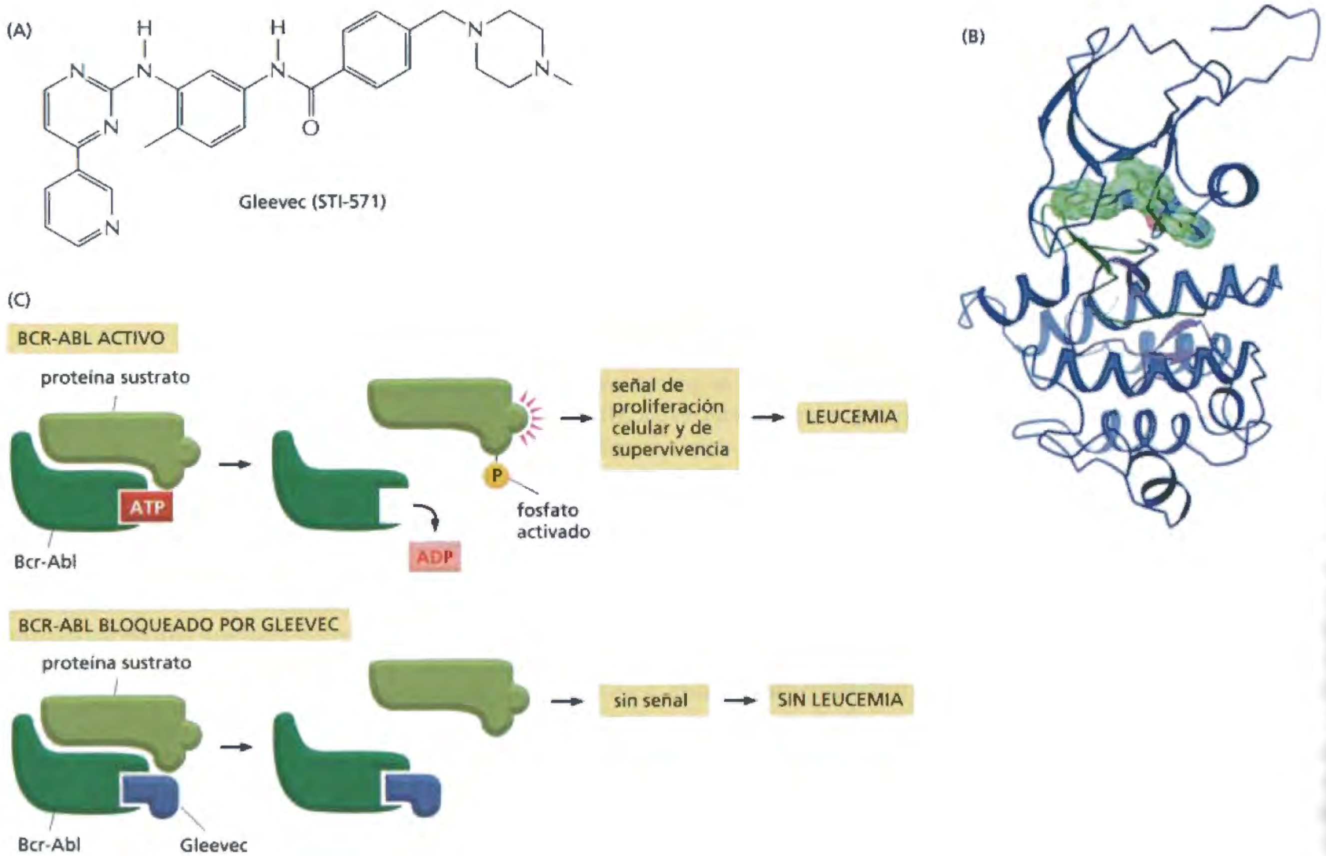


Figura 20-52 Gleevec bloquea la actividad de la proteína Bcr-Abl e interrumpe la leucemia mieloide crónica. (A) Estructura química de Gleevec (imatinib). El fármaco se puede tomar por vía oral; tiene efectos secundarios aunque a menudo son bastante tolerables. (B) La estructura del complejo de Gleevec (dibujado en *verde*) con el dominio tirosina quinasa de la proteína Abl (diagrama de cintas), determinada por cristalografía de rayos X. (C) Gleevec se sitúa en el bolsillo de unión del ATP en el dominio tirosina quinasa de la proteína Bcr-Abl e impide la transferencia de un residuo fosfato desde el ATP a un residuo tirosina en la proteína sustrato. Este proceso bloquea la transmisión de la señal de proliferación y de supervivencia. (B, de T. Schindler et al., *Science* 289:1938-1042, 2000. Con la autorización de AAAS.)

este tipo de terapias es el proporcionado por las pequeñas moléculas inhibidoras del receptor de EGF, aprobadas recientemente para el tratamiento de algunos cánceres de pulmón.

Los vasos sanguíneos tumorales son dianas lógicas para la terapia antitumoral

Otra aproximación para destruir los tumores, no actúa de forma directa sobre las células tumorales sino sobre los vasos sanguíneos de los cuales dependen los grandes tumores. Como hemos descrito, el crecimiento de estos vasos sanguíneos necesita señales angiogénicas como el VEGF, el cual, al menos en modelos animales, puede ser bloqueado para impedir el posterior crecimiento del tumor. Además, las células endoteliales que se encuentran en el proceso de formación de nuevos vasos, expresan marcadores diferenciales en la superficie celular, que podrían proporcionar una oportunidad para atacar los vasos tumorales en desarrollo de forma específica, sin afectar los vasos ya existentes en los tejidos normales. Actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos con diversos inhibidores de señales angiogénicas y se han ensayado algunos fármacos que inhiben el receptor de VEGF para tratar el cáncer de riñón. De forma parecida, se ha probado un anticuerpo monoclonal contra el VEGF para el tratamiento del cáncer de colon en combinación con quimioterapia, aunque el beneficio añadido es sólo modesto.

Muchos cánceres pueden ser tratados incrementando la respuesta inmune contra un tumor específico

En los últimos años, se ha observado que las respuestas inmunes normales del organismo nos protegen contra el cáncer. Ratones que han perdido partes importantes de su sistema inmune tienen niveles elevados de algunos tipos de cáncer. De forma parecida, las personas inmunosuprimidas tienen una probabilidad de dos a tres veces más elevada de desarrollar ciertos tumores sólidos. Los propios antígenos que son reconocidos en estos casos

pueden atraer la atención del sistema inmune puesto que se expresan en cantidades inusualmente grandes en las células tumorales particulares. Otra posibilidad es que estas proteínas provoquen una respuesta autoinmune porque se expresan de forma normal en el embrión y en otras áreas inmunológicamente privilegiadas como es el caso del cerebro, de forma que el sistema inmune nunca ha tenido la oportunidad de desarrollar tolerancia hacia ellas.

Variantes de las células tumorales con una exposición reducida al ataque inmune pueden derrotar la inmunovigilancia del tumor, y se considera que el proceso de progresión tumoral incluye cambios hereditarios para reducir la antigenicidad del tumor. De todas formas, a través de nuestra creciente comprensión de los complejos mecanismos tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa (véase Capítulos 24 y 25), los oncólogos están aprendiendo a manipular la respuesta inmune para intensificar el ataque hacia tumores específicos. La esperanza es que esto permitirá eliminar a las células tumorales como si de un tejido foráneo se tratara.

El tratamiento de los pacientes con diversos fármacos simultáneamente presenta ventajas potenciales para la terapia antitumoral

Como se ha señalado, se puede reducir de forma importante el tamaño de algunos cánceres mediante un tratamiento inicial con un fármaco, de forma que desaparecen todas las células detectables del tumor. Pero algunos meses o años más tarde el cáncer reaparece en una forma alterada, resistente al fármaco que funcionó con éxito inicialmente. Dada la naturaleza hipermutable de las células tumorales, este hecho no es sorprendente. El tratamiento inicial probablemente fracasó en la eliminación de una minúscula fracción de células mutantes en el tumor original (algunas de las células progenitoras del tumor, de acuerdo con nuestro conocimiento de los tumores) y estas células han regenerado el tumor puesto que han continuado su proliferación.

En algunos casos, este problema puede impedirse tratando a los pacientes con dos o más fármacos de forma simultánea. La lógica es la misma que la utilizada en el tratamiento actual del sida con un cóctel de tres inhibidores de proteasas distintos: es posible que algunas células de la población inicial sean resistentes a uno de los fármacos del tratamiento, pero no debería haber células resistentes a dos fármacos distintos. Por el contrario, los tratamientos con fármacos secuenciales pueden permitir que las pocas células resistentes al primer fármaco se multipliquen en grandes cantidades, con la posibilidad de que aparezcan células con resistencia doble (**Figura 20–53**).

A medida que nuestro armamento de nuevos fármacos contra el cáncer crece, es probable que puedan diseñarse tratamientos con varios fármacos que sean eficientes para la mayoría de cánceres.

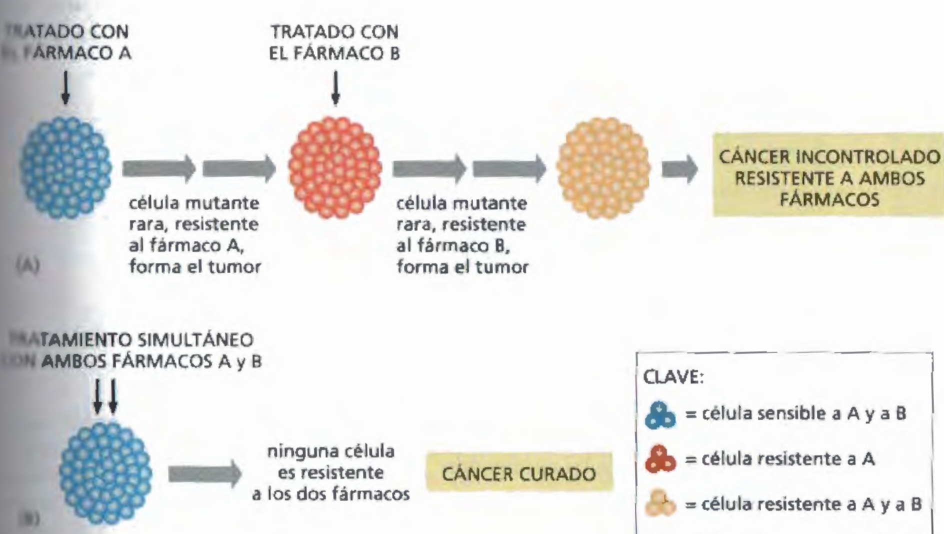


Figura 20–53 Por qué en la terapia antitumoral los tratamientos con varios fármacos simultáneos pueden ser más efectivos que los tratamientos secuenciales. Dado el carácter hipermutable que presentan las células tumorales, a menudo los tratamientos con dos fármacos administrados secuencialmente permiten la selección de clones de células mutantes que son resistentes a ambos fármacos.

El patrón de expresión génica ayuda a clasificar los cánceres en subgrupos con significado clínico

Actualmente es posible caracterizar cada cáncer individual a nivel molecular con una precisión sin precedentes. Por ejemplo, la tecnología de los microchips de DNA (descrita en el Capítulo 8) se puede utilizar para determinar de forma simultánea el patrón de expresión de miles de genes en una sola muestra de cáncer y compararla con el patrón de expresión de estos mismos genes en el tejido control normal. Cada caso de un tipo dado de cáncer, como por ejemplo el cáncer de mama, tendrá su propio **patrón de expresión génica**. De todas formas, comparando los patrones de muchos pacientes, se observa que pueden agruparse en un conjunto pequeño de clases diferentes, cuyos miembros comparten patrones comunes característicos.

¿Cómo se podrían aprovechar estos patrones moleculares? Todos los avances médicos dependen de un diagnóstico preciso. Si no podemos identificar la enfermedad correctamente, no podremos descubrir sus causas, predecir su resultado, seleccionar el tratamiento apropiado para un determinado paciente o realizar ensayos clínicos efectivos en una población de pacientes para juzgar si el tratamiento es eficiente. Los cánceres son un conjunto muy heterogéneo de enfermedades. Los patrones de expresión génica representan una herramienta para realizar el diagnóstico de forma más precisa mediante una mejor clasificación de los tumores. Los esquemas de clasificación clásicos se apoyaban sobre todo en los análisis histológicos y ahora sabemos que pueden agrupar cánceres que se comporten de forma diferente. Así pues, el patrón de expresión génica facilita no sólo la identificación del tumor en algunos casos, sino la clasificación de los tumores de forma más precisa, con importantes consecuencias para el paciente. Por ejemplo, el análisis de un conjunto de linfomas difusos de grandes células B demostró que existen dos clases diferenciadas basándonos en su patrón de expresión génica, aunque ambas clases no se diferenciaban desde un punto de vista histológico. Una clase está asociada con un pronóstico pobre y la otra con un mejor pronóstico; esta clasificación es útil y proporciona una explicación a observaciones previas en las que algunos pacientes con la enfermedad responden eficientemente a la terapia y sobreviven mientras que otros mueren. El patrón de expresión génica se está desarrollando todavía para muchos cánceres, pero es probable que sea ampliamente utilizado en el futuro para guiar los tratamientos.

Todavía queda mucho por hacer

El análisis molecular del cáncer promete transformar el tratamiento del cáncer al permitir diseñar terapias mucho más adaptadas a los pacientes individuales. Con el descubrimiento de un gran número de genes críticos para el cáncer, finalizó la era de caminar en la oscuridad, para pasar a identificar las pistas que conducen a las bases moleculares del cáncer. Ha sido esperanzador encontrar que, después de todo, existen algunos principios generales y que algunas formas de la enfermedad comparten algunas anormalidades genéticas clave. Dado que conocemos la identidad de muchos genes críticos para el cáncer y sus funciones normales, es posible empezar a diseñar tratamientos racionales y dirigidos. De todas formas, estamos lejos aún de comprender totalmente la mayoría de los cánceres humanos más frecuentes y todavía es necesaria una mejor comprensión de casi todos los procesos descritos en este capítulo antes de poder derrotar esta enfermedad letal. Entre otras cosas, necesitamos mejores formas para definir a las células progenitoras del cáncer y aislarlas, de manera que podamos determinar sus características especiales y las bases de su carácter progenitor, y lo que todavía es más importante, debemos encontrar maneras de eliminarlas, ya que en caso contrario, las terapias fracasarán.

Los supervivientes del cáncer y sus familias han sido importantes abogados defensores para la implementación de una investigación biomédica básica y pública. Estos grupos expresan ocasionalmente frustraciones comprensibles por la forma lenta en la que los cada vez mayores conocimientos sobre el cáncer se traducen en terapias efectivas contra la enfermedad. Pero la acumulación de conocimiento proporciona una mejora acelerada de la comprensión y en la actualidad existe una creencia real en la comunidad científica que investiga el cáncer de que los progresos importantes en el tratamiento de este grupo diverso de enfermedades son inminentes. Para poner un ejemplo, en los últimos años ha aumentado profundamente la comprensión sobre los detallados procesos moleculares que conducen a la decisión de todo o nada que toman las células para suicidarse por apoptosis. ¿Cuánto

tiempo pasará antes de que podamos analizar la señalización anormal en un tumor individual lo suficientemente bien para seleccionar un cóctel de fármacos diseñado a medida y factores de crecimiento que provoquen de forma específica que todas las células de ese tumor mueran?

Mirando retrospectivamente la historia de la biología celular y contemplando la velocidad de los progresos recientes, podemos tener esperanzas. El deseo de comprender en el que se basa la investigación básica, revelará seguramente nuevas formas de utilizar nuestro conocimiento sobre la célula para finalidades humanitarias, no sólo en relación al cáncer, sino también respecto a enfermedades infecciosas, mentales, en la agricultura y en otras áreas que no podemos prever.

Resumen

El creciente conocimiento de la biología molecular del cáncer ha empezado a conducirnos hacia mejores sistemas para prevenir, diagnosticar y tratar la enfermedad. Se pueden diseñar terapias antitumorales para destruir preferentemente las células tumorales aprovechando las propiedades que las distinguen de las células normales, entre ellas los defectos que presentan en los mecanismos de reparación del DNA, los controles de ciclo celular y las vías de apoptosis. Los tumores también pueden atacarse por su necesidad de aporte sanguíneo. La comprensión de los mecanismos normales de control y cómo se alteran en los cánceres específicos permite diseñar fármacos dirigidos contra el cáncer de forma más precisa. Conociendo mejor qué genes son amplificados, cuáles son delecionados y cuáles mutados en las células de un tumor determinado, es posible empezar a diseñar tratamientos más precisos y específicos para cada paciente de forma individual.

PROBLEMAS

¿Qué afirmaciones son ciertas? Explicar por qué sí o por qué no

20-1 La inestabilidad genética en forma de mutaciones puntuales, reorganizaciones cromosómicas y cambios epigenéticos, necesita ser máxima para permitir el desarrollo del cáncer.

20-2 Las terapias antitumorales dirigidas sólo a las células de división rápida que forman la gran masa tumoral probablemente no eliminarán el cáncer en muchos pacientes.

20-3 Los principales factores ambientales responsables del cáncer son los productos de nuestra forma de vida industrializada como la polución o los aditivos alimentarios.

20-4 El dimetilbenzo[a]antraceno (DMBA) debe ser un mutágeno muy específico, puesto que el 90% de los tumores de piel que provoca tienen una alteración A-T en el mismo punto exacto del gen *Ras* mutante.

20-5 En las vías reguladoras celulares que controlan el crecimiento celular y la proliferación, los productos de los oncogenes son componentes estimuladores y los productos de los genes supresores tumorales son inhibidores.

Resolver los siguientes problemas

20-6 Al contrario que el cáncer de colon, cuya incidencia aumenta en gran medida con la edad, el osteosarcoma –un tumor que afecta por lo general a los huesos largos– alcanza su máximo durante la adolescencia. Los osteosarcomas son relativamente raros en los niños (menores de 9 años) y en los adultos (mayores de 20 años). ¿Por qué la incidencia del osteosarcoma no muestra el mismo patrón de dependencia con la edad que el cáncer de colon?

20-7 Como se muestra en la **Figura P20-1**, las representaciones de las muertes debidas a cáncer de mama y a cáncer cervical en las mujeres difieren totalmente del mismo tipo de representación para las muertes por cáncer de colon. Alrededor de los 50 años, la

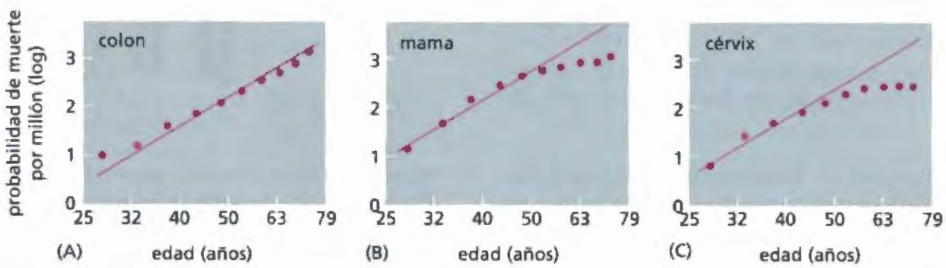


Figura P20-1 Probabilidad de muerte por cáncer en función de la edad (Problema 20-7). (A) Probabilidad de muerte por cáncer de colon en mujeres. (B) Probabilidad de muerte por cáncer de mama en mujeres. (C) Probabilidad de muerte por cáncer cervical. En todos los casos, los datos están representados como el logaritmo de la probabilidad de muerte en relación a la edad del paciente (en una escala logarítmica) a su muerte. Las líneas rectas en B y C se han dibujado a partir de los datos de los grupos más jóvenes, mientras que la línea en A se ha dibujado con los datos de todos los puntos. (Datos de P. Armitage y R. Doll, *Br. J. Cancer* 91:1983-1989, 2004. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

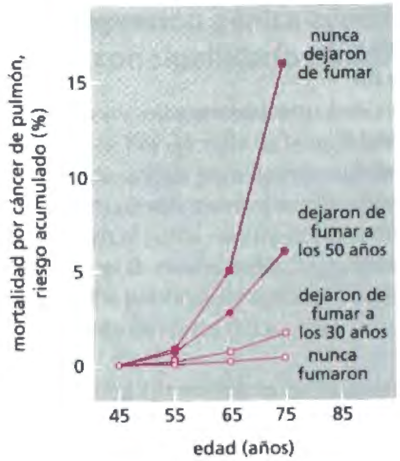


Figura P20–2 Riesgo acumulado de mortalidad por cáncer de pulmón para no fumadores, fumadores y ex fumadores (Problema 20–9). El riesgo acumulado es el número total de muertes, en porcentaje, para cada grupo. Así pues, para los fumadores continuos, el 1% murió de cáncer de pulmón entre los 45 y los 55 años de edad; un 4% más murió entre los 55 y los 65 (lo que suma un riesgo acumulado del 5%), y un 11% murió entre los 65 y los 75 (con un riesgo acumulado del 16%).

probabilidad de muerte dependiente de la edad en el cáncer de mama y cervical disminuye de forma marcada, mientras que las muertes debidas al cáncer de colon continúan incrementándose. ¿Por qué el aumento de la probabilidad de muerte para el cáncer de mama y cervical en función de la edad disminuye después de los 50 años?

20–8 Por analogía con los automóviles, los defectos en los genes críticos para el cáncer están asociados a frenos deficientes y a aceleradores hiperactivos, provocados en algunos casos por fallos en los servicios debidos a mecánicos incompetentes. Utilizando esta analogía, decidir cómo los oncogenes, los genes supresores de tumores y los genes de mantenimiento de DNA se relacionan con frenos rotos, aceleradores hiperactivos y mecánicos malos. Explicar los fundamentos de cada una de estas elecciones.

20–9 La mortalidad debida al cáncer de pulmón se estudió en grupos de hombres en el Reino Unido durante un periodo de 50 años. La **Figura P20–2** muestra el riesgo acumulativo de muerte debido al cáncer de pulmón en función de la edad y de los hábitos de fumar, en cuatro grupos diferentes de hombres: los que nunca fumaron, los que pararon de fumar a los 30, los que dejaron de fumar a los 50 y los que continuaron fumando. A partir de estos datos se constata claramente que un individuo puede reducir sustancialmente el riesgo de morir a causa de cáncer de pulmón si deja de fumar. ¿Cuál puede ser la base biológica para esta observación?

20–10 El diablo de Tasmania, un marsupial carnívoro australiano, se ve amenazado con la extinción por la expansión de una enfermedad fatal en la que un tumor maligno oral-facial interfiere con la capacidad del animal para alimentarse. Parece claro que el cáncer pasa de alguna manera de un individuo a otro por las frecuentes luchas entre estos animales, en las cuales se muerden la cara y la boca. Para descubrir el origen del cáncer, se aíslan y se analizan tumores procedentes de 11 diablos capturados en regiones muy separadas. Como podría esperarse, los cariotipos de las células tumorales están muy relacionados con los del diablo salvaje (**Figura P20–3**). Sorprendentemente, los cariotipos de las 11 muestras de tumor son muy parecidos. Además, uno de los diablos de Tasmania tiene una inversión en el cromosoma 5 que no se encuentra en su tumor facial. ¿Por qué se supone que el cáncer se ha transmitido de un individuo a otro? ¿Es probable que aparezca como consecuencia de una infección por un virus o un microorganismo? Explicar de forma detallada el razonamiento efectuado.

20–11 Ahora que la secuenciación del DNA es tan barata, fácil y rápida es posible rastrear *todas* las mutaciones en un conjunto de tumores humanos. Un proyecto de investigación se centra en el cáncer de mama y el cáncer colono-rectal puesto que son responsables del 14% de las muertes por cáncer. Para cada uno de los 11 tumores de mama y de los 11 cánceres colono-rectales, se diseñan cebadores para amplificar 120.839 exones en 14.661 transcritos de 13.023 genes. Como controles, se amplifican las mismas regiones a partir de muestras de DNA tomadas de dos individuos normales. Después de secuenciar los productos de PCR y utilizar un software analítico para comparar las 456 Mb de la secuencia tumoral con la secuencia del genoma humano publicada, se encuentran 816.986 mutaciones puntuales. Este dato representa más de 37.000 mutaciones por tumor. Seguramente no puede ser cierto.

Como el ordenador produce errores al nombrar las bases, se inspecciona visualmente cada lectura secuenciada y se excluyen

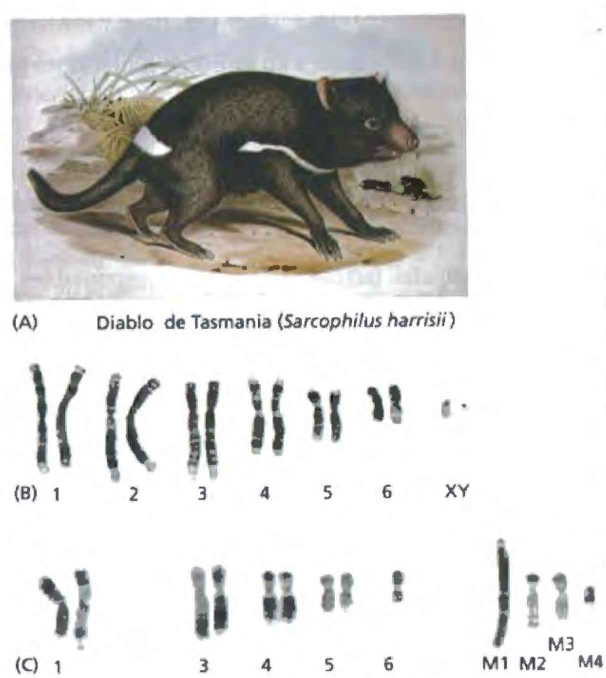


Figura P20–3 Cariotipos de las células de diablos de Tasmania (Problema 20–10). (A) Diablo de Tasmania. (B) Cariotipo normal de un diablo de Tasmania. El cariotipo tiene 14 cromosomas, incluyendo XY. (C) Cariotipo de células tumorales encontrado en cada uno de los 11 tumores faciales estudiados. El cariotipo tiene 13 cromosomas, no tiene cromosomas sexuales, no tiene el par correspondiente al cromosoma 2, sólo tiene un cromosoma 6, tiene dos cromosomas 1 con deleciones en los brazos largos y cuatro cromosomas más con elevadas reorganizaciones (M1-M4). (De A.M. Pearse y K. Swift, *Nature* 439:549, 2006. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

353.378 cambios, lo que deja una cantidad de 463.248 mutaciones o cerca de 21.000 mutaciones por tumor. Todavía demasiadas.

A. ¿Es popsible sugerir al menos otras tres fuentes de mutaciones aparentes que no contribuirían al tumor?

B. Después de aplicar diferentes criterios para filtrar cambios de secuencia irrelevantes, se observan un total de 1307 mutaciones en 22 cánceres colono-rectales y de mama, o aproximadamente 59 mutaciones por tumor. ¿Cómo decidir cuáles de estos cambios de secuencia están relacionados con mutaciones de los tumores y cuáles son probablemente mutaciones "pasajeras" que se han producido en los genes sin estar relacionadas con el cáncer (pero encontradas en los tumores porque se han producido en las mismas células con mutaciones verdaderamente cancerosas)?

C. ¿Detectará la estrategia de secuenciación todos los posibles cambios genéticos que afectan a los genes diana en las células tumorales?

20-12 La mayoría de los tratamientos antitumorales están diseñados para eliminar a las células tumorales, normalmente provocando su apoptosis. Sin embargo, un cáncer específico –la leucemia promielocítica aguda (APL)– ha sido tratada con éxito con el ácido todo-*trans*-retinoico, que induce la diferenciación de los promielocitos a neutrófilos. ¿Cómo ayudaría al paciente un cambio en el estado de diferenciación de las células tumorales APL?

20-13 Un objetivo importante de las terapias modernas antitumorales es la identificación de moléculas pequeñas –fármacos anticancerosos– que puedan ser utilizadas para inhibir los productos de genes críticos para el cáncer. Si el objetivo es la búsqueda de tales moléculas, ¿la mejor opción es diseñar inhibidores de los productos de oncogenes, de los genes supresores tumorales o de los genes de mantenimiento del DNA? Explicar por qué se seleccionaría (o no) cada tipo de gen.

BIBLIOGRAFÍA

General

Bishop JM (2004) How to Win the Nobel Prize: An Unexpected Life in Science. Harvard University Press: Cambridge MA.

Stillman B & Stewart D (eds) (2005) Molecular Approaches to Controlling Cancer. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor.

Weinberg RA (2007) The Biology of Cancer. Garland Science: New York.

El cáncer como proceso microevolutivo

Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M et al (2004) Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 14:43–47.

Bielas JH, Loeb KR, Rubin BP et al (2006) Human cancers express a mutator phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:18238–18242.

Cairns J (1975) Mutation, selection and the natural history of cancer. *Nature* 255:197–200.

Campisi J (2005) Senescent cells, tumor supression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120:513–522.

Evan GI & Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411:342–348.

Fialkow PJ (1976) Clonal origin of human tumors. *Biochim Biophys Acta* 458:283–321.

Fidler IJ (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Rev Cancer* 3:453–458.

Jones PA & Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Rev Genet* 3:415–428.

Loeb LA, Loeb KR & Anderson JP (2003) Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:776–781.

Lowe SW, Cepero E & Evan G (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432:307–315.

Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194:23–28.

Pardal R, Clarke MF & Morrison SJ (2003) Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature Rev Cancer* 3:895–902.

Sjöblom T, Jones S, Wood LD et al (2006) The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314:268–274.

Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Rev Cancer* 2:442–454.

Tlsty TD & Coussens LM (2006) Tumor Stroma and Regulation of Cancer Development. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 1:119–150.

Ward RJ & Dirks PB (2007) Cancer stem cells: at the headwaters of tumor development. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2:175–189.

Causas del cáncer que podemos prevenir

Ames B, Durston WE, Yamasaki E & Lee FD (1973) Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:2281–2285.

Berenblum I (1954) A speculative review: the probable nature of promoting action and its significance in the understanding of the mechanism of carcinogenesis. *Cancer Res* 14:471–477.

Cairns J (1985) The treatment of diseases and the war against cancer. *Sci Am* 253:51–59.

Doll R (1977) Strategy for detection of cancer hazards to man. *Nature* 265:589–597.

Doll R & Peto R (1981) The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 66:1191–1308.

Hsu IC, Metcalf RA, Sun T et al (1991) Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 350:427–428.

Newton R, Beral V & Weiss RA (eds) (1999) Infections and Human Cancer. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor.

Peto J (2001) Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 411:390–395.

Descubrimiento de los genes críticos del cáncer

Davies H, Bignell GR, Cox C et al (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949–954.

Easton DF, Pooley KA, Dunning AM et al (2007) Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 447:1087–1095.

Feinberg AP (2007) Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 447:433–440.

Herman JG & Baylin SB (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349:2042–2054.

Lowe SW, Cepero E & Evan G (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432:307–315.

Mitelman F, Johansson B & Mertens F (2007) The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nature Rev Cancer* 7:233-245.

Pinkel D & Albertson DG (2005). Comparative genomic hybridization. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6:331–354.

Rowley JD (2001) Chromosome translocations: dangerous liasisons revisited. *Nature Rev Cancer* 1:245–250.

The Wellcome Trust Case Control Consortium (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447:661–683.

Westbrook TF, Stegmeier F & Elledge SJ (2005) Dissecting cancer pathways and vulnerabilities with RNAi. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70:435–444.

Bases moleculares del comportamiento de las células tumorales

Artandi SE & DePinho RA (2000) Mice without telomerase: what can they teach us about human cancer? *Nature Med* 6:852–855.

Brown JM & Attardi LD (2005) The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature Rev Cancer* 5:231–237.

Chambers AF, Naumov GN, Vantyghem S & Tuck AB (2000) Molecular biology of breast cancer metastasis: clinical implications of experimental studies on metastatic inefficiency. *Breast Cancer Res* 2:400–407.

Edwards PAW (1999) The impact of developmental biology on cancer research: an overview. *Cancer Metastasis Rev* 18:175–180.
Futreal PA, Coin L, Marshall M et al (2004) A census of human cancer genes. *Nature Rev Cancer* 4:177–183.
Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57–70.
Hoffman RM (2005) The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer *in vivo*. *Nature Rev Cancer* 5:796–806.
Kinzler KW & Vogelstein B (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87:159–170.
Levine AJ, Hu W & Feng Z (2006) The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* 13:1027–1036.
Macleod KF & Jacks T (1999) Insights into cancer from transgenic mouse models. *J Pathol* 187:43–60.
Mani SA, Yang J, Brooks M et al (2007) Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:10069–10074.
Mueller MM & Fusenig NE (2004) Friends or foes—bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature Rev Cancer* 4:839–849.
Plas DR & Thompson CB (2005) Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene* 24:7435–7442.
Ridley A (2000) Molecular switches in metastasis. *Nature* 406:466–467.
Shaw RJ & Cantley LC (2006) Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 441:424–430.
Sherr CJ (2006) Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nature Rev Cancer* 6:663–673.
Vogelstein B & Kinzler KW (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nature Med* 10:789–799.
Weinberg RA (1995) The retinoblastoma protein and cell-cycle control. *Cell* 81:323–330.

El tratamiento del cáncer: presente y futuro

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE et al (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403:503–511.
Baselga J & Albanell J (2001) Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. *Annu Oncol* 12:S35–S41.
Druker BJ & Lydon NB (2000) Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 105:3–7.
Folkman J (1996) Fighting cancer by attacking its blood supply. *Sci Am* 275:150–154.
Golub TR, Slonim DK, Tamayo P et al (1999) Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286:531–537.
Huang P & Oliff A (2001) Signaling pathways in apoptosis as potential targets for cancer therapy. *Trends Cell Biol* 11:343–348.
Garraway LA & Sellers WR (2006) Lineage dependency and lineage-survival oncogenes in human cancer. *Nature Rev Cancer* 6:593–602.
Jonkers J & Berns A (2004) Oncogene addiction: sometimes a temporary slavery. *Cancer Cell* 6:535–538.
Jain RK (2005) Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307:58–62.
Kim R, Emi M & Tanabe K (2007) Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121:1–14.
Madhusudan S & Middleton MR (2005) The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. *Cancer Treat Rev* 31:603–617.
Roninson IB, Abelson HT, Housman DE et al (1984) Amplification of specific DNA sequences correlates with multi-drug resistance in Chinese hamster cells. *Nature* 309:626–628.
Sarkadi B, Homolya L, Szakács G & Váradi A (2006) Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev* 86:1179–236.
Sawyers C (2004) Targeted cancer therapy. *Nature* 432:294–297.
van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ et al (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415:530–536.
Varmus H, Pao W, Politi K et al (2005) Oncogenes come of age. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70:1–9.
Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME et al (2007) Restoration of p53 function leads to tumour regression *in vivo*. *Nature* 445:661–665.

Capítulo 21

La reproducción sexual: meiosis, células germinales y fecundación

21

El sexo no es imprescindible para la reproducción. Los organismos unicelulares pueden reproducirse mediante una simple división mitótica y la mayoría de las plantas se propagan vegetativamente formando agregados pluricelulares que después se separan de la planta madre. De manera semejante, en el mundo animal un solo individuo pluricelular de *Hydra* puede producir descendientes por gemación (**Figura 21–1**) y las anémonas y los gusanos marinos se dividen en dos mitades, cada una de las cuales regenera la mitad que falta. Así mismo, existen algunas especies de lagartos, constituidas exclusivamente por hembras, que se reproducen sin apareamiento. Esta **reproducción asexual**, que es sencilla y directa, da lugar a una descendencia que es idéntica en términos genéticos al organismo progenitor. Por el contrario, la **reproducción sexual** implica la mezcla de los genomas procedentes de dos individuos distintos produciendo descendientes que se diferencian genéticamente entre sí y también de los padres. Parece que la reproducción sexual presenta grandes ventajas, ya que ha sido adoptada por la gran mayoría de plantas y animales. Incluso muchos procariotas y eucariotas que por lo general se reproducen de manera asexual, de vez en cuando adoptan el intercambio genético, dando lugar así a descendencia con nuevas combinaciones de genes. En este capítulo se describe la maquinaria celular de la reproducción sexual. Antes de estudiar con detalle cómo funciona esta maquinaria, consideraremos lo que implica la reproducción sexual y las ventajas que aporta.

En este capítulo

LA REPRODUCCIÓN SEXUAL 1269

MEIOSIS 1272

CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES Y DETERMINACIÓN DEL SEXO EN LOS MAMÍFEROS 1282

OOCITOS 1287

ESPERMATOZOIDES 1292

FECUNDACIÓN 1297

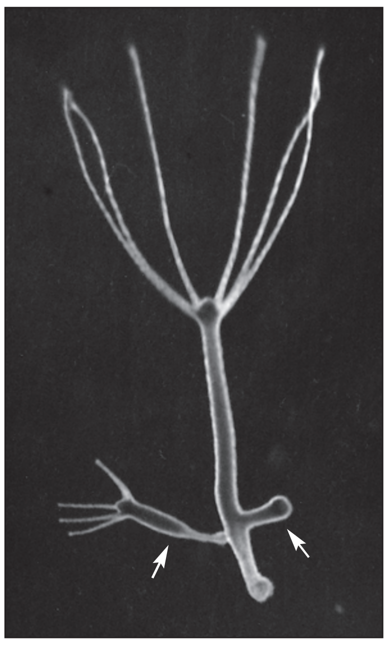


Figura 21–1 Fotografía de una *Hydra* en la que se están formando dos nuevos organismos por gemación *(flechas).* Los descendientes, genéticamente idénticos al individuo progenitor, se separarán de él y vivirán de forma independiente. (Cortesía de Amata Hornbruch.)

LA REPRODUCCIÓN SEXUAL

La reproducción sexual tiene lugar en organismos **diploides**, en los que cada célula contiene dos juegos de cromosomas, heredados, respectivamente, de cada uno de los progenitores. Sin embargo, las células especializadas que llevan a cabo la reproducción sexual, son **haploides**; cada una de ellas contiene una sola dotación cromosómica. En la etapa final de la reproducción sexual, se fusionan dos células haploides procedentes de dos individuos distintos, se mezclan los dos genomas y se restablece el estado diploide. La reproducción sexual requiere, por lo tanto, un tipo especial de división celular denominado *meiosis*, mediante el cual, a partir de células precursoras diploides se producen células germinales haploides, a diferencia de lo que ocurre en la mitosis normal de las células diploides.

En la reproducción sexual de los organismos pluricelulares, las células haploides producidas por meiosis se diferencian en **gametos** muy especializados: *oocito* (u *óvulo*), *espermatozoide,* polen o esporas. En general, las hembras producen oocitos grandes e inmóviles, mientras que los machos producen espermatozoides pequeños y móviles (**Figura 21–2**). La *fecundación* consiste en la fusión de un espermatozoide y un oocito, ambos haploides, para formar una célula diploide (un oocito maduro fecundado o *zigoto*) que contiene una nueva combinación de cromosomas. A partir del zigoto se forma un nuevo organismo pluricelular, mediante sucesivas mitosis seguidas por procesos de especialización celular, entre los que se incluye la producción de los gametos (**Figura 21–3**A).

En los eucariotas superiores, la fase haploide es breve

En la mayor parte de los organismos que se reproducen sexualmente, las células diploides proliferan por divisiones mitóticas, y las células haploides, formadas mediante meiosis, no proliferan. Algunos de los organismos más sencillos, como las levaduras de fisión, son excepcionales en el sentido que son las células haploides las que proliferan por mitosis y las

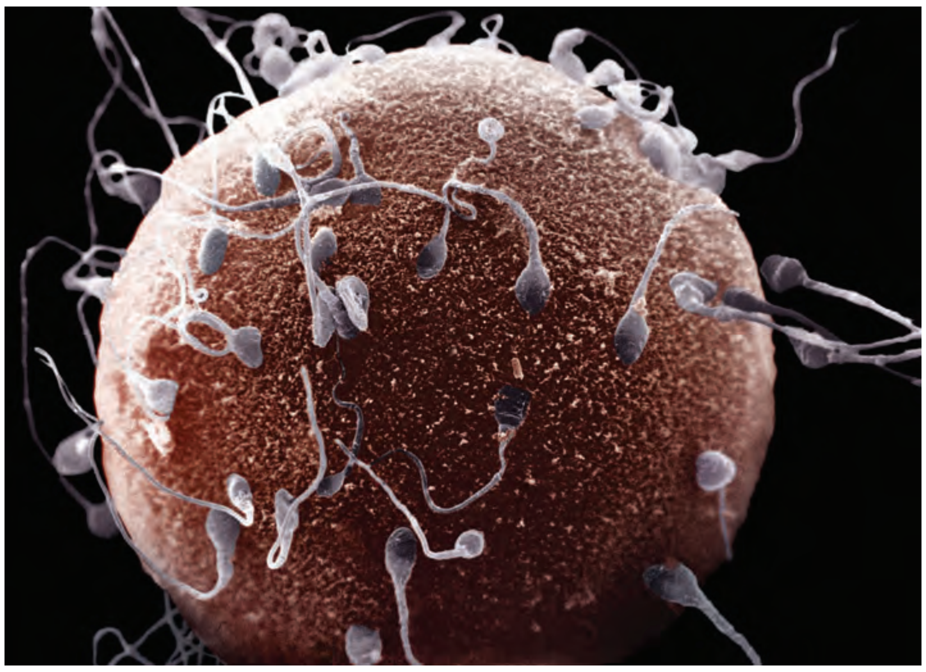


Figura 21–2 Electromicrografía de barrido de un oocito con numerosos espermatozoides humanos adheridos a su superficie. El oocito está inmóvil, pero los espermatozoides presentan una gran movilidad. Como se describirá más adelante, a pesar de que se hayan adherido muchos espermatozoides al oocito, sólo uno lo fecundará. (Cortesía de D. Phillips/ Biblioteca de Photo Science.)

células diploides formadas por la fusión de células haploides entran de forma directa en meiosis dando lugar a nuevas células haploides (Figura 21–3B). En las plantas se da una situación menos extrema, debido a que se producen divisiones mitóticas tanto en la fase haploide como en la diploide. Sin embargo en la mayor parte de las plantas primitivas, como musgos y helechos, la fase haploide es muy breve y sencilla, mientras que la fase diploide abarca un periodo largo del desarrollo y de la proliferación celular.

En la mayoría de los animales pluricelulares, incluidos los vertebrados, sólo proliferan las células diploides: los gametos haploides tienen una existencia corta, no se dividen y están completamente especializados para realizar la fusión sexual. En estos organismos se esta-

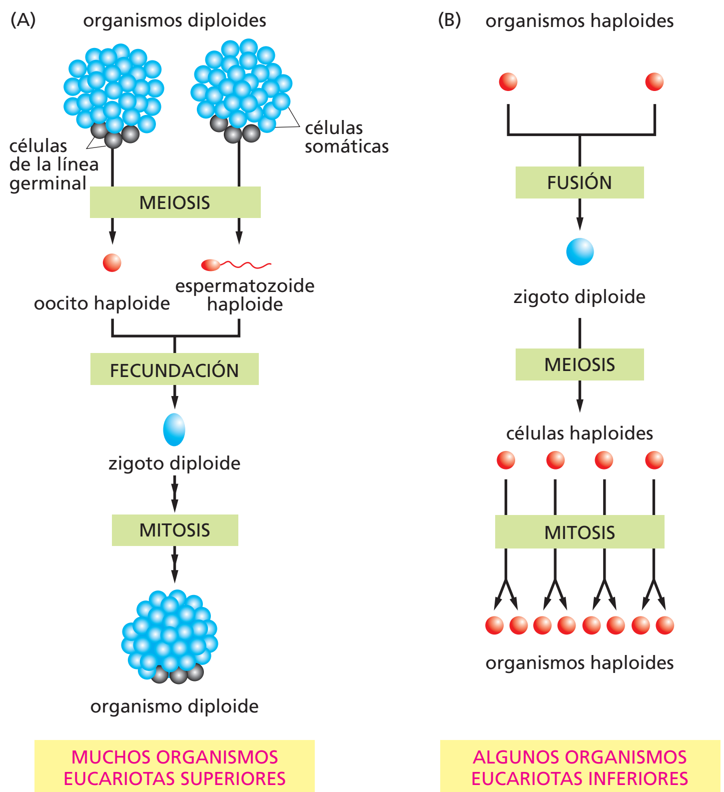


Figura 21–3 Células haploides y diploides en el ciclo vital de algunos eucariotas sencillos y eucariotas complejos. (A) Las células haploides se representan en *rojo* y las diploides en *azul*. Normalmente, las células de la mayoría de animales y plantas proliferan durante la fase diploide, formando un organismo pluricelular; sólo los gametos (oocitos y espermatozoides en los animales) son haploides, los cuales se fusionan en la fecundación dando lugar a un zigoto diploide, a partir del cual se desarrolla un nuevo individuo. Los gametos se forman en las gónadas a partir de las células diploides de la línea germinal (*gris*); todas las demás células son células somáticas. (B) En cambio, en algunos organismos eucariotas sencillos, como las levaduras de fisión y el alga verde *Chlamydomonas,* son las células haploides las que proliferan, de forma que la única célula diploide es el zigoto que subsiste transitoriamente después de la fecundación.

blece una clara distinción entre las células de la **línea germinal** (o **células germinales**) que incluyen los gametos y sus células precursoras específicas diploides y las **células somáticas**, que forman el resto del organismo y que mueren sin dejar descendencia. (Figura 21–3A) En cierto sentido, las células somáticas solamente existen para ayudar a las células de la línea germinal a sobrevivir, desarrollarse y transmitir su DNA a la generación siguiente.

La meiosis genera diversidad genética

Los organismos que se reproducen sexualmente heredan dos juegos de cromosomas, uno de cada progenitor. Cada juego contiene los *autosomas*, que son comunes para todos los miembros de la especie, y los *cromosomas sexuales*, que se encuentran distribuidos de forma distinta según el sexo del individuo. Por consiguiente, cada núcleo diploide contiene dos versiones muy similares de cada autosoma, más un juego de cromosomas sexuales propios del sexo del individuo. Las dos copias de cada autosoma, una procedente de la madre la otra del padre, se denominan **cromosomas homólogos**, o simplemente **homólogos**, y en la mayoría de células se mantienen de forma separada como cromosomas independientes. Sin embargo, durante la meiosis cada cromosoma puede comunicarse con su par homólogo mediante apareamiento físico y experimentar la recombinación genética. Esta comunicación es esencial para que los homólogos se segreguen correctamente a cada una de las dos células hijas, durante la meiosis.

La principal característica de la meiosis es que a partir de dos células haploides formadas en el organismo, se generan células haploides genéticamente diferentes unas de otras. Las diferencias genéticas se producen por dos mecanismos. En primer lugar, cada uno de los gametos contiene la versión materna o paterna de cada cromosoma; debido a que la elección materna o paterna tiene lugar de forma independiente y al azar para cada par de homólogos, los cromosomas originales maternos y paternos se reorganizan formando nuevas combinaciones en las células haploides. En segundo lugar, aunque las versiones materna y paterna de cada cromosoma tienen secuencias de DNA similares, pero no idénticas, y han experimentado recombinación genética durante la meiosis –proceso denominado *entrecruzamiento* (descrito en el Capítulo 5)–, se producen versiones nuevas híbridas de cada cromosoma; de modo que cada cromosoma de un gameto contiene una única mezcla de información genética procedente de ambos progenitores. Estos dos mecanismos serán estudiados en profundidad más adelante (Figura 21–13).

La reproducción sexual proporciona a los organismos una ventaja competitiva

La maquinaria de la reproducción sexual es complicada y los recursos que se le dedican son importantes (**Figura 21–4**) ¿Por qué se desarrolló y qué beneficios aporta? Los individuos que se reproducen sexualmente presentan una descendencia variada, cuyos genotipos tienen tantas probabilidades de representar un cambio para mejorar como para empeorar. Por lo tanto, ¿por qué estos individuos deben tener una ventaja competitiva frente a los que normalmente se reproducen por un proceso asexual? Este problema continúa dejando perplejos a los biólogos evolucionistas.

Una ventaja de la reproducción sexual parece ser la reorganización de los genes, que ayuda a las especies a sobrevivir en un medio ambiente que cambia de modo imprevisible. Si unos progenitores producen muchos descendientes con una amplia variedad de combinaciones genéticas, aumenta la probabilidad de que como mínimo uno de sus descendientes tenga la combinación de caracteres necesarios para sobrevivir a los cambios del medio. En efecto, una población de levaduras de gemación manipuladas genéticamente de manera que no se produzcan recombinaciones durante la meiosis y, por lo tanto, no se pueden reproducir sexualmente, se adapta mucho menos en un mismo periodo de tiempo a las condiciones adversas del medio que una población salvaje que se reproduce sexualmente.

Otra ventaja de la reproducción sexual parece ser que permite eliminar genes perjudiciales de una población: por lo general las hembras se aparean con el macho más adecuado, de modo que el macho menos conveniente no engendra descendencia y sólo es una especie de contenedor de basura genética. Esta rigurosa selección de los machos significa que los genes “buenos” se transmiten mientras que los genes “malos” se pierden. El resultado es que los individuos de la población que se reproducen de forma sexual presentan, por término medio, mejores competencias que los individuos de una población equivalente que se reproducen de forma asexual.



Figura 21–4 Un pavo real desplegando su vistosa cola. El exagerado plumaje tiene la finalidad de atraer a las hembras para la reproducción sexual. Este plumaje se ha desarrollado para que sólo los machos más adecuados y más atractivos dejen descendencia. (Cortesía de Cyril Laubscher.)

Cualquiera que sean las ventajas de la reproducción sexual, sorprende que casi todos los organismos complejos actuales han evolucionado tras generaciones de reproducción sexual y no de reproducción asexual. Los organismos asexuados, aunque muy abundantes, han permanecido comparativamente sencillos y primitivos.

Vamos a examinar ahora con detalle los mecanismos de la reproducción sexual, comenzando con los procesos de la meiosis. Centraremos nuestro estudio en los mamíferos. De qué forma las células diploides de la línea germinal dan lugar a los gametos y cómo se determina el sexo en un mamífero. Más adelante se considerarán los gametos en sí mismos. Por último describiremos cómo es el proceso de la fecundación, en el que los dos gametos se fusionan formando un nuevo organismo diploide.

Resumen

El ciclo de la reproducción sexual comprende una alternancia de estados haploide y diploide: las células diploides se dividen por meiosis formando células haploides, y las células haploides procedentes de dos individuos distintos, se fusionan de dos en dos formando un zigoto diploide. En este proceso, los genomas se mezclan y se recombinan dando lugar a individuos con nuevas combinaciones genéticas. En la mayoría de los eucariotas superiores, las células diploides proliferan mediante mitosis y sólo una pequeña proporción de ellas (las células de la línea germinal) experimentan meiosis produciendo células haploides; las células haploides se transforman en gametos –células especializadas para la reproducción sexual– de corta existencia y que no se dividen. La reproducción sexual es ventajosa porque además de producir individuos con combinaciones genéticas nuevas, algunas de las cuales podrán sobrevivir y procrear en condiciones ambientales imprevisibles, proporciona una vía eficaz para eliminar mutaciones perjudiciales para la población.

MEIOSIS

La constatación de que los gametos son células haploides se obtuvo a partir de una observación que también fue la primera en sugerir que los cromosomas son los portadores de la información genética. En 1883, se descubrió, estudiando gusanos, que tanto el núcleo de un oocito no fecundado como el de un espermatozoide tienen dos cromosomas, mientras que el huevo fecundado (zigoto) tiene cuatro. Esto llevó a la teoría cromosómica de la herencia la cual permite explicar la antigua paradoja de que las contribuciones materna y paterna a la naturaleza de la progenie son aparentemente iguales, a pesar de la enorme diferencia de tamaño entre el oocito y el espermatozoide (véase Figura 21–2).

Este descubrimiento implica también que las células germinales se forman según un tipo especial de división nuclear en la cual los cromosomas se dividen exactamente por la mitad. En los animales, este tipo de división llamada **meiosis –**palabra de origen griego que significa *disminución* o *reducción*– se inicia en las células diploides de la línea germinal dentro de los ovarios o de los testículos. Podría parecer como si la meiosis se tratase de una simple modificación de la mitosis en la que se omitiese la síntesis de DNA (fase S), de forma que una sola división celular produjera dos células haploides. La meiosis es mucho más compleja que esto e implica dos divisiones celulares, pero sólo una ronda de síntesis de DNA. No fue hasta el inicio de la década de 1930 que, gracias a minuciosos trabajos citológicos y genéticos, se pudieron establecer las características básicas de la meiosis. Estudios más recientes en el campo de la biología molecular y de la genética, han permitido identificar varias proteínas específicas de la meiosis, responsables del distinto comportamiento de los cromosomas en comparación con los cromosomas mitóticos y de la recombinación genética, dos de los procesos que tienen lugar durante la meiosis. Veremos que los pasos de la recombinación son importantes, no sólo por la mezcla genética sino también para la correcta segregación cromosómica durante la meiosis.

Los gametos son el resultado de dos divisiones meióticas

Los mecanismos moleculares y los sistemas de control de la meiosis son, en su mayor parte, los mismos que actúan en la mitosis normal. No obstante, este capítulo se centrará en las características especiales de la meiosis que la distinguen de la mitosis. Al iniciarse la meiosis, lo mismo que en la mitosis, los cromosomas han replicado su DNA (en la fase S de la meiosis) y las dos copias están estrechamente unidas entre ellas por los *complejos de cohesinas* a lo

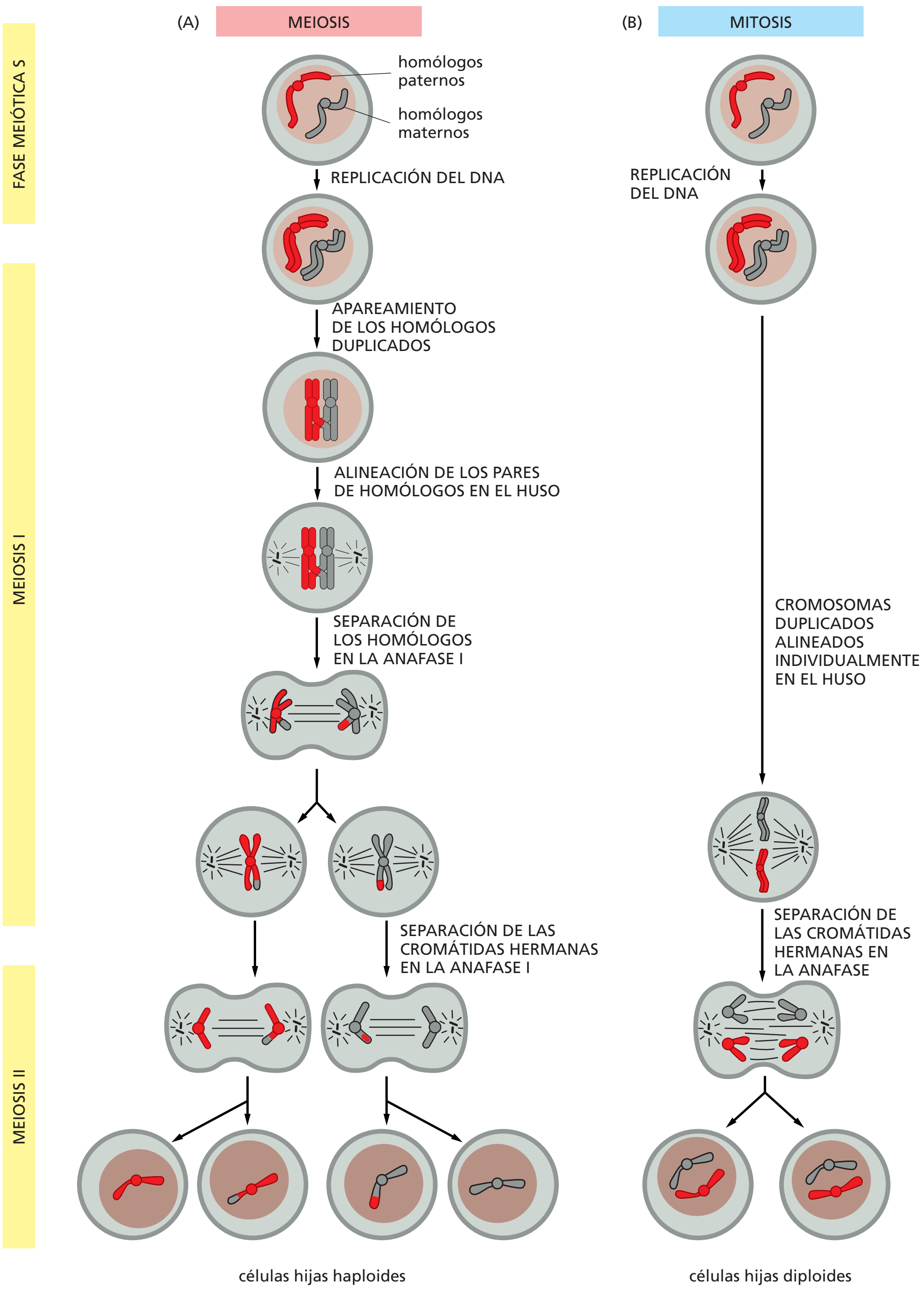


Figura 21–5 Comparación entre la mitosis y la meiosis celular. Para una mejor comprensión, solamente se representa un par de cromosomas homólogos (u homólogos). (A) Durante la meiosis, después de la replicación del DNA, son necesarias dos divisiones nucleares (y celulares) para producir gametos haploides. En la meiosis I, los homólogos duplicados, constituidos por las cromátidas hermanas estrechamente unidas, se aparean y se segregan a distintas células hijas; solamente en la meiosis II se separan las cromátidas hermanas. Tal como indica la representación de los cromosomas, que son parcialmente *rojos* y parcialmente *grises*, el apareamiento de los homólogos da lugar a la recombinación genética (entrecruzamiento) durante la meiosis I, como se explica más adelante. Cada célula diploide que entra en meiosis produce cuatro células haploides genéticamente distintas. <AGTG> (B) En la mitosis en cambio, los homólogos no se aparean y las cromátidas hermanas se separan durante una sola división. De esta manera, cada célula diploide que se divide por mitosis da lugar a dos células hijas diploides idénticas en términos genéticos.

largo de toda su longitud (véase Figura 17–24) constituyendo las llamadas **cromátidas hermanas.** Sin embargo, a diferencia de la mitosis, la meiosis da lugar a gametos con la mitad de cromosomas que sus células precursoras diploides. Este hecho se consigue mediante la modificación del programa mitótico, ya que a una única ronda de replicación de DNA le siguen dos rondas sucesivas de segregación cromosómica (**Figura 21–5**A). Cabe recordar que en la mitosis (tratada en el Capítulo 17), los cromosomas duplicados se alinean al azar en el ecuador del huso mitótico y que las cromátidas hermanas son arrastradas y segregadas a las dos células hijas, de manera que cada célula hija hereda un juego diploide completo de cromosomas y es genéticamente idéntica a la célula madre (Figura 21–5B). Por el contrario, en la primera división de la meiosis (**meiosis I**), los homólogos duplicados pater-

no y materno (incluidos los dos cromosomas sexuales replicados) se sitúan uno al lado del otro en toda su longitud e intercambian información genética mediante la recombinación genética. Entonces se alinean en el ecuador del huso meiótico, después de lo cual los homólogos duplicados son arrastrados y segregados a las dos células hijas, en lugar de las cromátidas hermanas. Sólo en la segunda división de la meiosis (**meiosis II**), que tiene lugar sin replicación de DNA, las cromátidas hermanas son arrastradas y segregadas produciendo células hijas haploides. De esta manera, cada célula diploide que entra en meiosis produce cuatro células haploides, cada una de las cuales hereda una copia materna o una copia paterna de cada cromosoma, pero no las dos (véase Figura 21– 5 A).

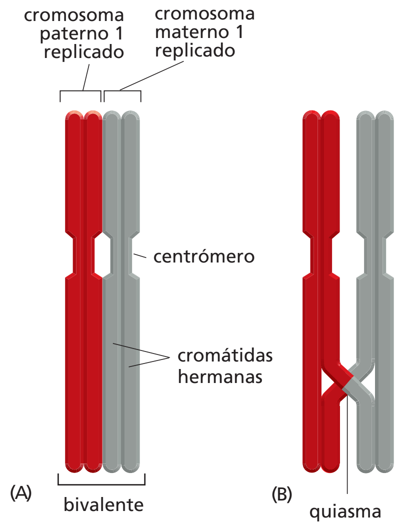


Figura 21–6 Alineación de los homólogos y entrecruzamiento. (A) La estructura formada por dos cromosomas homólogos estrechamente alineados se denomina un *bivalente.* Igual que en la mitosis, las cromátidas hermanas de cada homólogo están estrechamente conectadas en toda su longitud, así como en los centrómeros. En este estadio, por lo general los homólogos están unidos entre sí por un complejo proteico denominado *complejo sinaptinémico* (no representado; véase Figura 21–9). (B) Bivalente en un estadio más avanzado en el que se ha producido un entrecruzamiento entre dos cromátidas no hermanas. Sólo cuando el complejo sinaptinémico se desorganiza y los pares de homólogos se separan un poco, al final de la profase I, el entrecruzamiento se ve como una fina conexión entre los homólogos llamada *quiasma*, como aparece en la imagen.

Los cromosomas homólogos duplicados (y los cromosomas sexuales) se aparean durante la profase I temprana

En la mitosis de la mayoría de organismos, los cromosomas homólogos se comportan de forma independiente unos de otros. Sin embargo, durante la meiosis I, es fundamental que los homólogos se reconozcan uno a otro y se asocien físicamente para que los homólogos paterno y materno experimenten la recombinación genética y se segreguen a las distintas células hijas en la anafase I. Mecanismos especiales intervienen en estas íntimas interacciones entre los cromosomas homólogos.

La progresiva yuxtaposición de los homólogos tiene lugar durante una profase meiótica muy larga (profase I), que puede durar horas en las levaduras, días en los ratones y semanas en las plantas superiores. Como en la mitosis, los cromosomas duplicados de la profase meiótica aparecen al inicio como estructuras filamentosas, en las que las cromátidas hermanas están tan estrechamente unidas entre sí que parecen una sola. Es durante la profase I temprana que los homólogos empiezan a asociarse longitudinalmente en un proceso que se denomina **apareamiento**, en algunos organismos se produce, en principio, mediante interacciones entre secuencias de DNA complementario (llamadas *zonas de apareamiento*) de los homólogos; en la mayoría de organismos, el apareamiento estable requiere la recombinación genética entre los dos homólogos. Durante la progresión de la profase I, la yuxtaposición de los homólogos se vuelve más estrecha y forma una estructura de cuatro cromátidas o **bivalente** (**Figura 21–6**A). Como se verá más adelante, la recombinación genética empieza durante el apareamiento en la profase I temprana, con la rotura programada de la doble hebra del DNA de las cromátidas; algunos de estos procesos de recombinación se resolverán más tarde en *entrecruzamientos*, en los que un fragmento de una cromátida materna se intercambia con un fragmento correspondiente de la cromátida paterna homóloga (Figura 21–6B; véase también la Figura 5–64).

El apareamiento de los homólogos requiere movimientos de los cromosomas, pero se desconoce qué es lo que guía estos movimientos. Durante la profase I, los cromosomas duplicados experimentan una importante redistribución dentro del núcleo. Sus extremos (los *telómeros*) están estrechamente unidos a la superficie interna de la envoltura nuclear. Inicialmente los cromosomas se encuentran repartidos de forma difusa por el núcleo, pero luego se unen de forma transitoria a una región de la envoltura nuclear, para más adelante dispersarse otra vez (**Figura 21–7**). El mecanismo y la función de estas redistribuciones se desconocen, aunque se cree que hacen que la profase I sea más rápida y eficiente. Una posi-

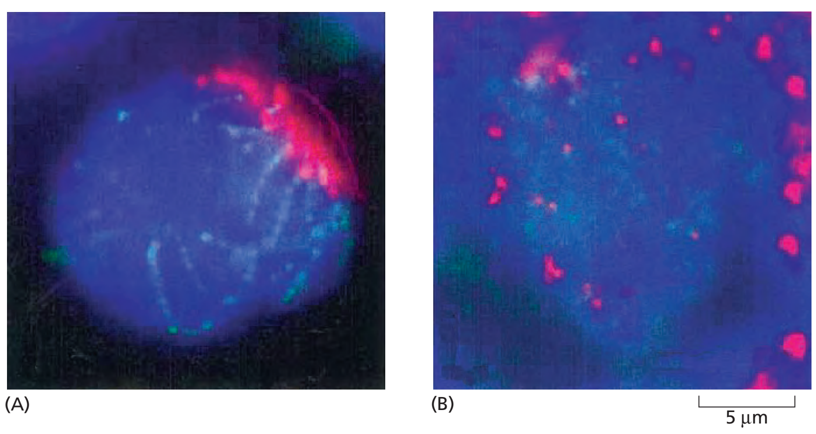


Figura 21–7 Reordenación de los telómeros durante la profase en oocitos bovinos. El núcleo está teñido en *azul* y los telómeros en *rojo*. Durante la profase I, los telómeros se adhieren a la superficie interna de la envoltura nuclear. Al principio, están dispersos por toda la envoltura nuclear (no se observa). Después, se unen estrechamente a una región de la envoltura (A); al llegar al final de la profase I, se dispersan de nuevo (B). (De C. Pfeifer et al., *Dev. Biol.* 255: 206-215, 2003. Con la autorización de Elsevier.)

bilidad es evitar que durante la profase I los cromosomas se enreden entre sí. En las levaduras de fisión es necesario que los telómeros estén estrechamente adheridos para que los homólogos se apareen y se entrecrucen. En otros organismos este hecho ocurre después de que se haya producido el apareamiento.

Hemos descrito el apareamiento de los autosomas homólogos durante la profase I, pero ¿qué sucede con los cromosomas sexuales? El hecho es que este proceso varía según los organismos. Las hembras de los mamíferos tienen dos cromosomas X, los cuales se aparean y segregan igual que los demás homólogos. Pero los machos tienen un cromosoma X y un cromosoma Y. Aunque estos cromosomas no son homólogos, también tienen que aparearse y experimentar entrecruzamiento durante la profase para segregarse con normalidad en la anafase I. Apareamiento, entrecruzamiento y segregación son posibles porque existe una pequeña región de homología entre uno o ambos extremos de los cromosomas X e Y. Los dos cromosomas se aparean y se entrecruzan en esta región durante la profase I, asegurando que cada espermatozoide recibe un cromosoma Y o un cromosoma X y no los dos o ninguno de los dos. De este modo, normalmente se producen dos tipos de espermatozoides: los que contienen un cromosoma Y, los cuales originarán embriones macho, y los que contienen un cromosoma X, que originarán embriones hembra.

El apareamiento de los cromosomas homólogos culmina con la formación del complejo sinaptinémico

El apareamiento de los homólogos se produce en una estrecha yuxtaposición de sus ejes estructurales (*ejes internos*) separados unos 400 nm, mediante un mecanismo que en la mayoría de especies depende de la rotura programada de la doble hebra del DNA de las cromátidas hermanas. ¿Qué es lo que atrae a los dos ejes? Una posibilidad es que la gran maquinaria proteica, llamada *complejo de la recombinación*, se ensamble sobre una rotura de la doble hebra de una cromátida, se una a la secuencia de DNA similar del homólogo más próximo y facilite su enrollamiento con él. Es el llamado *alineamiento presináptico* de los homólogos, seguido por la *sinapsis,* en la cual el eje interno de un homólogo se une íntimamente al eje interno de su pareja mediante un conjunto comprimido y ordenado de *filamentos transversos* formando un **complejo sinaptinémico**: se trata de puentes que determinan ahora una distancia de sólo 100 nm entre los homólogos (**Figura 21–8**). Aunque el entrecruzamiento empieza antes de que se organice el complejo sinaptinémico, el último paso se produce mientras el DNA permanece unido al complejo (véase Capítulo 5).

Los cambios morfológicos que ocurren durante el apareamiento de los cromosomas meióticos permiten dividir la profase I en cinco estadios consecutivos: leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis. Como se muestra en la **Figura 21–9**, la profase I empieza con el *leptoteno*, cuando los homólogos se condensan y se aparean y comienza la recombinación genética. En el *zigoteno,* el complejo sinaptinémico empieza a ensamblarse en regiones localizadas a lo largo de los homólogos; se inicia en los lugares donde los homólogos están estrechamente asociados y se han producido procesos de recombinación. En el *paquiteno,* se completa el ensamblaje y los homólogos se encuentran en sinapsis en toda su

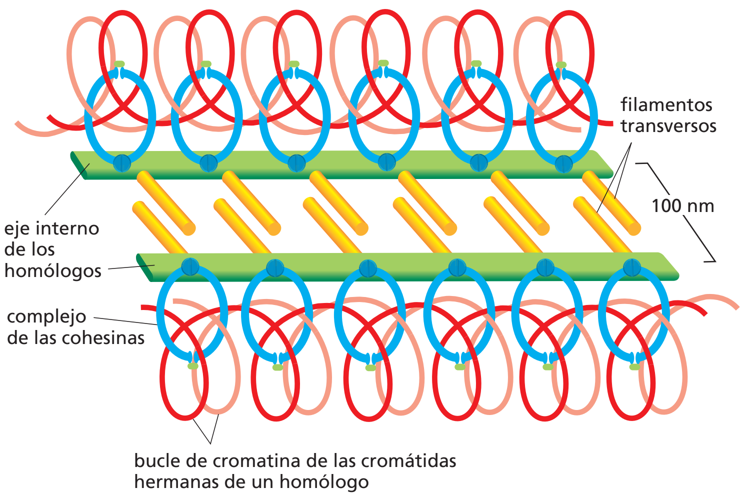


Figura 21–8 Esquema simplificado de un complejo sinaptinémico. Antes de que se forme el complejo sinaptinémico, los complejos de recombinación se unen en los puntos de rotura de la doble hebra del DNA de las cromátidas hermanas y catalizan los entrecruzamientos entre los bucles de las cromátidas no hermanas desde los lados opuestos del complejo (no mostrado en el dibujo). (Modificación a partir de K. Nasmyth, *Annu. Rev. Genet.* 35:673-745, 2001. Con la autorización de Annual Reviews.)

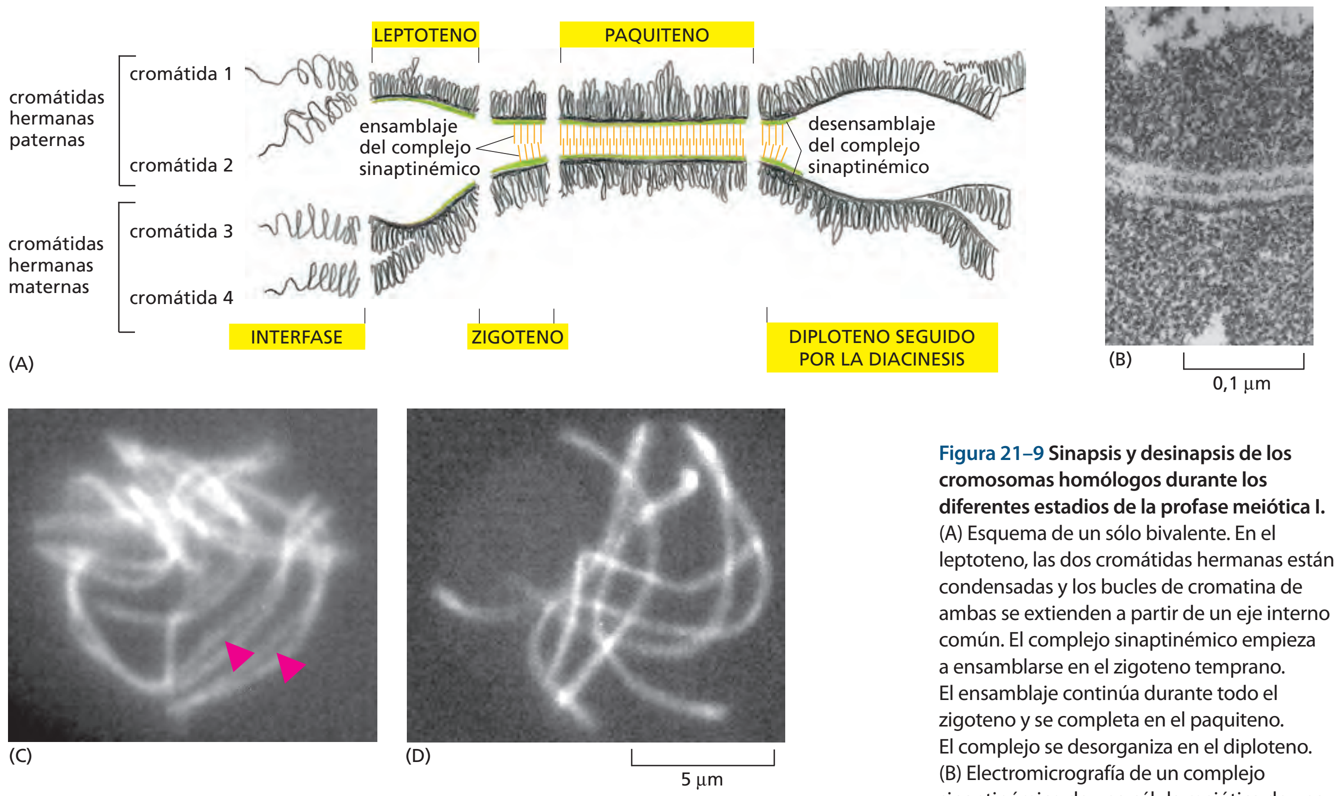


Figura 21–9 Sinapsis y desinapsis de los cromosomas homólogos durante los diferentes estadios de la profase meiótica I. (A) Esquema de un sólo bivalente. En el leptoteno, las dos cromátidas hermanas están condensadas y los bucles de cromatina de ambas se extienden a partir de un eje interno común. El complejo sinaptinémico empieza a ensamblarse en el zigoteno temprano. El ensamblaje continúa durante todo el zigoteno y se completa en el paquiteno. El complejo se desorganiza en el diploteno. (B) Electromicrografía de un complejo sinaptinémico de una célula meiótica de una flor de lirio, en paquiteno. (C y D) Micrografía de inmunofluorescencia de células del hongo *Sordaria,* en profase I. En C, se ve la sinapsis parcial de los bivalentes en zigoteno y en D, la sinapsis completa. Las *puntas de flecha rojas* en (C) indican los puntos donde la sinapsis es incompleta. (B, cortesía de Brian Wells; C y D de A. Storlazzi et al. *Genes Dev.*17: 2675-2687, 2003. Con la autorización de Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

longitud, El estadio de paquiteno puede durar varios días o más, hasta que la desinapsis empieza en el *diploteno* con el desensamblaje del complejo sinaptinémico y la consiguiente condensación y acortamiento de los cromosomas. Únicamente en este estadio, después de que los complejos se hayan desorganizado, se pueden ver cada uno de los entrecruzamientos entre cromátidas no hermanas como conexiones interhomólogas que se denominan **quiasmas**, los cuales desempeñan un papel fundamental manteniendo unidos los homólogos compactados (**Figura 21–10**). En este momento, los homólogos están a punto para iniciar la segregación. La profase I acaba con la *diacinesis,* el estado de transición hacia la metafase I.

En algunas especies de levaduras, gusanos, moscas y mamíferos se han identificado las proteínas que forman los puentes de filamentos transversos entre los ejes internos de los homólogos. Se trata de homodímeros que interactúan entre sí a través de la hendidura de 100 nm que separa los homólogos, como se muestra en la **Figura 21–11**. En la mayoría de eucariotas, estas proteínas son muy importantes para que se produzcan los entrecruzamientos, de manera que no se producen entrecruzamientos en mutantes que no las tienen. Los principales componentes del eje interno de cada homólogo son los complejos de cohesinas que ensamblan el DNA durante la fase S y unen las cromátidas hermanas entre sí durante la meiosis (Figura 21–8). Algunas subunidades de las cohesinas que actúan en la meiosis son las mismas que actúan en la mitosis, mientras que otras son específicas de la meiosis. Ambos complejos, los entrecruzadores y las cohesinas, tienen un papel crucial en la segregación de los homólogos durante la primera división meiótica (meiosis I), como se explicará a continuación.

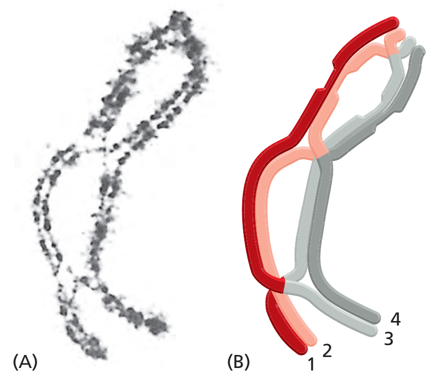


Figura 21–10 Bivalente con tres quiasmas resultado de tres entrecruzamientos. (A) Microfotografía de un bivalente de saltamontes. (B) Dibujo que muestra la disposición de los entrecruzamientos en (A). La cromátida 1 ha experimentado un intercambio con la cromátida 3, y la cromátida 2 con las cromátidas 3 y 4. Se observa cómo la combinación de los quiasmas y de las uniones estrechas de los brazos de las cromátidas hermanas de cada uno (mediadas por los complejos de cohesinas) mantienen los dos homólogos juntos después del desensamblaje de los complejos sinaptinémicos; si fallan los quiasmas o la adhesión de las cromátidas hermanas, los homólogos se separaran en este estadio y no se segregarán correctamente cuando la célula se divida al final de la meiosis I. (A, cortesía de Bernard John.)

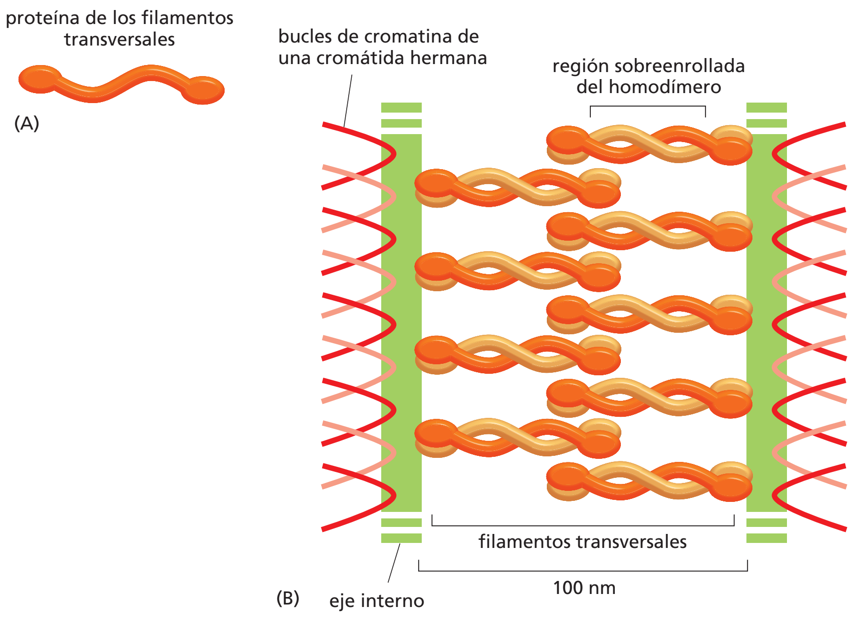


Figura 21–11 Modelo molecular que representa cómo los filamentos transversales pueden estar formados por un solo tipo de proteína. (A) Dibujo de una cadena de polipéptidos donde se muestran los dominios terminales globulares N y C, conectados por una región enrollada. (B) En este caso se propone que la proteína forma homodímeros que interactúan en una hendidura de 100 nm que separa los ejes internos de los dos homólogos. (Adaptado de S.L. Page y R.S. Hawley, *Science* 301: 785-789, 2003. Con la autorización de AAAS.)

La segregación de los cromosomas homólogos en la meiosis depende de proteínas asociadas al cinetocoro

Una de las diferencias fundamentales entre la meiosis I y la mitosis (y la meiosis II) es que en la meiosis I los homólogos se separan antes de que se produzca la segregación de las cromátidas hermanas en las dos células hijas (Figura 21–5). Esta diferencia depende de tres características de la meiosis I que la distinguen de la mitosis (**Figura 21–12**). En primer lugar, *los cinetocoros* (complejos proteicos asociados a los centrómeros; tratado en los Capítulos 4 y 17), de las dos cromátidas hermanas de un homólogo se unen a los microtúbulos que emergen del mismo polo del huso meiótico I y, en consecuencia, se segregan juntos a cada célula hija durante la anafase I; por el contrario, en la mitosis (y meiosis II), los cinetocoros de las dos cromátidas hermanas de un cromosoma se unen a los polos opuestos del huso y se segregan en dos células hijas distintas durante la anafase. En segundo lugar, se mantiene una unión física muy estrecha entre los homólogos que resiste las fuerzas de arrastre del huso meiótico I mientras que los bivalentes se alinean en el ecuador del huso y los homólogos se separan en la anafase I. Los quiasmas formados entre las cromátidas no hermanas y la cohesión entre los brazos de las cromátidas hermanas ayudan a mantener los homólogos unidos (Figura 21–10). En tercer lugar, los brazos de las cromátidas hermanas se separan en la anafase I, finalizando los quiasmas y permitiendo la separación de los homólogos en toda su longitud, pero las cromátidas hermanas se mantienen unidas en la región de los centrómeros hasta la anafase II y, por consiguiente, no se separan en la anafase I.

Los cromosomas de la meiosis I, transferidos a un huso meiótico II mediante experimentos de micromanipulación, funcionan como si estuvieran en meiosis I, lo cual indica que el comportamiento especial de los cromosomas de la meiosis I viene determinado por ellos mismos y no por el huso u otros factores citoplasmáticos. Varias proteínas meióticas específicas asociadas a los cromosomas de la meiosis I explican este comportamiento especial, aunque funcionan juntamente con proteínas no específicas de la meiosis que intervienen tanto en la mitosis como en la meiosis. Los complejos proteicos específicos de la meiosis se unen a los dos cinetocoros de cada homólogo replicado y aseguran que las dos cromátidas hermanas capturen los microtúbulos que emergen de un sólo polo del huso. Otras proteínas (denominadas *shugoshinas*) asociadas a los cinetocoros determinan que los cinetocoros hermanos no se separen en la anafase I, cuando la enzima proteolítica *separasa* (véase Capítulo 17) rompe los complejos de cohesinas que mantienen unidos los brazos de las cromátidas hermanas. Las shugoshinas protegen los complejos de cohesinas en los centrómeros mediante el reclutamiento de una proteína fosfatasa específica de éstos; la fosfatasa evita la fosforilación de los complejos de cohesinas lo cual es indispensable para que la separasa actúe fragmentándolos. De esta manera, en la anafase I los brazos de las cromátidas se separan pero los centrómeros no. Las cromátidas hermanas sólo se separan cuando la se-

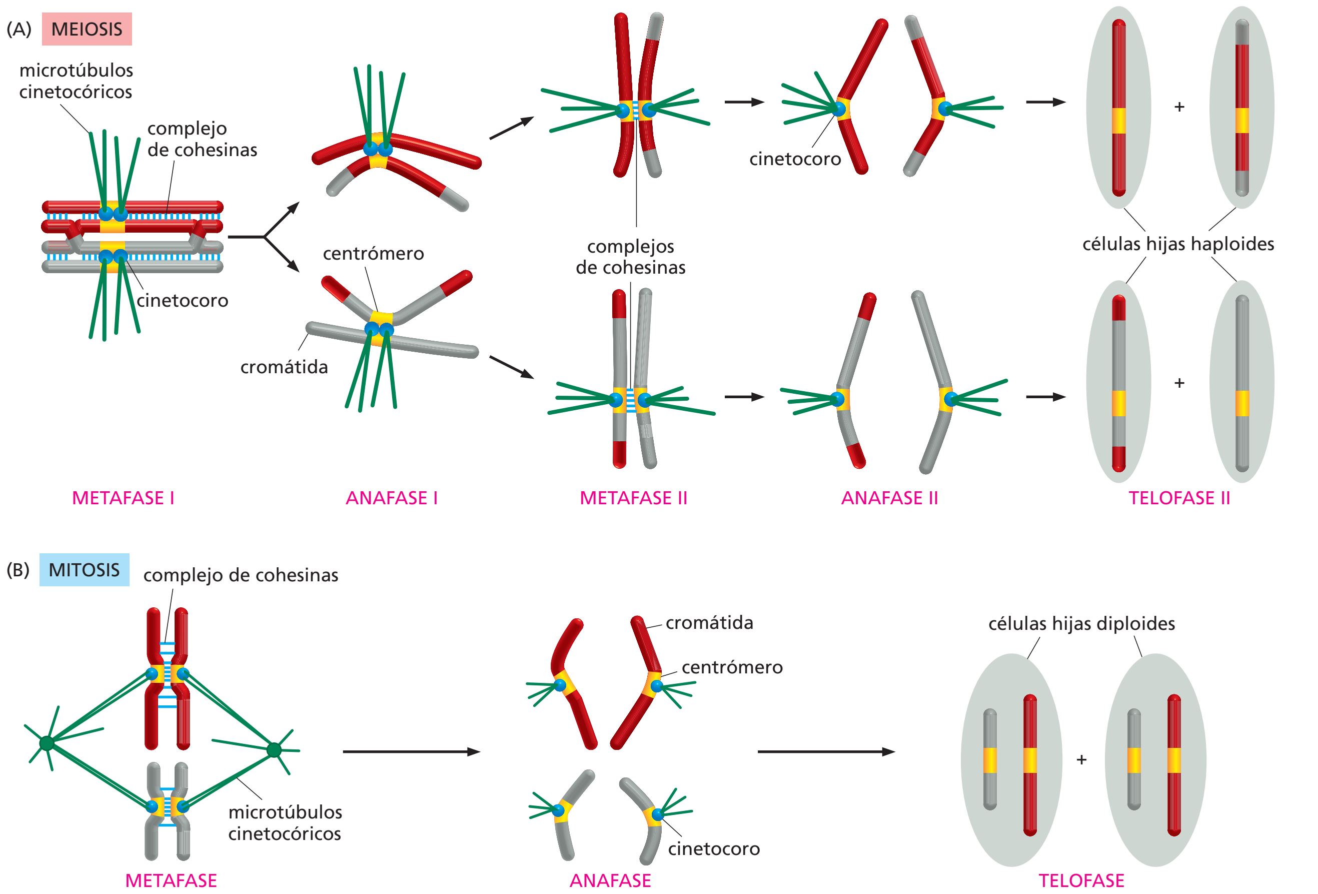


Figura 21–12 Comparación del comportamiento de los cromosomas en la meiosis I, la meiosis II y la mitosis. Los cromosomas se comportan de manera similar en la mitosis y en la meiosis II, pero de forma muy diferente en la meiosis I. (A) En la meiosis I, los dos cinetocoros hermanos se localizan uno al lado del otro en los centrómeros hermanos de cada homólogo y sujetan los microtúbulos que emergen del mismo polo del huso. La proteolisis de los complejos de cohesinas a lo largo de los brazos de las cromátidas hermanas despega los brazos y determina los entrecruzamientos, permitiendo que los homólogos duplicados se separen en la anafase I, mientras que los complejos residuales de cohesinas mantienen los centrómeros hermanos unidos. La destrucción proteolítica de los complejos residuales de cohesinas de los centrómeros permite la separación de las cromátidas hermanas en la anafase II. (B) Por el contrario, en la mitosis, los dos cinetocoros hermanos sujetan los microtúbulos que emergen de distintos polos del huso; las cromátidas hermanas se separan al comenzar la anafase y se segregan hacia las dos células hijas (tratado en el Capítulo 17).

parasa rompe los complejos de cohesinas remanentes en los centrómeros en la anafase II (Figura 21–12 A), y las shugoshinas han desaparecido.

A diferencia de la meiosis I, la meiosis II dura poco tiempo y se parece mucho a una división mitótica, aunque tiene lugar sin la replicación del DNA. La profase II es corta: se desorganiza la envoltura nuclear y se forma un huso nuevo, después de lo cual se suceden rápidamente, la metafase II, la anafase II y la telofase II. Una vez se ha formado la envoltura nuclear alrededor de los cuatro núcleos diploides producidos en la telofase II, tiene lugar la citocinesis y concluye la meiosis.

A menudo la meiosis no funciona correctamente

La clasificación de los cromosomas que tiene lugar durante la meiosis significa un gran esfuerzo de contabilidad intracelular. En cada meiosis humana se requiere que la célula controle 92 cromátidas (46 cromosomas duplicados), distribuyendo un juego completo de cada tipo de cromosomas a cada una de las cuatro células hijas resultantes. No sorprende que durante un proceso tan complejo puedan ocurrir errores en la distribución de los cromosomas. Los errores son frecuentes, en general, en la meiosis de los oocitos humanos que se detienen después del diploteno y permanecen así durante años; la meiosis I acaba con la *ovulación* y la meiosis II sólo se completa si el oocito es fecundado. En efecto los errores en la segregación de los cromosomas durante el desarrollo de los oocitos son las causas más comunes en humanos tanto de abortos espontáneos como problemas de discapacidades mentales.

Cuando los homólogos no se separan correctamente –un fenómeno denominado **no disyunción–**, el resultado es que alguno de los gametos haploides producido pierde un determinado cromosoma, mientras que otro tiene más de una copia de éste. (Las células con un número anormal de cromosomas se llaman *aneuploides*, mientras que las que tienen un número correcto son *euploides*.) Después de la fecundación, los gametos aneuploides forman embriones anormales, la mayoría de los cuales mueren. Sin embargo, algunos sobreviven: por ejemplo, el *síndrome de Down* humano, que es la primera causa de discapacidad mental, se debe a la presencia de una copia extra del cromosoma 21, consecuencia de la no disyunción durante la meiosis I en el ovario. Los errores en la segregación durante la meiosis I aumentan con la edad de la madre.

A pesar de los fallos, la mayoría de los eucariotas utiliza la meiosis, al menos de forma intermitente, para mezclar su información genética antes de transmitirla a la generación siguiente. Los entrecruzamientos contribuyen en gran manera a este proceso de mezcla genética, como vamos a ver a continuación.

Los entrecruzamientos aumentan la redistribución genética

A menos que se trate de mellizos idénticos, que se han desarrollado a partir de un único zigoto, los descendientes de unos mismos padres nunca son genéticamente iguales. Como hemos indicado, este fenómeno se debe a que mucho antes de la fusión de los dos gametos se han producido dos tipos de redistribuciones genéticas en la meiosis I, durante el proceso de la formación de los gametos: la distribución aleatoria de los homólogos maternos y paternos y los entrecruzamientos. La distribución al azar de los homólogos maternos y paternos (**Figura 21–13**A) podría, en principio, producir 2^n gametos genéticamente distintos, siendo n el número haploide de cromosomas. Por ejemplo, en la especie humana cada individuo puede producir por lo menos $2^{23} = 8{,}4 \times 10^6$ gametos genéticamente diferentes. Sin embargo el número real de variantes es mucho más elevado debido al **entrecruzamiento cromosómico** (o simplemente **entrecruzamiento**), que es el resultado de la recombinación (tratado en el Capítulo 5), durante la cual se producen intercambios de segmentos de DNA entre los homólogos. En la meiosis, cuando el intercambio ocurre entre cromátidas no hermanas, se mezclan componentes genéticos de cada uno de los cromosomas (Figura 21–13B).

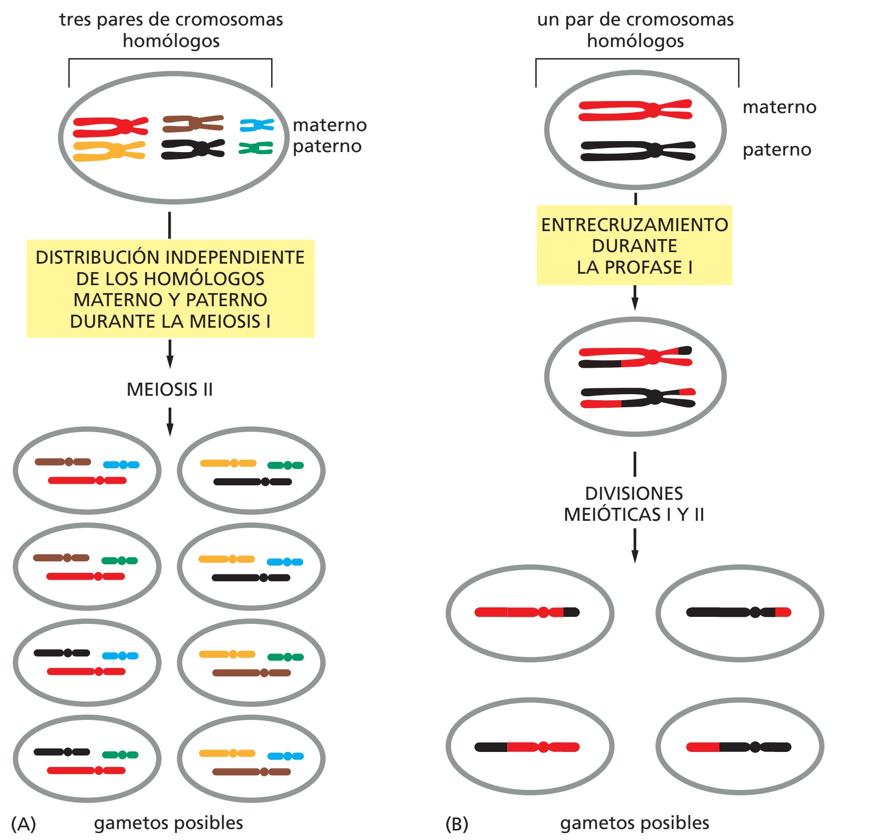


Figura 21–13 Los dos mecanismos principales de redistribución del material genético que intervienen en la producción de los gametos durante la meiosis. (A) La distribución independiente de los homólogos materno y paterno durante la meiosis produce 2^n gametos haploides diferentes para un organismo con n cromosomas. En este caso $n = 3$, por lo que existen 8 posibles gametos diferentes. (B) El entrecruzamiento durante la profase I permite el intercambio de segmentos de DNA entre cromosomas homólogos y de ese modo la redistribución de los genes en cada uno de ellos. Debido a la gran cantidad de pequeñas diferencias que presentan las secuencias de DNA de cualquier par de homólogos, ambos mecanismos aumentan la variabilidad genética de los organismos que se reproducen sexualmente.

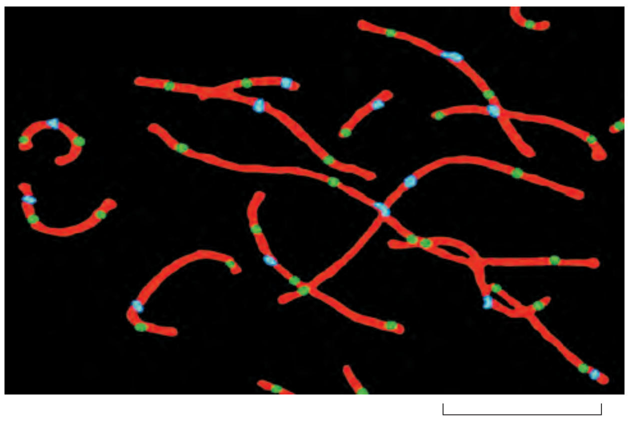


Figura 21–14 Entrecruzamientos entre homólogos en el testículo humano. En estas micrografías de inmunofluorescencia, se han utilizado anticuerpos para teñir los complejos sinaptinémicos (*rojo*), los centrómeros (*azul*) y los puntos de entrecruzamiento (*verde*). Obsérvese que todos los bivalentes tienen por lo menos un entrecruzamiento y ninguno de ellos tiene más de tres. (Modificado a partir de A. Lynn et al., *Science* 296: 2222-2225. Con la autorización de AAAS.)

En cada par de homólogos humanos se producen por término medio dos o tres entrecruzamientos (**Figura 21–14**).

Los detalles moleculares de los entrecruzamientos se estudian en el Capítulo 5 (véase Figura 5–64). Brevemente, el entrecruzamiento lo empieza una proteína muy conservada específica de la meiosis llamada *Spo11*, provocando una rotura de la doble hebra de DNA en la cromátida materna o en la paterna. Un gran complejo multienzimático, el *complejo recombinante*, que contiene enzimas reparadoras de la doble hebra de DNA, se ensambla sobre la rotura y cataliza la recombinación de los homólogos. En la mayoría de casos, el resultado de este proceso no es un entrecruzamiento. Sin embargo, en algunas ocasiones la recombinación conduce a un *entrecruzamiento* en el que los segmentos de DNA se intercambian recíprocamente entre dos cromátidas no hermanas. Como se ha descrito, después de la desinapsis se puede observar al microscopio cada entrecruzamiento como un quiasma (Figura 21–10A). La Figura 21–10B muestra cómo cada una de las dos cromátidas hermanas de un homólogo puede formar uno o más entrecruzamientos con una de las dos cromátidas de su homólogo correspondiente.

El entrecruzamiento está muy regulado

El entrecruzamiento tiene dos funciones distintas en la meiosis: ayuda a mantener los homólogos unidos, para que se segreguen correctamente en las dos células hijas resultantes de la meiosis I, y contribuye a la diversificación genética de los gametos que se producen. Como era de esperar, el entrecruzamiento está muy regulado: el número y localización de las roturas de las dobles hebras a lo largo de cada cromosoma están controlados. Las roturas de la doble hebra que tienen lugar en la meiosis I pueden localizarse en cualquier parte a lo largo del cromosoma (Figura 21–14), pero no presentan una distribución regular: están estrechamente unidas a los "puntos calientes" donde la cromatina es accesible y en pocas ocasiones se unen a los "puntos fríos", como las regiones de heterocromatina situadas alrededor de los centrómeros y de los telómeros.

Por lo menos dos tipos de regulación influyen en la localización y en el número de entrecruzamientos que se forman, aunque todavía no se comprende por completo ninguno de los dos. Ambos actúan antes de que se ensamble el complejo sinaptinémico. Uno de ellos asegura que como mínimo se forme un entrecruzamiento entre los dos miembros de cada par de homólogos, necesario para que se produzca la segregación correcta de los homólogos en la meiosis I. En el otro, llamado *interferencia del entrecruzamiento*, la presencia de un proceso de entrecruzamiento inhibe la formación de otro, quizás mediante la inhibición local de las proteínas necesarias para convertir una rotura de la doble hebra de DNA en un entrecruzamiento estable.

La regulación de la meiosis es distinta en los machos y en las hembras de los mamíferos

Los mecanismos básicos de la meiosis se han conservado a lo largo de la evolución en todos los eucariotas que se reproducen sexualmente. Por ejemplo, en todos ellos la mayor parte de la meiosis la ocupa la profase I, aunque los detalles de la duración de los diferentes estadios

varían entre las diferentes especies (**Figura 21–15**). Sin embargo, existen algunas diferencias destacables en la regulación de la meiosis tanto de especies distintas como de sexos diferentes en una misma especie. La diferencia entre los dos sexos es muy notable en los mamíferos.

En las hembras de los mamíferos, los *oocitos* empiezan la meiosis en el ovario fetal pero se paran después del diploteno, cuando se ha desensamblado el complejo sinaptinémico en la meiosis I. La meiosis I sólo se completa cuando la hembra alcanza la madurez sexual y el oocito sale del ovario durante la *ovulación*; sin embargo, el oocito liberado completa la meiosis II sólo en el caso de que sea fecundado. En las hembras de los mamíferos existen mecanismos especiales de parada y reactivación durante la meiosis. En las mujeres, algunos oocitos permanecen parados en meiosis I durante 40 años o más lo cual podría ser, en parte, una de las causas por la que aumentan significativamente las no disyunciones en las mujeres de más edad. Por el contrario, en los mamíferos macho la meiosis comienza en las células precursoras de los espermatozoides (*espermatocitos*) dentro de los testículos, al iniciarse la pubertad y se mantiene de forma continua, sin mecanismos de parada y reactivación como en la meiosis femenina. Son necesarios alrededor de 24 días para que un espermatocito humano complete la meiosis.

También existe una gran diferencia en la proporción de errores en la meiosis entre las hembras y los machos de los mamíferos; este hecho es especialmente notable en la especie humana. Alrededor del 20% de los oocitos humanos son aneuploides, comparados con el 3-4 % de los espermatozoides, y el resultado es que más de un 25% de todos los fetos humanos son aneuploides y la mayoría de ellos son el resultado de la no disyunción en los oocitos durante la meiosis I. La fecundación en los mamíferos comprende la ovulación de un número reducido de oocitos en un extremo del tracto reproductivo de la hembra y la entrada de millones de espermatozoides por el otro extremo. Dada la escasa cantidad de oocitos cabría esperar que su desarrollo estuviese sometido a un control de calidad más estricto que en el caso de los espermatozoides, pero ocurre justo lo contrario. Si la meiosis no se desarrolla correctamente en las células masculinas, se activa un mecanismo de control del ciclo celular (tratado en el Capítulo 17) que para el proceso y conduce a la muerte celular por apoptosis. Aparentemente, este mecanismo de control no actúa en la meiosis de las células femeninas: si no se produce la segregación de un homólogo, hecho que se da con frecuencia, las células continúan la meiosis y producen oocitos aneuploides. Por otro lado, parece que la línea germinal masculina puede ocasionar otro tipo de errores genéticos. Debido a que se producen muchas más mitosis en el proceso de la producción de un espermatozoide y a que en cada ronda de replicación del DNA hay posibilidades de error, los padres contribuyen en mayor proporción a la aparición de mutaciones nuevas que las madres.

La producción de los gametos no sólo comprende la meiosis y en otros procesos también existen diferencias entre oocitos y espermatozoides. Al final de la meiosis un oocito de mamífero es completamente maduro, mientras que un espermatozoide está iniciando su diferenciación. Antes de estudiar los gametos, vamos a considerar cómo algunas células del embrión de los mamíferos se diferencian inicialmente de manera específica desarrollándose como células germinales y cómo estas células quedan comprometidas, para transformarse en un espermatozoide o en un oocito, dependiendo del sexo del individuo.

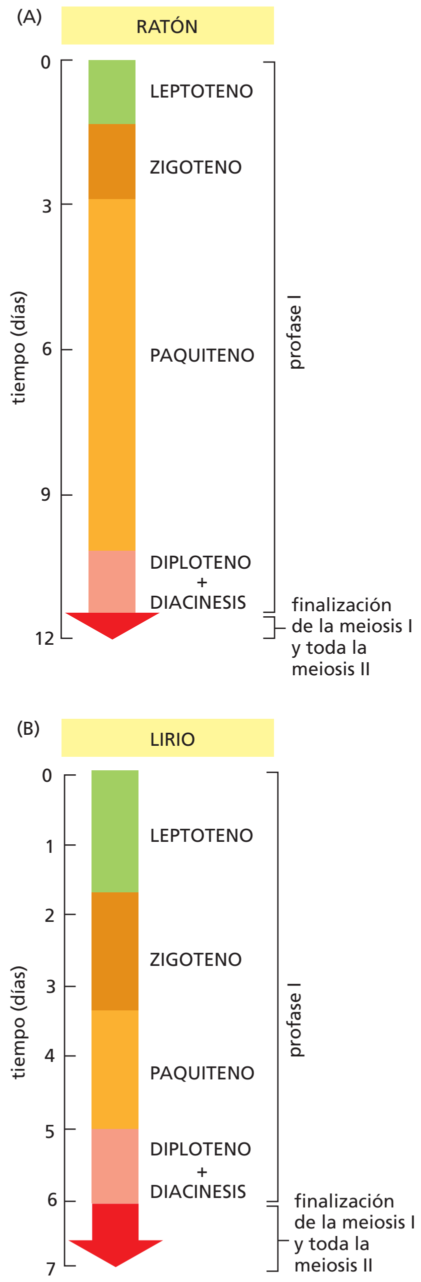


Figura 21–15 Comparación entre los tiempos necesarios para cada una de las etapas de la meiosis. (A) Tiempos aproximados para un mamífero macho (ratón). (B) Tiempos aproximados para el tejido masculino de una planta (lirio). Los tiempos difieren para los gametos masculino y femenino (espermatozoide y oocito, respectivamente) de una misma especie, así como para los mismos gametos de especies diferentes. Por ejemplo, en la especie humana la meiosis masculina dura 24 días en comparación con los 12 días de la del ratón. En las mujeres, pueden pasar más de 40 años, ya que la meiosis I se para después del diploteno. Sin embargo, en todas las especies la profase meiótica I es mucho más larga que el resto de las etapas meióticas juntas.

Resumen

Los gametos haploides (oocitos, espermatozoides, polen y esporas) se forman mediante la meiosis, proceso en el que dos divisiones celulares sucesivas después de una sola replicación del DNA dan lugar a cuatro células haploides a partir de una célula diploide. La meiosis está dominada por una prolongada profase I, que ocupa el 90% o más del periodo meiótico total. En cuanto empieza la profase I los cromosomas se han replicado y están constituidos por dos cromátidas hermanas estrechamente unidas entre sí. Los cromosomas homólogos se aparean uno al lado del otro y van estrechando progresivamente su yuxtaposición a medida que progresa la profase I. Los cromosomas homólogos estrechamente alineados (bivalentes) experimentan la recombinación genética y forman entrecruzamientos que más adelante pueden verse como quiasmas, que mantienen cada par de homólogos unidos durante la metafase I. El entrecruzamiento y la segregación independiente de las copias materna y paterna de cada cromosoma durante la meiosis I desempeñan un papel muy importante en la producción de gametos distintos uno de otro desde un punto de vista genético y distintos también de sus progenitores. Unas proteínas específicas de la meiosis y proteínas asociadas a los cinetocoros aseguran que ambas cromátidas hermanas estén unidas al mismo polo del huso; otras proteínas asociadas a los cinetocoros determinan que los homólogos permanezcan conectados a sus centró-

meros durante la anafase I, para que sean segregados en lugar de las cromátidas hermanas al acabar la meiosis I. Después de esta larga meiosis I, rápidamente sigue la meiosis II, sin que se produzca replicación de DNA, en un proceso parecido a la mitosis, en el que las cromátidas hermanas se separan en la anafase.

CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES Y DETERMINACIÓN DEL SEXO EN LOS MAMÍFEROS

Las estrategias de la reproducción sexual pueden variar muchísimo de unas especies a otras. Este apartado se centrará principalmente en las estrategias utilizadas por los mamíferos.

En todos los embriones de los vertebrados, durante el desarrollo tiene lugar una selección temprana de determinadas células como progenitoras de los gametos. Estas **células germinales primordiales** diploides (**PGC**: ***p****rimordial* ***g****erm* ***c****ells*) migran a las gónadas en desarrollo, que se convertirán en los *ovarios* en las hembras y los *testículos* en los machos. Después de un periodo de proliferación mitótica en las gónadas diferenciadas, las PGC experimentan la meiosis y se diferencian en gametos maduros haploides: oocitos o espermatozoides. Más adelante, la fusión del oocito y del espermatozoide tras el apareamiento conduce al inicio de la embriogénesis. Con la posterior producción de nuevas PGC en el embrión comienza otra vez el ciclo (Figura 21–3A).

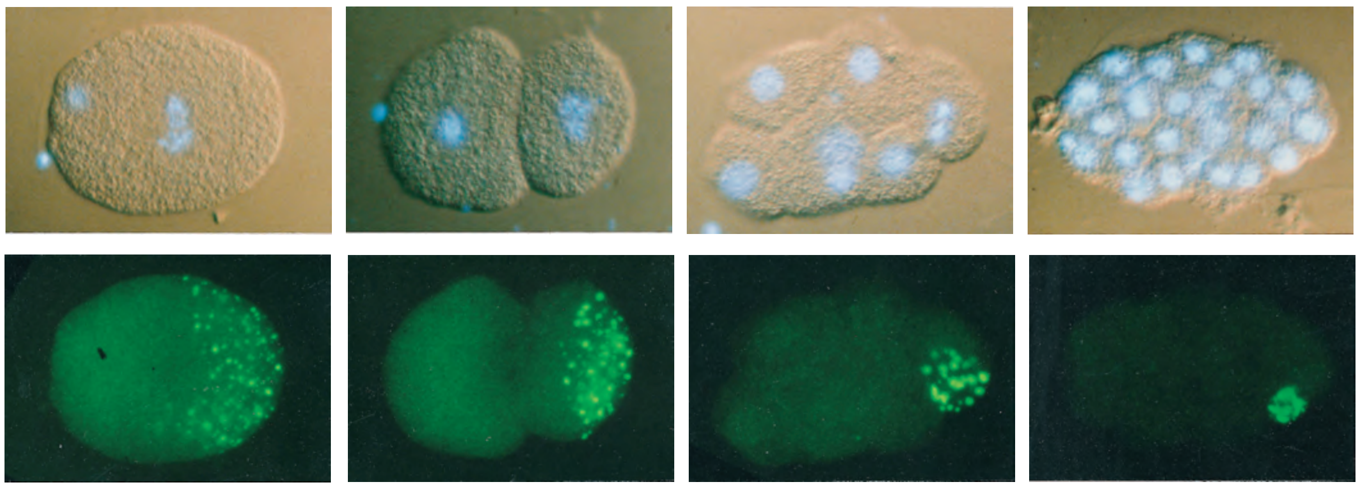
En este apartado se analizará cómo aparecen las PGC en los mamíferos, cómo se determina el sexo en ellos y de qué manera la determinación sexual establece que las PGC se diferencien en espermatozoides o en oocitos.

Señales específicas de las células vecinas a las PGC en los embriones de los mamíferos

En la mayoría de animales, incluidos muchos vertebrados, el oocito no fecundado contiene moléculas específicas localizadas en una región concreta del citoplasma que determinan qué células se convertirán en las células germinales. Cuando el oocito es fecundado y se divide de forma repetida produciendo las células del embrión temprano, las que finalmente heredan estos *determinantes de células germinales* se transforman en PGC (**Figura 21–16**). Aunque la naturaleza molecular y la función de los determinantes son desconocidas, unas proteínas de la familia *Vasa* son un componente presente en todos estos animales. Las proteínas Vasa tienen una estructura similar a la de las RNA helicasas dependientes de ATP, pero su función en la determinación de las células germinales constituye todavía un misterio por dilucidar.

Por el contrario, en otros animales y entre ellos los mamíferos, el citoplasma del oocito no contiene determinantes de células germinales localizados. En lugar de ello, unas señales procedentes de células vecinas determinan qué células se convertirán en PGC. En los mamíferos, todas las células resultantes de las primeras divisiones del oocito fecundado son *pluripotentes*, es decir, son capaces de producir cualquier tipo de células del organismo, in-

Figura 21–16 Determinantes de la segregación de las células germinales en el nematodo *C. elegans*. Las micrografías de la fila superior muestran el patrón de división de las células, en las que el núcleo está teñido de color *azul*; abajo las mismas células teñidas con un anticuerpo que marca (en *verde*) pequeños gránulos (llamados *gránulos P*) que actúan como determinantes de células germinales. Los gránulos P están constituidos por moléculas de RNA y moléculas de proteínas, y están distribuidos al azar, por todo el citoplasma del oocito no fecundado (no se muestra). Como se observa en las imágenes de la izquierda, después de la fecundación, los gránulos se acumulan en un polo del zigoto. En cada división, los gránulos se segregan a una de las dos células hijas. La única célula del embrión que contiene los gránulos P, visible en las imágenes de la derecha, es la precursora de la línea germinal. (Cortesía de Susan Strome.)



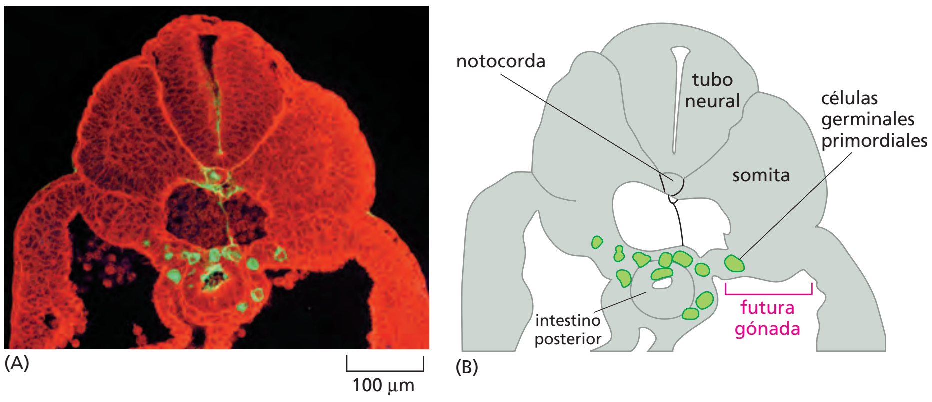


Figura 21–17 Migración de las PGC en los mamíferos. (A) Micrografía de fluorescencia en la que se observan las PGC que migran en una sección transversal de un embrión temprano de ratón. Las PGC están teñidas con un anticuerpo monoclonal (en *verde*) que las marca específicamente en este estado de la embriogénesis. Las otras células del embrión están teñidas con una lectina (en *rojo*) que se une al ácido siálico, localizado en la superficie de todas las células. (B) Esquema correspondiente a la micrografía que se muestra en (A). (A, cortesía de Robert Anderson y Chris Wylie.)

cluidas las germinales y células de los tejidos extraembrionarios así como las de la placenta. Únicamente más adelante, un pequeño grupo de células es inducido a convertirse en PGC a consecuencia de las señales que reciben de sus células vecinas. En el ratón, por ejemplo, 6 días después de la fecundación, determinadas señales (incluida la proteína morfogénica ósea 4; BMP4: ***b****one* ***m****orphogenic* ***p****rotein*) secretadas por las células del tejido extraembrionario situado junto al embrión, inducen a unas 10 células embrionarias adyacentes a transformarse en precursoras de las PGC. Estas células se dividen y maduran transformándose en PGC, inhibiendo la expresión de genes somáticos y activando la expresión de genes implicados en mantener las características especiales de las células germinales.

Aunque los diferentes mecanismos de las PGC son específicos de los distintos grupos de animales, algunos de los mecanismos que controlan la proliferación y el desarrollo se han conservado a lo largo de la evolución, desde los gusanos hasta el hombre. Por ejemplo, el desarrollo de PGC en todos los animales estudiados depende tanto de la supresión del destino de las células somáticas por represión génica, como de la inhibición de la traducción de determinados mRNA por proteínas de unión a *Nano* RNA.

Las PGC migran a las gónadas en desarrollo

En los mamíferos, después de su desarrollo, las PGC proliferan y migran hacia su destino final que son las gónadas en desarrollo (**Figura 21–17**). Mientras las células germinales primordiales migran a través del embrión, varias proteínas extracelulares producidas por las células somáticas adyacentes las señalan para sobrevivir, proliferar y migrar. Entre las proteínas señal secretadas que colaboran atrayendo a las PGC hacia las gónadas en desarrollo están las *quimioquinas*, que se unen a receptores acoplados a proteínas G (GPCR: ***G****-****p****rotein* ***c****oupled* ***r****eceptors*) y conducen la migración de varios tipos celulares, como las PGC y los glóbulos blancos sanguíneos (tratado en el Capítulo 23).

Después de que las PGC hayan entrado en la gónada en desarrollo, que en este estadio se denomina *cresta genital*, experimentan unas cuantas mitosis más en el curso de las cuales se especializan para seguir una vía de desarrollo que les llevará a diferenciarse en oocitos o en espermatozoides.

Sin embargo, cuando las PGC inician la migración hacia las gónadas embrionarias, no están comprometidas de manera irreversible a transformase en gametos. Extraídas del embrión y cultivadas en presencia de proteínas señal extracelulares adecuadas, se transforman en células que se pueden mantener en cultivo indefinidamente como una línea celular capaz de producir cualquier tipo celular del organismo, excepto las células extraembrionarias que formarán estructuras como la placenta; por esta razón, a estas células se les denomina *pluripotentes*, y no totipotentes. A este respecto, estas células llamadas *células germinales embrionarias* (*EG*: ***e****mbryonic* ***g****erm cells*) se parecen a las *células madre embrionarias* (*ES:* ***e****mbryonic* ***s****tem cells*) (tratado en el Capítulo 23). Tanto las células EG como las células ES son fuentes prometedoras de varios tipos celulares humanos –tanto para probar fármacos como para el tratamiento de enfermedades como ataques cardíacos, apoplejías y varias enfermedades neurodegenerativas en las se produce la muerte de determinadas células.

¿Qué determina que las PGC que migran a las gónadas en desarrollo se diferencien en oocitos o en espermatozoides? Sorprendentemente no es su propia constitución cromosómica sexual sino que depende de si la cresta genital se ha empezado a desarrollar en un ovario o en un testículo, respectivamente. Los cromosomas sexuales de las células somáticas

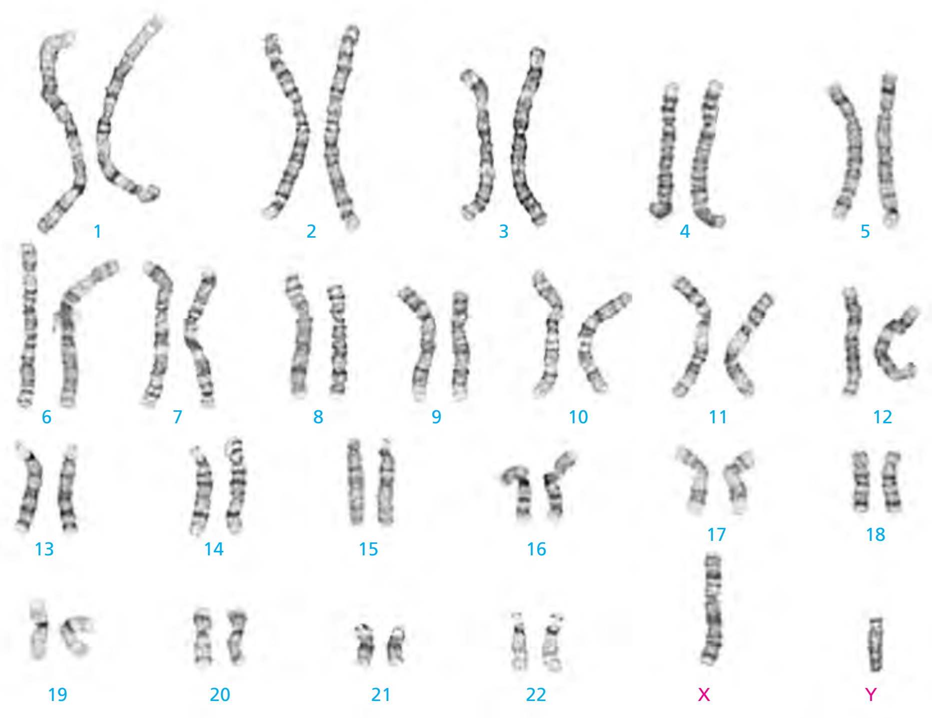


Figura 21–18 Cromosomas de un hombre normal. Los cromosomas se han teñido con la técnica de Giemsa. Véanse también las Figuras 4–10 y 4–11. Obsérvese la diferencia en el tamaño de los dos cromosomas sexuales. El cromosoma X contiene más de 1000 genes, mientras que el cromosoma Y sólo unos 80. (Cortesía de Julie Robertson del Wisconsin State Laboratory of Hygiene.)

de la cresta genital determinan el tipo de gónada que se va a formar a partir de ella. Aunque hay muchos genes que influyen en el resultado del proceso, un solo gen del cromosoma Y desempeña un papel especialmente importante en esta decisión.

En los mamíferos, el gen *Sry* conduce el desarrollo de la gónada hacia la formación de un testículo

Aristóteles creía que la temperatura del macho durante el contacto sexual determinaba el sexo de la descendencia: a temperatura más alta, mayor era la probabilidad de producir machos. Si en lugar de referirse a humanos se hubiese referido a los lagartos y a los caimanes, casi hubiese acertado ya que en muchos reptiles la temperatura de incubación de los huevos determina el sexo de la descendencia; en lagartos y caimanes los machos se desarrollan a altas temperaturas y las hembras a bajas temperaturas. En la actualidad sabemos que el sexo de un mamífero lo determinan sus cromosomas sexuales más que la temperatura de los progenitores o del embrión.

Las hembras de los mamíferos tienen dos cromosomas X en todas sus células somáticas, mientras que los machos tienen un cromosoma X y un cromosoma Y. La presencia o ausencia del cromosoma Y, que es el más pequeño de todos los cromosomas humanos (**Figura 21–18**) determina el sexo del individuo. Los individuos que tienen un cromosoma Y se desarrollan como machos siendo indiferente el número de cromosomas X que presenten, mientras que los individuos que no tienen ningún cromosoma Y se desarrollan como hembras, incluso aunque sólo tengan un cromosoma X. El espermatozoide que fecunda el oocito determina el sexo del zigoto resultante: el oocito maduro tiene un solo cromosoma X mientras que el espermatozoide puede tener un cromosoma X o un cromosoma Y.

El cromosoma Y determina el sexo del individuo induciendo a las células somáticas de la cresta genital a desarrollar un testículo en lugar de un ovario. Los embriones de los mamíferos están programados para desarrollarse como hembras a menos que lo impida la presencia de los testículos, que dirigen al embrión a que se desarrolle como macho. Si se extrae la cresta genital antes de que se haya empezado a desarrollarse como testículo o como ovario, un mamífero se desarrolla como una hembra independientemente de los cromosomas sexuales que tenga. Este hecho no significa que en los mamíferos no sean necesarias señales para el desarrollo de los órganos específicos de las hembras: por ejemplo, para el desarrollo normal del ovario se requiere la secreción de la proteína señal Wnt4.

El gen crucial del cromosoma Y que dirige la cresta genital a que se diferencie en testículo en lugar de en ovario se llama ***Sry*** (***sex-determining region of Y***). Cuando este gen se introduce en el genoma de un zigoto XX de ratón, el embrión transgénico resultante se

desarrolla como un macho, aunque falten todos los demás genes del cromosoma Y. Sin embargo, este ratón *sexualmente invertido* no puede producir espermatozoides porque le faltan los otros genes del cromosoma Y que son necesarios para la diferenciación de los espermatozoides. De forma similar, los humanos XY que tienen una mutación en Sry que lo inactiva se desarrollan como hembras aunque genéticamente son machos.

El gen *Sry* sólo se expresa en una subpoblación de las células somáticas de la gónada en desarrollo y determina la diferenciación de estas células en **células de Sertoli** que constituyen el principal tipo de células de soporte en el testículo (véase la Figura 21–29). Las células de Sertoli dirigen el desarrollo sexual de una línea masculina influyendo sobre otras células de la cresta genital y de otras partes del embrión, por lo menos de cuatro maneras:

1. Estimulan a las PGC recién llegadas a que se transformen en espermatozoides. Este fenómeno se consigue inhibiendo la entrada de las células en la meiosis y su posterior desarrollo como oocitos, como se describirá más adelante.
2. Segregan la *hormona antimülleriana*, que circula por la sangre y bloquea el desarrollo del tracto genital femenino, produciéndose la regresión del conducto de Müller (en caso contrario este conducto daría lugar al oviducto, al útero y a la parte superior de la vagina).
3. Estimulan la migración de células endoteliales y musculares lisas del tejido mesenquimático adyacente hacia el interior de la gónada. Estas células constituyen elementos imprescindibles del testículo para la producción normal de espermatozoides, que empieza cuando el organismo alcanza la madurez sexual.
4. Colaboran en la inducción de otras células somáticas de la gónada en desarrollo para que se transformen en *células de Leydig*, que secretan a la sangre la hormona sexual masculina *testosterona*. Esta hormona es la responsable de la aparición de todos los caracteres sexuales secundarios de los machos, incluyendo las estructuras anexas del tracto reproductor masculino, como la próstata y las vesículas seminales que se forman a partir de otro conducto, denominado sistema conductor de Wolffian. Este sistema degenera durante el desarrollo del sistema reproductor femenino porque para sobrevivir y desarrollarse requiere testosterona. La testosterona también masculiniza el desarrollo temprano del cerebro, influyendo en la identidad y orientación sexual y, por consiguiente, en el comportamiento sexual: por ejemplo, ratas hembra que han sido tratadas con testosterona durante el periodo perinatal, muestran más tarde un comportamiento sexual masculino.

El gen *Sry* codifica una proteína reguladora de genes (Sry) que se une al DNA e interviene en la transcripción de otros genes involucrados en el desarrollo de las células de Sertoli. Un importante gen corriente abajo que codifica otra proteína reguladora relacionada con Sry es el llamado Sox9. El gen *Sox9* no está en el cromosoma Y, pero se expresa en los machos de todos los vertebrados, a diferencia de *Sry*, que sólo se encuentra en los mamíferos. Si *Sox9* se expresa de manera ectópica en las gónadas en desarrollo de un embrión XX de ratón, el embrión se desarrolla como un macho, aunque carezca del gen *Sry*, lo cual sugiere que *Sry* normalmente actúa induciendo la expresión de *Sox9*. La proteína Sox9 activa de forma directa la transcripción de algunos genes específicos de la células de Sertoli, incluido el gen que codifica la hormona antimülleriana.

En ausencia de *Sry* o de *Sox9*, la cresta genital de un embrión XY se desarrolla en ovarios en lugar de hacerlo en testículos. Las células de soporte se transforman en *células foliculares* en lugar de hacerlo en células de Sertoli. Otras células somáticas se transforman en las *células de la teca* (en lugar de hacerlo en las células de Leydig) y, al llegar a la pubertad, segregan *estrógeno*, que es la hormona sexual femenina. Las PGC se diferencian en oocitos, en vez de hacerlo en espermatozoides (**Figura 21–19**), y el animal de desarrolla como una hembra.

¿De qué forma las células de Sertoli inducen a las PGC a migrar a las gónadas en desarrollo en los machos para seguir el proceso que conduce a la formación de espermatozoides en lugar de a la producción de oocitos? El mecanismo depende de una pequeña molécula señal, el *ácido retinoico* (véase la Figura 15–13), que, en ambos sexos está producida por una estructura tubular transitoria llamada el mesonefros localizada junto a las gónadas en desarrollo. En el ovario embrionario, el ácido retinoico induce la proliferación de las células de la línea germinal para entrar en la meiosis y comenzar el proceso que conduce a la producción de oocitos; las células quedan paradas después del diploteno de la profase I, en la que permanecen hasta la ovulación, que comienza cuando la hembra alcanza la madurez sexual. Por el contrario, en los testículos embrionarios las células de Sertoli producen una enzima que degrada el ácido retinoico y evita que el ácido retinoico procedente del mesonefros in-

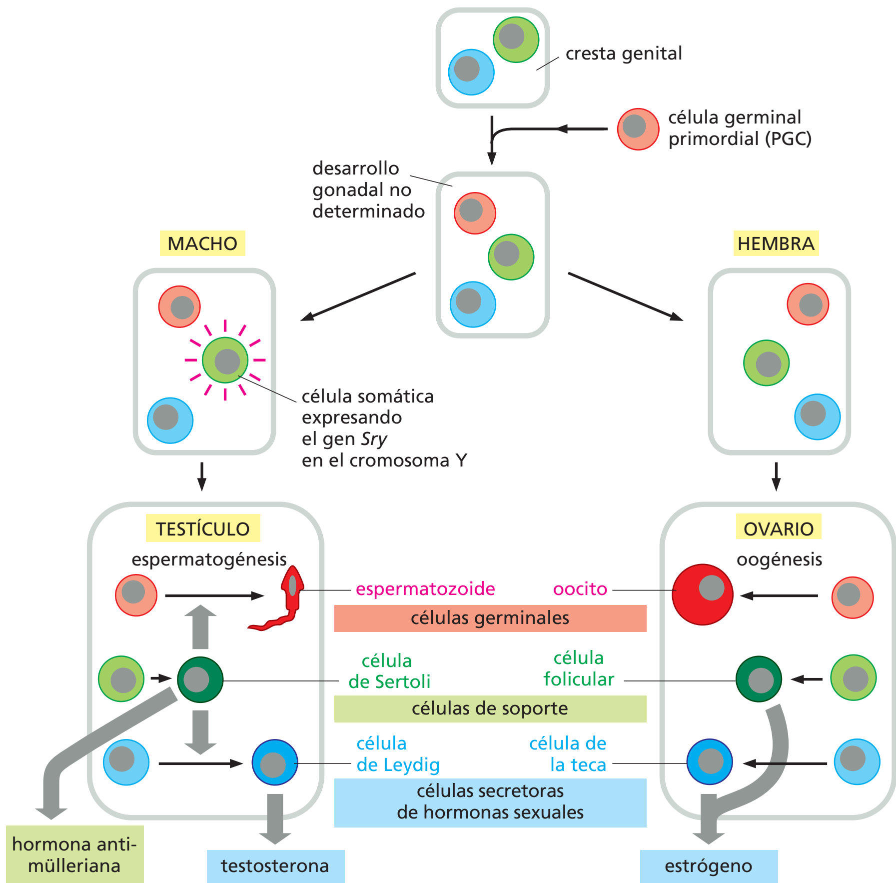


Figura 21–19 Influencia de *Sry* en el desarrollo gonadal. Las células de la línea germinal están coloreadas en *rojo* y las células somáticas en *verde* y *azul*. El cambio de color claro a oscuro indica que las células se han diferenciado. El gen *Sry* actúa en una subpoblación de células somáticas durante el desarrollo gonadal induciendo su diferenciación en células de Sertoli o células foliculares. Las células de Sertoli impiden que las células de la línea germinal se desarrollen como oocitos y, al llegar a la pubertad, las dirige a la espermatogénesis. Estas células también segregan la hormona antimülleriana, que determina la regresión del conducto de Müller e induce a otras células somáticas a diferenciarse en células de Leydig, que son las células secretoras de testosterona (véase Figura 21–29). En ausencia de *Sry*, las células germinales primordiales se involucran en el desarrollo de los oocitos y las células somáticas se transforman en células foliculares, que actúan de soporte al oocito durante su desarrollo o en células de la teca secretoras de progesterona; la progesterona se transforma en estrógeno mediante las células foliculares. Mientras que en el testículo empieza la secreción de testosterona en el feto, en el ovario no comienza la secreción de estrógenos hasta la pubertad.

duzca a las células de la línea germinal a entrar en meiosis y comenzar el desarrollo de los oocitos. Sólo mucho más tarde, cuando el macho alcanza la madurez sexual, las células de la línea germinal de los testículos empiezan a producir espermatozoides.

Muchos aspectos de la reproducción sexual varían en gran medida entre las especies animales

Aunque la meiosis está muy conservada en todos los organismos eucariotas que se reproducen sexualmente, otros aspectos de la reproducción sexual son muy variables. El sexo de un animal depende o de sus cromosomas o del entorno en el cual se desarrolla. Pero incluso los mecanismos genéticos determinantes del sexo varían muchísimo. En *C. elegans* y en *Drosophila*, por ejemplo, el sexo viene determinado por la proporción entre los cromosomas X respecto a los autosomas y no por la presencia o ausencia de un cromosoma Y, como ocurre en los mamíferos. En *C. elegans*, la determinación del sexo depende principalmente de los controles de transcripción y de traducción en la expresión de los genes, mientras que en *Drosophila*, depende de una cascada de procesos regulados maduración del RNA, como se describe en el Capítulo 7. Además, en *Drosophila* el carácter sexual específico de cada célula del organismo está programado de forma individual por los propios cromosomas en lugar de estar controlado principalmente por hormonas. No sabemos por qué algunos aspectos de la reproducción sexual se han conservado durante la evolución mientras que otros son tan distintos.

Resumen

En los embriones tempranos de los mamíferos, un pequeño número de células son señaladas por sus células vecinas para que se transformen en células de la línea germinal. Las células germinales primordiales resultantes (PGC) proliferan y migran hacia las gónadas en desarrollo. En esta zona, las células germinales primordiales están destinadas a desarrollarse como oocitos si la gónada se transforma en un ovario, o como espermatozoides si la gónada se transforma en un testículo. La gónada

se desarrollará en un ovario a menos que sus células somáticas contengan un cromosoma Y, en cuyo caso se desarrollará como un testículo. El gen Sry del cromosoma Y de los mamíferos es crucial para el desarrollo de los testículos; se expresa en una subpoblación de células somáticas de las gónadas en desarrollo y dirige su diferenciación en células de Sertoli, las cuales producen moléculas señal que promueven el desarrollo de las características masculinas e inhiben el desarrollo de las características femeninas. Los embriones de los mamíferos están programados para seguir una vía femenina de desarrollo a menos que sean desviados por las células de Sertoli a seguir la vía masculina.

OOCITOS

Los oocitos son las células animales más extraordinarias que existen, al menos en un aspecto: una vez activados pueden dar lugar a un nuevo individuo completo tan sólo en cuestión de días o semanas. Ninguna otra célula de un animal superior tiene esta capacidad. Normalmente, la activación es la consecuencia de la *fecundación* –la fusión de un espermatozoide con un oocito– pero los oocitos pueden ser activados de forma artificial mediante diferentes tratamientos químicos o físicos no específicos. En efecto, algunos organismos, incluidos algunos vertebrados como por ejemplo determinadas especies de lagartija, normalmente se reproducen a partir de oocitos que se han activado en ausencia de espermatozoides o sea de forma **partenogénica**. Los mamíferos son los únicos animales que no se pueden reproducir de forma partenogénica; debido a la *huella genética* (se describe en el Capítulo 7), requieren las dos contribuciones genéticas, la materna y la paterna.

A pesar de que el oocito maduro da lugar a todos los tipos celulares de un organismo, no es más que una célula altamente especializada, destinada en exclusiva a generar un nuevo individuo. El citoplasma de un oocito puede llegar a reprogramar el núcleo de una célula somática, haciéndolo capaz de dirigir el desarrollo de un nuevo individuo, aunque todavía desconocemos la mayoría de los componentes del oocito responsables de este proceso. De este modo se produjo la famosa oveja Dolly. Con una micropipeta de vidrio se extrajo el núcleo de un oocito no fecundado de una oveja y se reemplazó por el núcleo de una célula somática adulta. Se activó el oocito mediante un pulso eléctrico y el embrión resultante se implantó en el útero de una madre "adoptiva". La oveja resultante tenía el genoma del donante de la célula somática. Por lo tanto era un *clon* de esta oveja dadora.

Con una aproximación parecida, denominada *reproducción por clonación*, se han obtenido clones de diferentes mamíferos, como ratones, ratas, gatos, perros, cabras, cerdos, vacas y caballos (véase la Figura 21–38). En todos los casos, la eficiencia es baja: la mayoría de clones mueren antes de nacer y menos del 5% de ellos llega a adulto, probablemente debido a que el núcleo somático trasplantado no se reprograma totalmente y expresa muchos genes de forma incorrecta.

En esta apartado vamos a considerar brevemente algunas de las características especiales de un oocito y después se estudiará cómo se prepara para la fecundación.

Un oocito es una célula altamente especializada para seguir un desarrollo independiente

Los oocitos de la mayoría de animales son células gigantes. Contienen una gran cantidad de reservas de todos los nutrientes necesarios para el desarrollo inicial del embrión hasta que alcanza el estadio en el que el nuevo individuo sea capaz de alimentarse por sí mismo. Antes de alcanzar este punto, la célula gigante se divide en muchas células más pequeñas, sin que se produzca crecimiento. El embrión de los mamíferos es una excepción. En este caso, el crecimiento del embrión se puede iniciar antes, ya que toma los nutrientes de la madre a través de la placenta. Por esto los oocitos de mamífero, a pesar de ser células voluminosas, no necesitan serlo tanto como, por ejemplo, los de una rana o los de un ave. En general, los oocitos son esféricos u ovoides, con un diámetro de 0,1 mm en los humanos y en los erizos de mar (que son comestibles), de 1 mm a 2 mm en anfibios y peces, y de varios centímetros en aves y reptiles (**Figura 21–20**). Por el contrario, normalmente las células somáticas tienen un diámetro de tan sólo entre 10 y 30 μm (**Figura 21–21**).

El citoplasma de los oocitos maduros contiene reservas de nutrientes en forma de **vitelo**, el cual es rico en lípidos, proteínas y polisacáridos y por lo general se encuentra formando unas estructuras específicas que se denominan *plaquetas vitelinas*. En algunas especies las plaquetas vitelinas presentan una membrana a su alrededor. En los oocitos que se desarro-



Figura 21–20 Tamaño real de tres óvulos diferentes. El diámetro de un óvulo humano es de 0,1 mm.

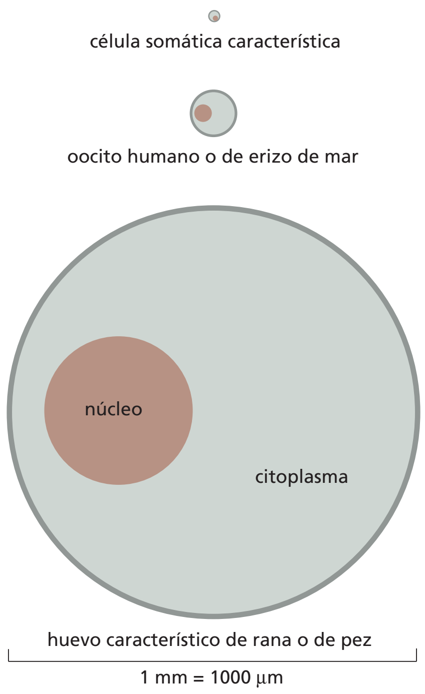


Figura 21–21 Tamaños relativos de varios oocitos comparados con el tamaño de una célula somática típica.

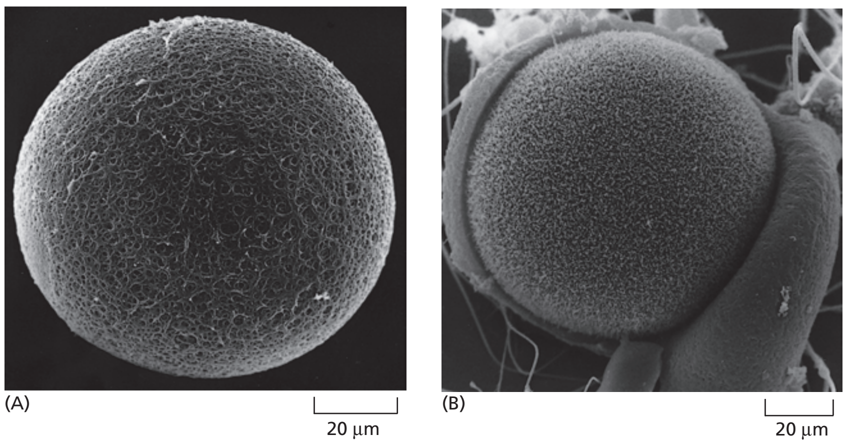


Figura 21–22 La zona pelúcida. (A) Electromicrografía de barrido de un oocito de hámster, mostrando la zona pelúcida. (B) Electromicrografía de barrido de un oocito similar en el que la zona pelúcida (a la que están adheridos muchos espermatozoides) se ha separado para poner de manifiesto la membrana plasmática subyacente que presenta numerosos microvillis. La zona ha sido sintetizada exclusivamente por el oocito en desarrollo. (De D.M. Phillips, *J. Ultrastruct. Res.*72:1-12, 1980. Con autorización de Elsevier.)

llan fuera del cuerpo de la madre y dan lugar a organismos más o menos grandes, el vitelo puede constituir hasta el 95% del volumen de la célula. En los mamíferos, cuyos embriones son alimentados durante bastante tiempo por sus madres a través de la placenta, hay muy poco vitelo si es que lo hay.

La **cubierta del oocito** es otra de las características de los oocitos. Se trata de una especialización de la matriz extracelular que está formada, en gran parte, por glucoproteínas, unas secretadas por el propio oocito y otras por las células acompañantes. En muchas especies, la cubierta principal es una capa adyacente a la membrana plasmática del oocito; en animales no mamíferos, tales como los erizos de mar o las gallinas, se llama *cubierta vitelina*, mientras que en los oocitos de los mamíferos se denomina *zona pelúcida* (**Figura 21–22**). Esta capa protege al oocito de agresiones mecánicas y, en muchos casos, también actúa como una barrera específica de cada especie para los espermatozoides, de forma que solamente admite los espermatozoides de la misma especie del oocito o de especies muy próximas.

Muchos oocitos (incluidos los de los mamíferos) contienen vesículas secretoras especializadas situadas inmediatamente por debajo de la membrana plasmática en la región más periférica o *córtex* del citoplasma. Cuando un espermatozoide activa un oocito, se produce la exocitosis de dichos **gránulos corticales**; el contenido liberado de los gránulos modifica la cubierta del oocito, de tal manera que impide que se fusione con más de un espermatozoide, evitando la polispermia.

Los gránulos corticales están distribuidos de forma regular por todo el córtex del oocito. En muchos organismos, sin embargo, otros componentes citoplasmáticos del oocito presentan una sorprendente distribución asimétrica. Algunos de estos componentes localizados actuarán como determinantes de las células germinales (véase la Figura 21–16) o ayudarán a establecer la polaridad del embrión, como se describirá en el Capítulo 22.

Los oocitos se desarrollan por etapas

Un **oocito** es un óvulo en desarrollo que se diferencia formando un óvulo maduro a través de una serie de cambios progresivos. La duración de estos cambios está coordinada con las etapas de la meiosis, mediante la cual las células germinales experimentan dos divisiones extraordinariamente especializadas. Como se ha explicado los oocitos se mantienen en la profase I durante un periodo largo de tiempo mientras crecen en tamaño y progresa su diferenciación; en muchos casos, después de completar la meiosis I se paran de nuevo en metafase II esperando la fecundación (aunque también pueden detenerse en otros momentos distintos, dependiendo de la especie de que se trate).

Los detalles del desarrollo del oocito (**oogénesis**) varían según la especie. Sin embargo, las etapas principales son muy parecidas entre sí, como se muestra en la **Figura 21–23**. Las células germinales primordiales migran hacia la gónada en formación convirtiéndose en *oogonias*, que proliferan mediante sucesivas mitosis antes de que comience la meiosis I, momento en el que se denominan *oocitos primarios*; en los mamíferos este fenómeno se produce por lo general antes del nacimiento. Como hemos indicado, antes de iniciarse la meiosis I, se produce la replicación del DNA, de manera que cada cromosoma está formado por dos cromátidas hermanas; al inicio de la profase I, los cromosomas homólogos duplicados se emparejan a lo largo de su eje longitudinal y se producen los entrecruzamientos entre cromátidas no hermanas de cada par de cromosomas (véase la Figura 21–10). A continua-

ción, la célula se mantiene parada después del diploteno de la profase I durante un periodo de tiempo que varía desde algunos días hasta varios años, según la especie. Durante este largo periodo (o en algunos casos, al llegar a la madurez sexual), los oocitos primarios sintetizan una cubierta y los gránulos corticales. En el caso de los grandes oocitos de los animales no mamíferos, también se acumulan ribosomas, vitelo, glucógeno, lípidos y el mRNA que posteriormente dirigirá la síntesis de las proteínas necesarias para el crecimiento embrionario temprano y el desarrollo. En muchos de estos oocitos, la gran actividad biosintética se refleja en la estructura de los cromosomas, que se descondensan y forman bucles laterales, adquiriendo un aspecto "plumulado" característico, lo que indica que los genes de los bucles están transcribiendo de forma activa (véase Figuras 4–54 y 4–55).

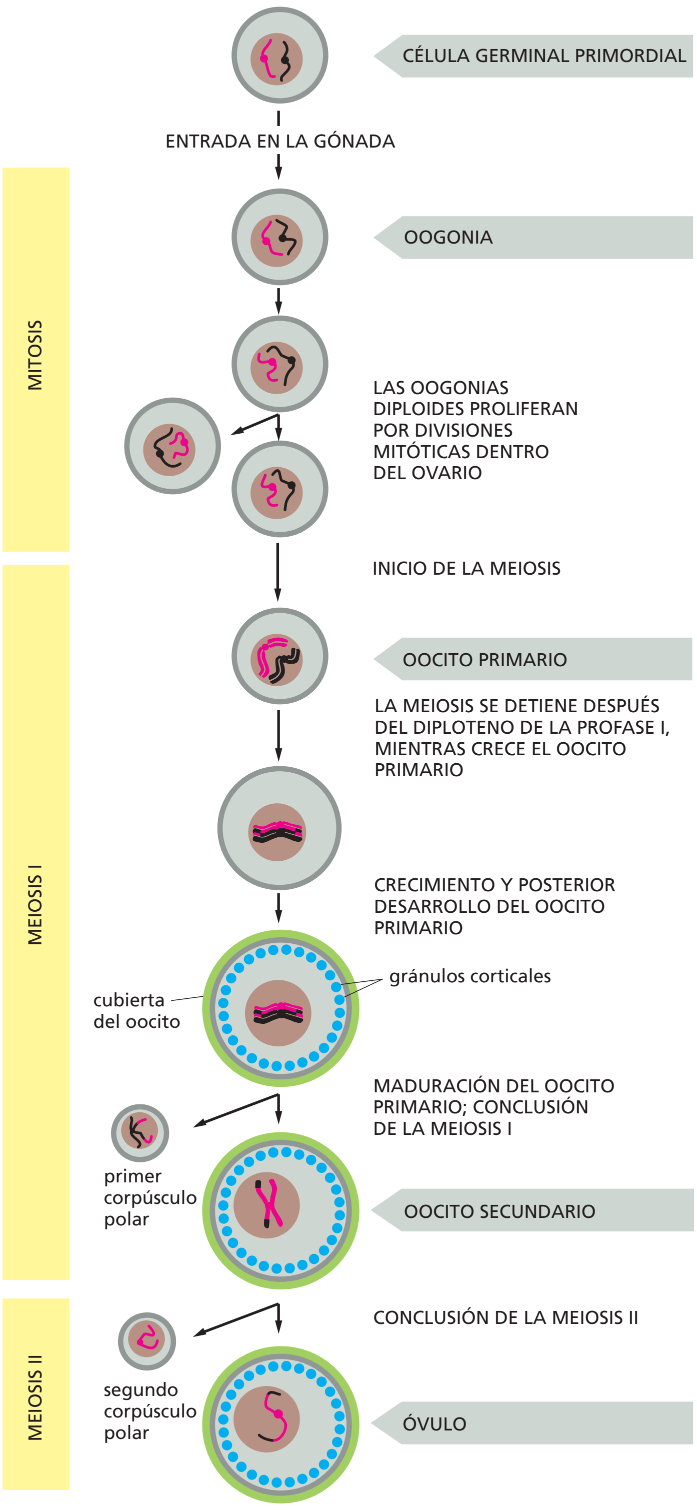


Figura 21–23 Etapas de la oogénesis. Las oogonias se forman a partir de las células germinales primordiales (PGC), que al principio de la embriogénesis migran hacía la gónada en desarrollo. Para una mejor comprensión sólo se representan un par de cromosomas homólogos. Tras un cierto número de divisiones mitóticas, las oogonias empiezan la división meiótica I, recibiendo entonces el nombre de oocitos primarios. En los mamíferos, los oocitos primarios se forman muy temprano (entre los 3 y los 8 meses de gestación en el embrión humano) y permanecen detenidos después del diploteno de la profase I hasta que la hembra es sexualmente madura. En este momento, periódicamente un pequeño número de oocitos madura bajo influencia hormonal y completa la meiosis I convirtiéndose en oocitos secundarios, los cuales por último experimentan la división meiótica II y se transforman en óvulos maduros. El momento en que el oocito es liberado del ovario y es fecundado varía de una especie a otra. En la mayoría de los vertebrados, la maduración de los oocitos está detenida en la metafase de la meiosis II; el oocito secundario sólo completa la meiosis II si es fecundado. Finalmente, los corpúsculos polares degeneran. En la mayoría de animales, el oocito en desarrollo está rodeado por células accesorias especializadas que ayudan a aislarlo y a nutrirlo (no se muestran).

La fase siguiente de la oogénesis, la *maduración de los oocitos*, por lo general no se produce hasta la madurez sexual, cuando las hormonas estimulan al oocito. Bajo la influencia hormonal, la célula reanuda la meiosis I. Los cromosomas vuelven a condensarse, se rompe la envoltura nuclear, se ensambla el huso meiótico y los cromosomas homólogos replicados se segregan en la anafase I en dos juegos cada uno de los cuales contiene la mitad del número inicial de cromosomas. Al finalizar la meiosis I, el citoplasma se divide, asimétricamente en dos, dando lugar a dos células de tamaño muy diferente: una es un pequeño *corpúsculo polar* y la otra es un gran **oocito secundario**, el precursor del óvulo. En esta etapa, cada cromosoma está formado por dos cromátidas hermanas unidas entre sí por sus centrómeros. Las cromátidas hermanas no se separan hasta la anafase II, después de lo cual el citoplasma del gran oocito secundario se vuelve a dividir de forma asimétrica produciendo el **óvulo** (u **oocito maduro**) y un segundo corpúsculo polar, cada uno con una dotación haploide de cromosomas (véase Figura 21–23). A causa de estas divisiones asimétricas de su citoplasma, los óvulos mantienen su gran tamaño a pesar de experimentar dos divisiones meióticas. Los dos corpúsculos polares son pequeños y, finalmente, degeneran.

En la mayoría de los vertebrados, la oogénesis se desarrolla hasta la metafase de la meiosis II, momento en el que se detiene. En la **ovulación**, el oocito secundario se desprende del ovario apto para ser fecundado. Si se produce la fecundación, el oocito se desbloquea y se completa la meiosis transformándose en un óvulo. Cuando es fecundado se llama zigoto.

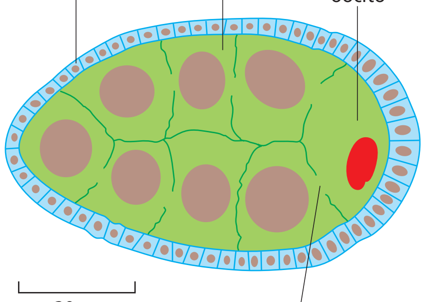


Figura 21–24 Células nodriza y células foliculares asociadas a un oocito de *Drosophila*. Las células nodriza y el oocito proceden de una misma oogonia, que da lugar a un oocito y a 15 células nodriza (de las cuales en esta figura se observan solamente 7). Estas células permanecen unidas por puentes citoplasmáticos, que son el resultado de una división celular incompleta. Finalmente, las células nodriza descargan el contenido de su citoplasma en el oocito y se autodestruyen. Las células foliculares se desarrollan de forma independiente a partir de las células del mesodermo.

Los oocitos alcanzan su gran tamaño mediante mecanismos especiales de crecimiento

Normalmente, una célula somática de un diámetro de entre 10 y 20 μm necesita unas 24 horas para duplicar su masa como preparación para la división. A esta velocidad de biosíntesis, esta misma célula necesitaría mucho más tiempo para alcanzar la masa miles de veces mayor de un oocito de mamífero de 100 μm de diámetro. Tardaría mucho más aún para tener la masa un millón de veces superior de un oocito de insecto de 1000 μm de diámetro. Sin embargo algunos insectos viven sólo unos cuantos días y consiguen producir oocitos de un diámetro incluso más grande. Los oocitos necesitan mecanismos especiales para alcanzar su gran tamaño.

Una estrategia sencilla para crecer con rapidez consiste en disponer de copias extra de genes. La mayor parte del crecimiento de un oocito tiene lugar después de la replicación del DNA, durante la prolongada parada después del diploteno en la profase I, cuando el juego de cromosomas diploides se ha duplicado (véase Figura 21–23). De esta forma dispone de doble cantidad de DNA para la síntesis de RNA en comparación con una célula somática en fase G_1 del ciclo celular. Los oocitos de algunas especies van más allá, acumulando DNA extra: producen muchas copias extras de determinados genes. En el Capítulo 6 hemos visto que las células somáticas de la mayoría de organismos contienen de 100 a 500 copias de los genes que codifican el RNA ribosómico para producir suficiente cantidad de ribosomas para la síntesis proteica. Los oocitos necesitan más ribosomas para atender el incremento de la síntesis proteica durante la embriogénesis temprana, por lo que en los oocitos de muchos animales los genes del RNA ribosómico están especialmente amplificados; por ejemplo, los oocitos de algunos anfibios contienen entre 1 y 2 millones de copias de estos genes.

Los oocitos, para su crecimiento, también dependen de la actividad sintetizadora de otras células. El vitelo, por ejemplo, se sintetiza por lo general fuera del ovario y luego el oocito lo incorpora. En aves, anfibios e insectos, las proteínas del vitelo se sintetizan en el hígado (o en un órgano equivalente) y son vertidas a la sangre. En los ovarios, los oocitos importan las proteínas vitelínicas de la matriz extracelular a través de un mecanismo de endocitosis mediada por receptor (véase Figura 13–46*)*. Los nutrientes también pueden proceder de las células accesorias del ovario. Existen dos tipos de estas células. En algunos invertebrados, determinadas células de la progenie de las oogonias se transforman en **células nodriza** en lugar de convertirse en oocitos. Estas células están conectadas al oocito mediante puentes citoplasmáticos permitiendo que las macromoléculas pasen de forma directa desde las células nodriza al oocito (**Figura 21–24**). Las células nodriza de los oocitos de los insectos sintetizan muchos de los productos –ribosomas, mRNA, proteínas y otras moléculas– que los oocitos de los vertebrados tienen que sintetizar por sí mismos.

Tanto en invertebrados como en vertebrados, otras células accesorias del ovario que colaboran en la nutrición de los oocitos en desarrollo son células somáticas denominadas **células foliculares**, que rodean cada uno de los oocitos,. Se disponen como una capa de células epiteliales alrededor del oocito (**Figura 21–25** y véase la Figura 21–24) y están conecta-

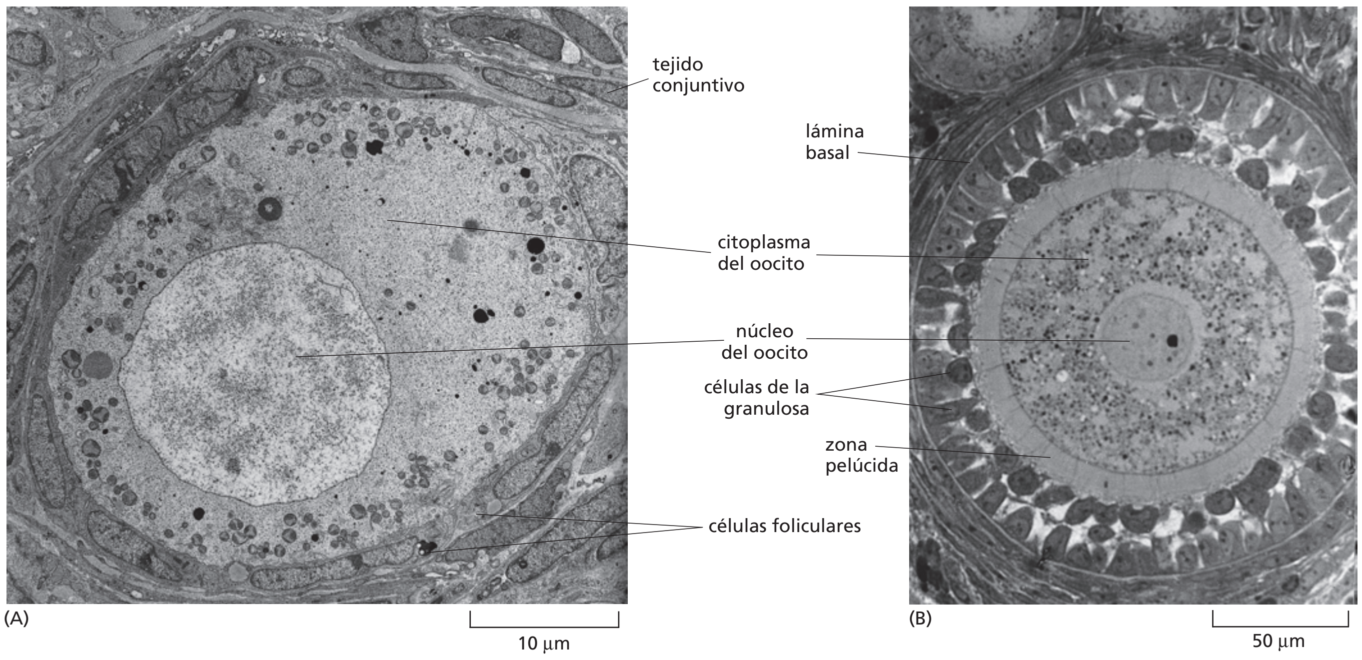


Figura 21–25 Electromicrografía de oocitos primarios en desarrollo en el ovario de una hembra de conejo. (A) Estadio inicial de un oocito primario en desarrollo. Todavía no se han formado ni la zona pelúcida ni los gránulos corticales y el oocito está rodeado por una monocapa de células foliculares planas. (B) Oocito primario más maduro, observado a un aumento seis veces menor, debido a que es mucho más grande que el oocito de (A). Este oocito presenta una delgada zona pelúcida y está rodeado por varias capas de células foliculares (denominadas células de la granulosa) y una lámina basal que lo aíslan de las otras células del ovario. Las células de la granulosa están conectadas entre sí y con el oocito mediante uniones de tipo gap. (De The Cellular Basis of Mammalian Reproduction [J. Van Blerkom y P. Motta eds.]. Baltimore-Munich: Urban & Schwarzenberg, 1979.)

das entre sí y con el oocito mediante *uniones de tipo gap* que permiten el intercambio de moléculas pequeñas pero no de macromoléculas (tratado en el Capítulo 19). Estas células no pueden proporcionar macromoléculas al oocito a través de estas uniones de comunicación, pero pueden colaborar suministrando los precursores, de menor tamaño, a partir de los cuales se sintetizan las macromoléculas. La importancia crítica de las uniones en hendidura se ha demostrado en el ovario de ratón, donde las proteínas de estas uniones (*conexinas*) implicadas en la conexión de las células foliculares entre sí son distintas de las que conectan a las células foliculares con los oocitos. Si, en el ratón se bloquean los genes que codifican alguna de estas proteínas, ni las células foliculares ni los oocitos se desarrollan con normalidad y la hembra resulta estéril. En muchas especies, las células foliculares secretan macromoléculas que contribuyen a la formación de la cubierta del oocito, o son incorporadas por el oocito en crecimiento por endocitosis mediada por receptor o actúan como receptores de la superficie celular del oocito controlando el patrón espacial y las asimetrías axiales de los oocitos (se trata en el Capítulo 22).

La comunicación entre los oocitos y sus células foliculares se produce en ambos sentidos. El patrón temporal del proceso de desarrollo en los dos grupos de células está coordinado y parece que depende de las señales emitidas por el oocito hacia las células foliculares. En experimentos en los que se han combinado oocitos jóvenes con células foliculares más maduras, o viceversa, se observa que un programa intrínseco de desarrollo del oocito controla la velocidad del desarrollo de las células foliculares.

La mayor parte de los oocitos humanos mueren sin llegar a madurar

La **Figura 21–26** resume los estadios del desarrollo de los oocitos humanos en el ovario. En las niñas recién nacidas la mayoría de los oocitos están rodeados por una capa de una sola fila de células foliculares. Uno de estos oocitos junto con sus células foliculares se denomina *folículo primordial* (véase la Figura 21–25A). De forma periódica, empezando algunas veces antes del nacimiento, una pequeña proporción de los folículos primordiales comienzan a crecer convirtiéndose en *folículos en desarrollo*, en los que hay muchas capas de células foliculares (ahora reciben el nombre de *células de la granulosa*) rodeando al oocito en crecimiento (véase la Figura 21– 25B). Se desconocen las causas por las cuales algunos folículos primordiales empiezan a crecer. Algunos de estos folículos en desarrollo llegan a formar una cavidad llena con un líquido folicular, el *antro*, y se convierten en *folículos antrales*.

Después de la pubertad, aproximadamente una vez cada mes, la pituitaria secreta una ola de la *hormona folículo estimulante* (*FSH*: ***f**ollicle **s**timulating **h**ormone*), que acelera el crecimiento de unos 10 o 12 folículos antrales. Uno de ellos domina sobre los demás y, hacia la mitad del ciclo menstrual, la secreción de FSH y de la *hormona luteinizante* (*LH: **l**uteini-*

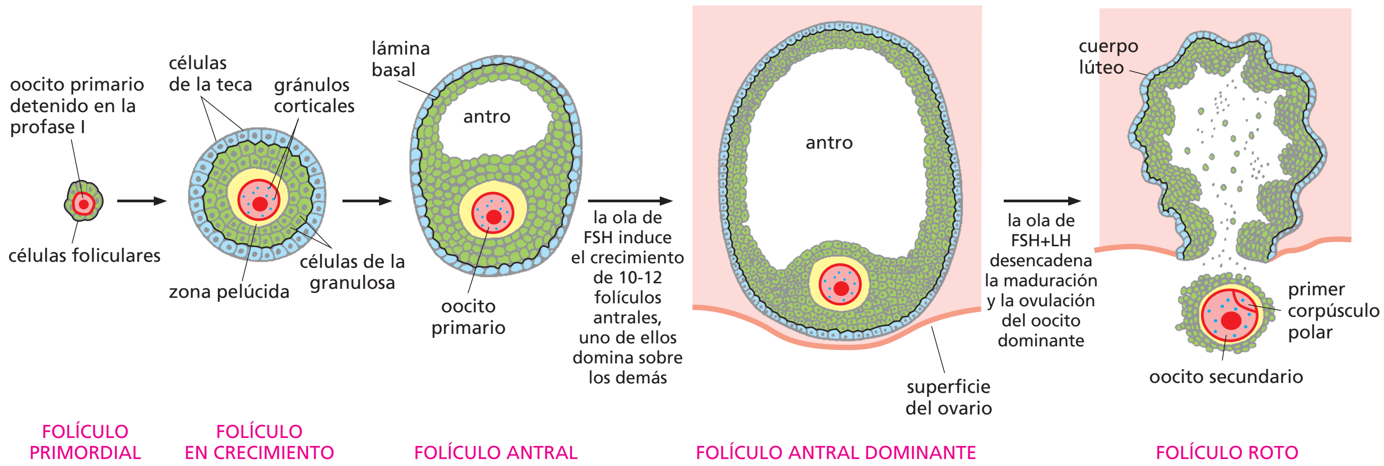


Figura 21–26 Las fases del desarrollo de un oocito humano. Obsérvese que durante la mayor parte de su desarrollo el oocito está rodeado por las células de la granulosa (en *verde*), separadas de la capa interna de *células de la teca* (en *azul*) por una lámina basal intermedia (en *negro*). Después de la ovulación, el folículo vacío se transforma en una estructura endocrina, el *cuerpo lúteo*, que secreta progesterona preparando el útero para el embarazo. Si no se produce la fecundación, el *cuerpo lúteo* degenera y la mucosa del útero se desprende en el transcurso de la menstruación.

*zing **h**ormone*) desencadena la *ovulación*: el oocito primario dominante concluye la meiosis I, y el oocito secundario resultante se detiene en la metafase II; rápidamente el folículo aumenta de volumen y se rompe en la superficie del ovario, liberando el oocito secundario, rodeado por una cubierta de células de la granulosa envueltas por una matriz gelatinosa rica en ácido hialurónico. El oocito desprendido sólo completa la meiosis II, en un día o poco más, si es fecundado por un espermatozoide.

Hasta ahora se ignora por qué en el momento de la ola mensual de FSH sólo son estimulados a acelerar su crecimiento una pequeña proporción de los numerosos folículos antrales presentes en los ovarios, y por qué solamente uno de ellos madura liberando su oocito, mientras que el resto degeneran. Cuando el folículo ha alcanzado un determinado grado de maduración, actúan algunos mecanismos de retroalimentación asegurando que ninguno de los demás folículos complete la maduración y sea ovulado durante este ciclo. Sea cual sea el mecanismo, el resultado es que durante los 40 años o más que dura el periodo fértil de la vida de una mujer sólo serán ovulados de 400 a 500 oocitos. Los otros millones de oocitos primarios restantes presentes en el momento del nacimiento mueren sin madurar. Todavía no comprendemos por qué se han formado tantos oocitos sólo para morir en los ovarios.

Resumen

Los oocitos se desarrollan por etapas a partir de las células germinales primordiales (PGC) que migran a la gónada en formación, donde se transforman en oogonias. Después de la proliferación mitótica, las oogonias inician la división meiótica I, momento en el que se denominan oocitos primarios. Después del diploteno de la profase I se mantienen paradas durante días o años, según las especies. Durante este periodo de paro, los oocitos primarios crecen, sintetizan una cubierta, y acumulan ribosomas, mRNA y proteínas, a menudo con la colaboración de otras células, como las células foliculares que los rodean. Para que se produzca un crecimiento y un desarrollo correctos es necesario que se establezca una señalización en ambos sentidos entre los oocitos y sus células foliculares. El proceso de maduración de los oocitos es inducido por hormonas. Los oocitos primarios completan la meiosis I formando un pequeño corpúsculo polar y un gran oocito secundario, que prosigue hasta la metafase de la meiosis II. En la mayoría de los vertebrados, el oocito secundario se mantiene en esta fase hasta que, estimulado por la fecundación, completa la meiosis e inicia el desarrollo embrionario.

ESPERMATOZOIDES

En la mayoría de especies existen dos tipos de gametos que son radicalmente distintos. El oocito es una de las células más voluminosas del organismo, mientras que el **espermatozoide** es probablemente una de las células más pequeñas. El oocito y el espermatozoide están optimizados en sentidos diferentes para la transmisión de los genes que transportan. El oocito es una célula inmóvil que asegura la supervivencia de los genes maternos mediante una gran cantidad de materia prima para el crecimiento y el desarrollo del embrión, junto con una eficaz cubierta protectora. El espermatozoide, por el contrario, está preparado pa-

ra la propagación de los genes paternos utilizando las reservas maternas: es una célula extraordinariamente móvil e hidrodinámica lo que le proporciona velocidad y eficacia para la fecundación. La competencia entre los espermatozoides es intensa y la mayoría de ellos fracasan en su misión: de los miles de millones de espermatozoides que son liberados durante el periodo fértil de la vida de un hombre, sólo unos cuantos llegarán a fecundar un oocito.

Los espermatozoides están extraordinariamente especializados para transmitir su DNA a un oocito

En general, los espermatozoides son células "despojadas" de estructuras celulares. Presentan un potente flagelo que les impulsa para desplazarse en un medio acuoso, pero carecen de orgánulos citoplasmáticos como ribosomas, retículo endoplasmático o complejo de Golgi, ya que no los necesitan para transmitir el DNA al oocito. Sin embargo, contienen muchas mitocondrias colocadas de forma estratégica donde pueden proporcionar, con una gran eficiencia, la energía que necesita el flagelo para su movimiento. Un espermatozoide está formado normalmente por dos regiones distintas en términos morfológicos y funcional, limitadas por una membrana plasmática única. Estas regiones son la *cola,* que impulsa el espermatozoide hacia el oocito y le ayuda a atravesar la cubierta oocitaria, y la *cabeza*, donde se encuentra el núcleo haploide (**Figura 21–27**). El DNA del núcleo está fuertemente empaquetado, de modo que su volumen queda reducido al mínimo facilitando su transporte y no permitiendo la transcripción. En muchas especies, los cromosomas de los espermatozoides carecen de las histonas que presentan las células somáticas y en su lugar están empaquetados por unas proteínas de elevada carga positiva llamadas *protaminas,* así como por histonas espermáticas específicas.

En la cabeza de los espermatozoides de muchos animales existe una vesícula secretora muy especializada, en estrecha aposición con la parte anterior de la envoltura nuclear, es la **vesícula acrosómica**. Esta vesícula contiene enzimas hidrolíticas que facilitan el paso del espermatozoide a través de la envoltura externa del oocito. Cuando un espermatozoide entra en contacto con la cubierta del oocito, el contenido de la vesícula se libera por exocitosis, es la denominada *reacción acrosómica.* Esta reacción es necesaria para que el espermatozoide se una a la cubierta, pase a su través y se fusione con el oocito.

La cola móvil de un espermatozoide es un largo flagelo, cuyo *axonema* emerge de un corpúsculo basal situado justo detrás del núcleo. Como se describe en el Capítulo 16, el axonema está formado por dos microtúbulos centrales rodeados por nueve dobletes de microtúbulos dispuestos en orden. El flagelo de algunos espermatozoides (incluido el de los mamíferos) se diferencia de los otros flagelos en que el habitual patrón 9+2 microtúbulos está rodeado además por nueve *fibras densas* externas (**Figura 21–28**). Las fibras densas son rígidas, no se contraen y parece que reducen la flexibilidad del flagelo y lo protegen de posibles roturas: defectos en estas fibras determinan espermatozoides de morfología anormal y conducen a la infertilidad. El movimiento flagelar se produce por el deslizamiento entre los dobletes adyacentes de microtúbulos y está impulsado por la dineína, proteína motora que utiliza la energía de la hidrólisis del ATP para el deslizamiento de los microtúbulos. El ATP lo generan las mitocondrias especializadas de la parte anterior de la cola del espermatozoide (denominada la *pieza intermedia*), que es donde se necesita.

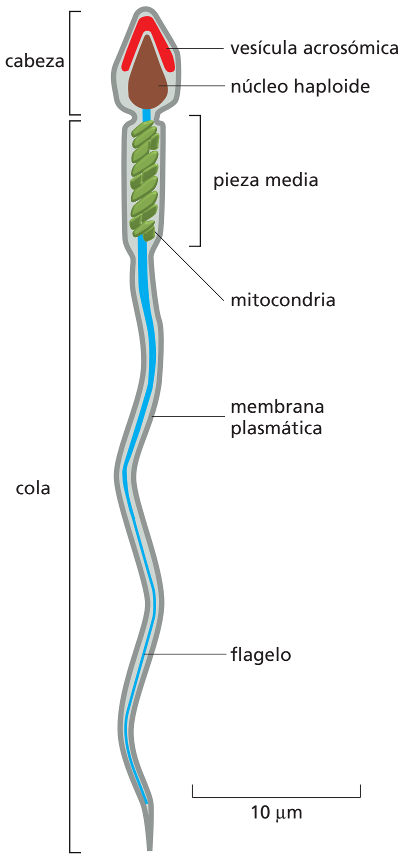


Figura 21–27 Espermatozoide humano. Esquema de la sección longitudinal.

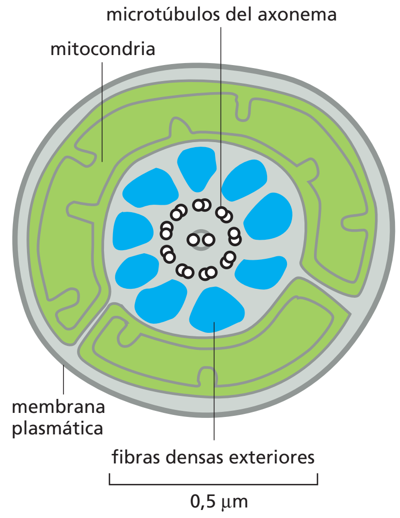


Figura 21–28 Dibujo de la sección transversal de la pieza media de un espermatozoide de mamífero. El centro del flagelo está formado por un axonema rodeado por nueve fibras densas. El axonema comprende dos microtúbulos sencillos rodeados por nueve dobletes de microtúbulos. Las mitocondrias (en *verde*) están bien situadas para proporcionar el ATP necesario para el movimiento flagelar; se distribuyen en una disposición espiral poco habitual, alrededor del axonema (véase Figura 21–27).

Los espermatozoides se producen en los testículos de los mamíferos de manera continuada

A diferencia de los oocitos, que comienzan la meiosis antes del nacimiento y se paran después del diploteno de la profase I hasta que la mujer llega a la pubertad, en el hombre la meiosis y la producción de espermatozoides (**espermatogénesis**) no se inicia hasta la pubertad. A partir de este momento se producen de manera continua en el epitelio que forma la pared de unos largos y enrollados tubos del testículo, llamados *tubos seminíferos*. Las células germinales inmaduras, las *espermatogonias,* se localizan alrededor del límite externo de estos tubos junto a la lámina basal (**Figura 21–29**A). La mayoría de estas células se dividen un número limitado de veces por mitosis, antes de dejar de proliferar e inician la meiosis I, momento en el que se denominan *espermatocitos primarios.* Los espermatocitos primarios dan lugar a los *espermatocitos secundarios* que se diferencian en *espermátidas* y finalmente en espermatozoides

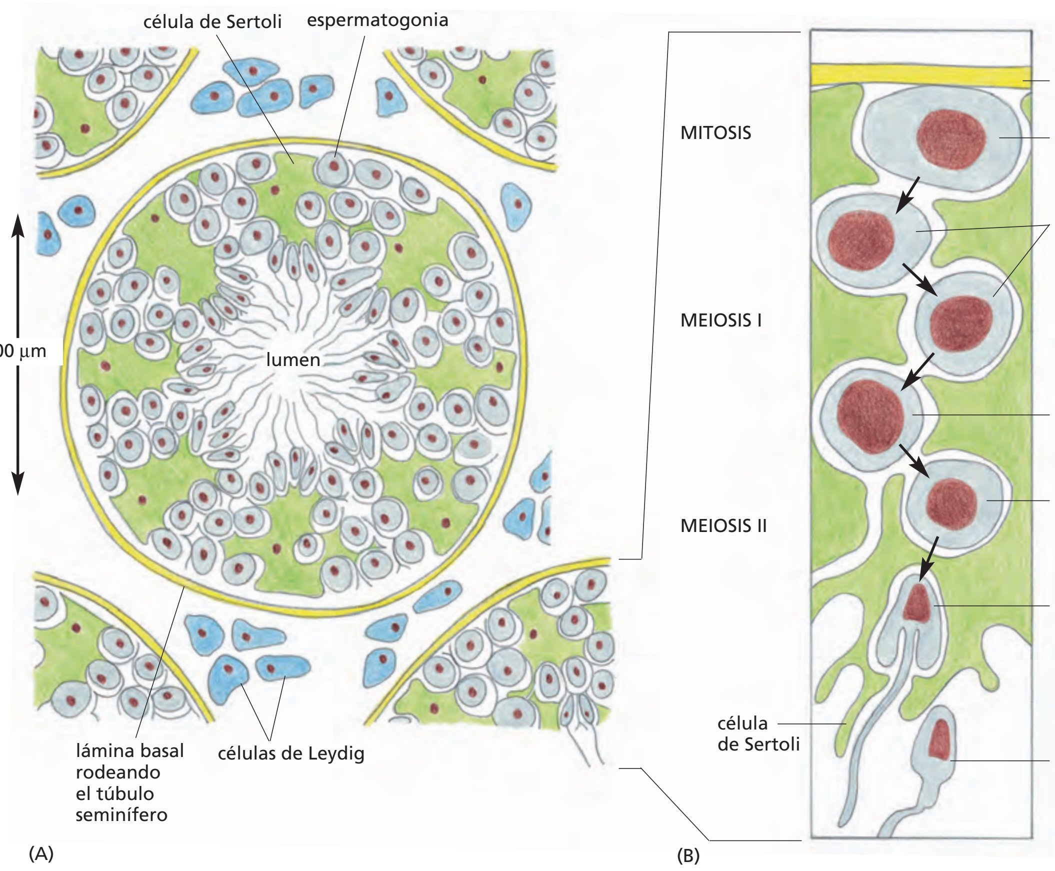


Figura 21–29 Dibujos muy simplificados de la sección transversal de un tubo seminífero de testículo de mamífero. (A) Todas las fases de la espermatogénesis que se muestran tienen lugar mientras las células germinales primordiales en desarrollo están en íntima asociación con las células de Sertoli. Las células de Sertoli dirigen la diferenciación sexual en la línea germinal masculina. Estas grandes células se extienden desde la lámina basal hasta el lumen de los tubos seminíferos; son necesarias para la supervivencia de las espermatogonias y son análogas a las células foliculares del ovario (véase Figura 21–19). La espermatogénesis también depende de la testosterona secretada por las células de Leydig situadas entre los tubos seminíferos. (B) Las espermatogonias se dividen por mitosis en la periferia de los tubos seminíferos. Algunas de ellas entran en la meiosis I transformándose en espermatocitos primarios; al concluir la meiosis I, se transforman en espermatocitos secundarios. Los espermatocitos secundarios completan la meiosis II transformándose en espermátidas, que se diferencian en espermatozoides y son liberados a la luz del tubo seminífero (véase Figura 21–30). En el hombre, tienen que pasar unos 24 días desde que una espermatogonia comienza la meiosis hasta que llega a espermátida, y otras 5 semanas para que una espermátida se convierta en un espermatozoide.

(Figura 21–29B). Una pequeña proporción de espermatogonias actúan como células madre, que se dividen lentamente por mitosis durante toda la vida, produciendo células hijas que se mantienen como células madre o se comprometen en la maduración.

En la **Figura 21–30** se representan las etapas de la espermatogénesis y su relación con la meiosis. Durante la profase I, los cromosomas homólogos apareados experimentan entrecruzamientos. Los espermatocitos primarios completan la meiosis I produciendo dos espermatocitos secundarios, cada uno de los cuales contiene 22 cromosomas autosómicos duplicados y un cromosoma X duplicado o un cromosoma Y duplicado. Los dos espermatocitos secundarios derivados de cada espermatocito primario entran en la meiosis II produciendo cuatro espermátidas, cada una de las cuales contiene un número haploide de cromosomas sencillos. Entonces, las espermátidas haploides experimentan grandes cambios morfológicos hasta diferenciarse en espermatozoides, que son liberados a la luz del tubo seminífero. A continuación, los espermatozoides pasan al *epidídimo*, que es un tubo muy largo y muy replegado, que se encuentra junto al testículo, donde se almacenan y donde madurarán. Los espermatozoides almacenados no están en condiciones todavía para fecundar un oocito; como se describirá más adelante tienen que terminar de madurar en el tracto genital femenino– proceso que se llama *capacitación*.

Los espermatozoides se desarrollan como un sincitio

Un rasgo interesante de la espermatogénesis es que cuando una espermatogonia ha empezado el proceso de maduración, las células de su descendencia no completan la división citoplasmática (citocinesis) ni durante la mitosis ni durante la meiosis. Por consiguiente, grandes clones de células hijas diferenciadas descendientes de una espermatogonia madura permanecen conectadas por puentes citoplasmáticos y forman un sincitio (**Figura 21–31**). Los puentes citoplasmáticos se mantienen hasta el final de la diferenciación de los espermatozoides, cuando éstos son liberados a la luz del tubo seminífero. El resultado es que se producen espermatozoides maduros sincrónicamente en cualquier área del tubo seminífero. ¿Cuál es la función de esta organización sincitial?

Anteriormente hemos visto que los oocitos crecen y se diferencian mientras contienen un juego diploide de cromosomas duplicados. Los espermatozoides, en cambio, no crecen

ni experimentan diferenciación alguna hasta que su núcleo ha concluido la meiosis y se transforma en un núcleo haploide. La presencia de puentes citoplasmáticos entre ellos significa que cada espermatozoide haploide en desarrollo comparte un citoplasma común con sus vecinos. De esta manera, puede disponer de todos los componentes de un genoma diploide completo. Por ejemplo, el espermatozoide en desarrollo que transporta el cromosoma Y puede disponer de las proteínas esenciales codificadas por los genes del cromosoma X. Así pues, el genoma diploide dirige la diferenciación de los espermatozoides como ocurre en la diferenciación de los oocitos.

Algunos de los genes que regulan la espermatogénesis se han conservado a lo largo de la evolución desde las moscas hasta los seres humanos. Los genes *Daz*, por ejemplo, codifican

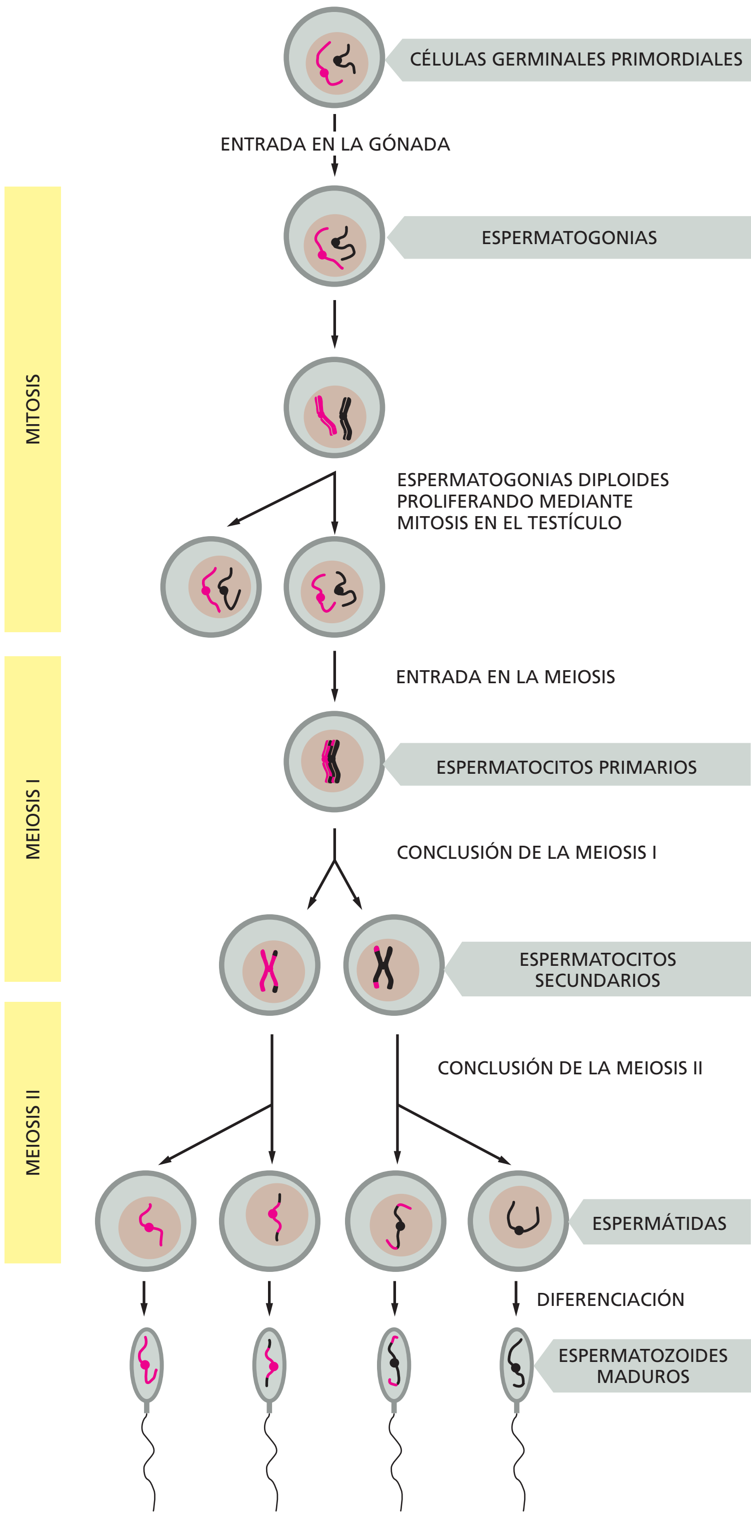


Figura 21–30 Etapas de la espermatogénesis. Las espermatogonias se forman a partir de las células germinales primordiales (PGC) que migran a la gónada en desarrollo en las primeras etapas de la embriogénesis. Cuando el animal alcanza la madurez sexual, las espermatogonias empiezan a proliferar rápidamente por mitosis. Algunas mantienen la capacidad de dividirse de forma indefinida (como células madre de las espermatogonias). Otras (espermatogonias en maduración) experimentan un número limitado de ciclos mitóticos, antes de comenzar la meiosis transformándose en espermatocitos que se convierten en espermátidas haploides y después en espermatozoides. La espermatogénesis se diferencia de la oogénesis (véase Figura 21–23) en varios aspectos. (1) A partir de la pubertad, se producen continuamente nuevas células que inician la meiosis. (2) Cada célula que empieza la meiosis da lugar a cuatro gametos maduros y no a uno solo. (3) Los espermatozoides maduros se forman mediante un elaborado proceso de diferenciación celular que empieza cuando acaba la meiosis. (4) Se dan aproximadamente doble número de divisiones en la producción de un espermatozoide que en la producción de un oocito. En el ratón, por ejemplo, se ha calculado que por término medio se producen unas 56 divisiones del zigoto al espermatozoide maduro y alrededor de 27 del zigoto al oocito maduro.

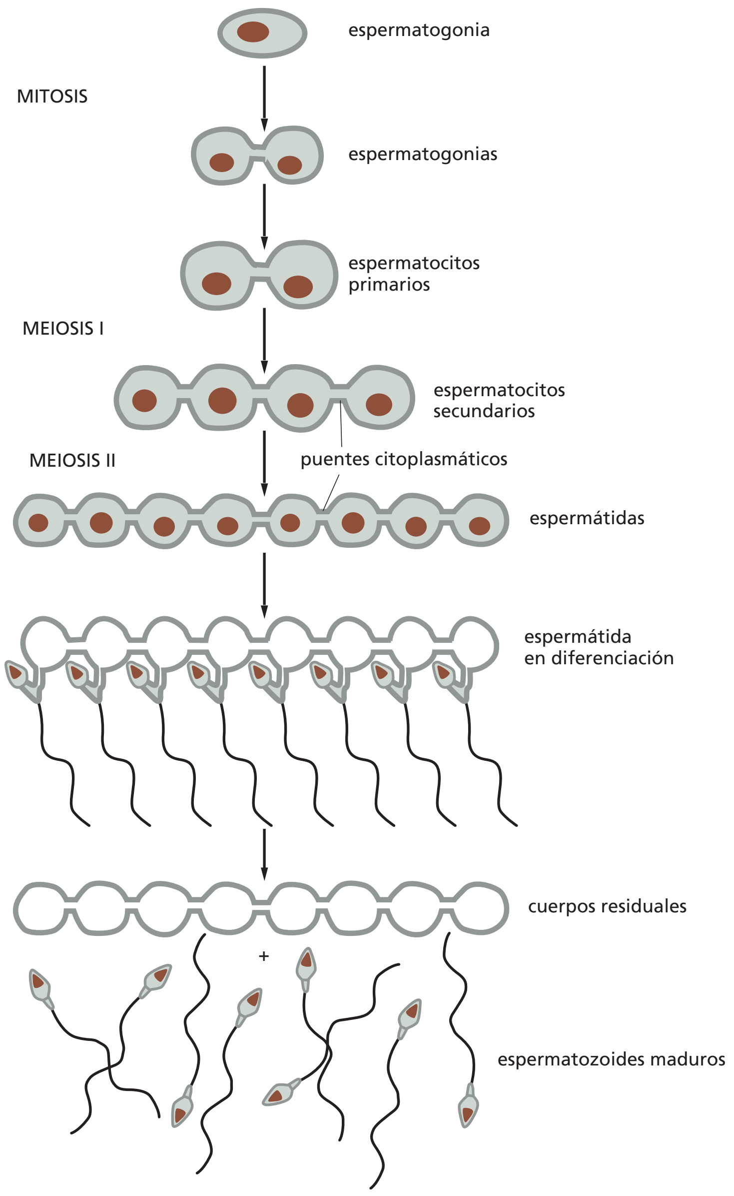


Figura 21–31 Puentes citoplasmáticos entre los espermatozoides en desarrollo y sus precursores. Por lo general, la células descendientes de una espermatogonia madura permanecen conectadas entre sí por puentes citoplasmáticos durante su diferenciación hasta espermatozoides maduros. Para mejor comprensión sólo se muestra la entrada en la meiosis de dos espermatogonias maduras unidas, que producen ocho espermátidas haploides también unidas. En realidad, el número de células conectadas que pasan por las dos divisiones meióticas y se diferencian sincrónicamente es mucho mayor del que se representa. Es interesante señalar que en el proceso de diferenciación, la mayor parte del citoplasma de las espermátidas se separa en forma de *cuerpos residuales* que son fagocitados por las células de Sertoli.

proteínas de unión a RNA y que se localizan agrupados en el cromosoma Y humano. Esta agrupación falta en muchos hombres infértiles, la mayoría de los cuales no pueden producir espermatozoides. Un gen de *Drosophila* homólogo al gen humano *Daz* también es esencial para la espermatogénesis en esta especie: los machos de las moscas deficientes en Daz son estériles, pero sorprendentemente pueden curarse mediante un transgen *Daz* humano. Las proteínas de unión a RNA son especialmente importantes en la espermatogénesis porque muchos de los genes expresados en la línea espermática están regulados a nivel de la traducción del RNA.

Resumen

Normalmente un espermatozoide es una célula pequeña, compacta y extraordinariamente especializada, que lleva a cabo la fecundación de un oocito. Mientras que en las mujeres la cantidad total de oocitos se produce antes del nacimiento, en los hombres las espermatogonias sólo entran en la meiosis para producir espermatocitos (y espermatozoides) después de la maduración sexual y el proceso es continuo a partir de este momento. Cada espermatocito primario diploide produce cuatro espermatozoides maduros haploides. El proceso de la diferenciación de los espermatozoides tiene lugar al finalizar la meiosis, lo cual en el hombre dura cinco semanas. Las espermatogonias maduras y los espermatocitos no llevan a cabo la citocinesis por lo que la descendencia de una espermatogonia se desarrolla como un gran sincitio. De esta manera, los productos codificados por los cromosomas de

ambos progenitores dirigen la diferenciación de los espermatozoides, aunque cada núcleo espermático sea haploide.

FECUNDACIÓN

Una vez liberados, tanto los oocitos como los espermatozoides están destinados a morir en cuestión de horas o incluso minutos a menos que se encuentren y se fusionen entre sí en el proceso de la **fecundación**. Mediante la fecundación, los oocitos y los espermatozoides se salvan: los oocitos se activan empezando su programa de desarrollo y los núcleos haploides de los dos gametos se fusionan formando el genoma de un nuevo organismo diploide. La fecundación ha sido ampliamente estudiada en invertebrados marinos como los erizos y las estrellas de mar, en los que la fecundación se produce en el agua del mar en la que se liberan grandes cantidades tanto de espermatozoides como de oocitos. Se trata de una fecundación externa que es mucho más fácil de estudiar que la fecundación interna de los mamíferos, que por lo general tiene lugar en el tracto reproductor de la hembra después del apareamiento. Sin embargo, a finales de la década de 1950, se logró fecundar oocitos de mamífero *in vitro*, abriéndose la vía para analizar las células y los procesos moleculares de la fecundación de los mamíferos.

En este apartado, nos centraremos en la fecundación de los mamíferos. Empezamos por considerar la maduración de los espermatozoides que se produce durante su paso por el tracto genital femenino. A continuación se describe el contacto de los espermatozoides con la cubierta del oocito (zona pelúcida), que induce la *reacción acrosómica* necesaria para que los espermatozoides se abran paso a través de la zona y se fusionen con el oocito. La unión del espermatozoide con la membrana plasmática del oocito y la consiguiente fusión de ambas membranas. Después se analizará cómo la fusión de un espermatozoide activa el oocito y como los núcleos haploides de los dos gametos se fusionan en el zigoto, completando la fecundación. Finalmente revisaremos las técnicas más recientes de reproducción asistida que han revolucionado el tratamiento de la infertilidad humana y han abierto nuevas vías de manipulación del proceso reproductivo.

Los espermatozoides eyaculados alcanzan la capacitación en el tracto genital femenino

De los 300 millones de espermatozoides humanos eyaculados en un coito, sólo unos 200 alcanzarán el lugar adecuado para la fecundación en el *oviducto*. Cuando el espermatozoide ha alcanzado el oocito, pasa la capa de células foliculares que lo rodean y se une y atraviesa la zona pelúcida. Finalmente, el espermatozoide puede unirse y fusionarse con la membrana plasmática del oocito.

Los espermatozoides eyaculados de los mamíferos no son competentes inicialmente para llevar a cabo estas funciones. Tienen que ser modificados a su paso por el tracto genital femenino. Este proceso es necesario para que los espermatozoides adquieran la capacidad de fecundar un oocito y se denomina **capacitación**. En el hombre dura unas 5 o 6 horas y se completa cuando el espermatozoide llega al oviducto. Los espermatozoides experimentan cambios bioquímicos y funcionales, incluyendo cambios en glicoproteínas, lípidos, canales iónicos de la membrana plasmática y un importante cambio en el potencial de reposo de esta membrana (el potencial de membrana pasa a ser más negativo de manera que la membrana se hiperpolariza). La capacitación está asociada también a un aumento del pH citosólico, a la fosforilación de tirosinas de varias proteínas espermáticas y al desenmascaramiento de receptores de la superficie celular que contribuyen a la unión de los espermatozoides a la zona pelúcida. La capacitación altera dos aspectos importantes del comportamiento de los espermatozoides: aumenta de manera considerable la motilidad del flagelo y hace que sean capaces de llevar a cabo la reacción acrosómica.

La capacitación puede producirse *in vitro* en condiciones de cultivo apropiadas y habitualmente es un requerimiento en los procesos de fecundación *in vitro*. Son necesarios tres componentes en el medio, los cuales se encuentran en concentraciones muy altas en el tracto genital femenino de albúmina, Ca^{2+} y HCO_3^-. La albúmina ayuda a extraer el colesterol de la membrana plasmática mediante el aumento de su capacidad para fusionarse con la membrana del acrosoma durante la reacción acrosómica. El Ca^{2+} y el HCO_3^- entran en el espermatozoide y activan de forma directa una enzima adenil ciclasa soluble del citosol que produce AMP cíclico (tratado en el Capítulo 15), que facilita el inicio de muchos de los cambios asociados con la capacitación.

Los espermatozoides capacitados se adhieren a la zona pelúcida y experimentan la reacción acrosómica

Durante la ovulación, los oocitos de los mamíferos son liberados desde el ovario a la cavidad peritoneal junto a la entrada del oviducto, donde se introducen inmediatamente. Están recubiertos por varias capas de células de la granulosa inmersas en una matriz extracelular muy rica en ácido hialurónico (se describe en el Capítulo 19). Las células de la granulosa pueden ayudar a entrar a los oocitos en el oviducto y además pueden segregar señales químicas no identificadas que atraen a los espermatozoides hacia el oocito.

Cuando un espermatozoide capacitado encuentra un oocito, en primer lugar tiene que penetrar las capas de células de la granulosa utilizando una enzima hialorunidasa de la superficie del espermatozoide. A continuación puede adherirse a la **zona pelúcida** (véase Figura 21–22). Normalmente esta zona actúa como una barrera de fecundación entre especies, de manera que a menudo al eliminarla desaparece esta barrera. Por ejemplo, los espermatozoides humanos pueden fecundar oocitos de hámster cuya zona se ha disuelto mediante enzimas específicas; sin embargo, los zigotos híbridos resultantes no llegan a desarrollarse. Algunas veces se utilizan los oocitos de hámster despojados de la zona pelúcida en estudios clínicos de infertilidad para valorar la capacidad fecundante de los espermatozoides humanos *in vitro* (**Figura 21–32**).

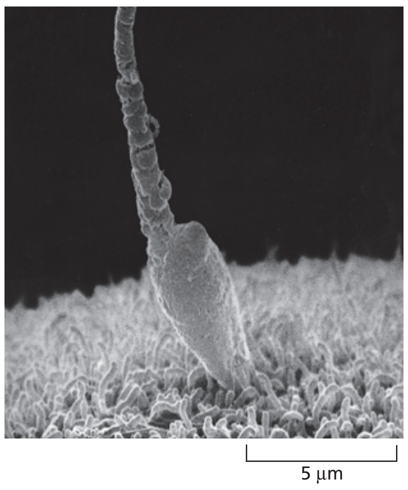


Figura 21–32 Electromicrografía de barrido de un espermatozoide humano en contacto con un oocito de hámster. Se ha eliminado la zona pelúcida del oocito, quedando al descubierto la membrana plasmática que presenta numerosos microvilli. La capacidad de un espermatozoide para penetrar un oocito de hámster se utiliza como prueba de fecundidad masculina; una penetración de 10 al 25% de los oocitos se considera un valor normal. (Cortesía de David M. Phillips.)

La zona pelúcida de los oocitos de los mamíferos está formada sobre todo por tres glicoproteínas, producidas exclusivamente por los oocitos en crecimiento. Dos de ellas, ZP2 y ZP3, se ensamblan formando largos filamentos, mientras la otra, ZP1, entrecruza los filamentos formando una red tridimensional. La proteína ZP3 es crucial: las hembras de ratón con un gen *Zp3* inactivo producen oocitos que carecen de zona pelúcida y son infértiles. ZP3 es responsable, por lo menos en ratón, de la unión específica del espermatozoide a la zona. Oligosacáridos unidos a ZP3 se consideran parcialmente responsables de las uniones específicas de especie entre espermatozoides y la zona pelúcida. La unión de los espermatozoides a la zona es compleja e intervienen mecanismos tanto dependientes como independientes de ZP3, así como varias proteínas de la superficie del espermatozoide.

La zona pelúcida induce la **reacción acrosómica** del espermatozoide y se produce la liberación del contenido del acrosoma mediante exocitosis (**Figura 21–33**). La reacción acrosómica es indispensable para la fecundación, ya que expone varias enzimas hidrolíticas que al parecer facilitan el paso del espermatozoide a través de la zona pelúcida y alteran la superficie del espermatozoide para que pueda unirse y fusionarse con la membrana plasmática del oocito, como se describirá más adelante. En estudios *in vitro,* la ZP3 purificada puede desencadenar la reacción acrosómica, posiblemente mediante la activación de un receptor de tipo lectina de la superficie del espermatozoide, que al parecer es una forma transmembrana de la enzima galactosiltransferasa. La activación del receptor conduce a un aumento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol del espermatozoide, que inicia la exocitosis.

Todavía no se conoce el mecanismo de la fusión espermatozoide-oocito

Después de la reacción acrosómica, el espermatozoide penetra en la zona pelúcida y se une a la membrana plasmática del oocito, entrando en contacto con los extremos de los microvilli de su superficie (véase Figura 21–32). El espermatozoide se adhiere al principio por su extremo y después por su superficie lateral (véase Figura 21–33). Rápidamente los microvilli vecinos se alargan y rodean al espermatozoide, asegurando que permanezca unido con fuerza y que pueda fusionarse con el oocito. Tras la fusión, todo el contenido del espermatozoide se introduce en el oocito y los microvilli se reabsorben.

Los mecanismos moleculares responsables de la unión y fusión de espermatozoide-oocito son muy poco conocidos, aunque después de numerosos intentos fallidos se han localizado dos proteínas de membrana que son necesarias para la fusión. Una es una proteína transmembrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas, específica de los espermatozoides, denominada *Izumo* (en honor al nombre de un lugar sagrado japonés dedicado al matrimonio). Aparece en la superficie de los espermatozoides de ratón y humanos durante la reacción acrosómica. Los anticuerpos anti-Izumo bloquean la fusión y los espermatozoide de ratones deficientes en la expresión de Izumo no pueden fusionarse con oocitos normales, pero todavía no se conoce como Izumo propicia la fusión espermatozoide-oocito. La única proteína de la superficie del oocito que se ha demostrado necesaria para la fusión con un espermatozoide es la proteína *CD9*, que es de la familia de las *tetraspaninas,* llamadas así

porque tienen cuatro segmentos que atraviesan la membrana. Los espermatozoides normales no se fusionan con oocitos de ratón deficientes en CD9, indicando que la fusión depende de CD9 pero no se sabe cómo. CD9 no actúa sola en la superficie del oocito favoreciendo la fusión: los espermatozoides normales también fracasan con oocitos tratados con una enzima que destruye proteínas adheridas a la membrana plasmática mediante un anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI: ***g**lycosyl**p**hosphatidyl**i**nositol*; tratado en el Capítulo 10), indicando que son necesarias una o más proteínas de unión a GPI para la fusión aunque todavía no han sido identificadas.

La fusión con un espermatozoide activa el oocito mediante un aumento del Ca^{2+} citosólico

La fusión con un espermatozoide activa al oocito y provoca que los gránulos corticales liberen su contenido por exocitosis, proceso que se llama *reacción cortical*. Se reanuda la meiosis que estaba detenida en la metafase II, produciéndose un segundo corpúsculo polar y un zigoto que comienza a desarrollarse.

El incremento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol de los oocitos fecundados desencadena todos estos procesos. <AGGA> Si la concentración de Ca^{2+} en el citosol de un oocito no fecundado aumenta de forma artificial, directamente por inyección de Ca^{2+} o indirectamente utilizando un ionóforo transportador de Ca^{2+} (tratado en el Capítulo 11), los oocitos de todos los animales en los que se ha probado, incluidos los mamíferos, se activan. Por el contrario, impidiendo el aumento de Ca^{2+} con la inyección de EGTA, quelante de Ca^{2+}, se inhibe la activación del oocito en respuesta a la fecundación.

Cuando el espermatozoide se fusiona con la membrana plasmática del oocito de manera normal, provoca un incremento local de Ca^{2+} citosólico, que se extiende por la célula como una ola (véase Figura 15–40). La ola se propaga gracias a una retroalimentación positiva: el aumento de Ca^{2+} citosólico causa la abertura de canales de Ca^{2+}, lo cual permite que entre más Ca^{2+} en el citosol. En general, a la ola inicial de Ca^{2+} liberado le siguen, al cabo de unos minutos, oscilaciones de Ca^{2+} (tratado en el Capítulo 15), que persisten durante varias horas.

La fusión con el espermatozoide desencadena la ola y las oscilaciones de Ca^{2+}, debido a la entrada de un factor en el citosol del oocito. Al inyectar a un oocito, un espermatozoide

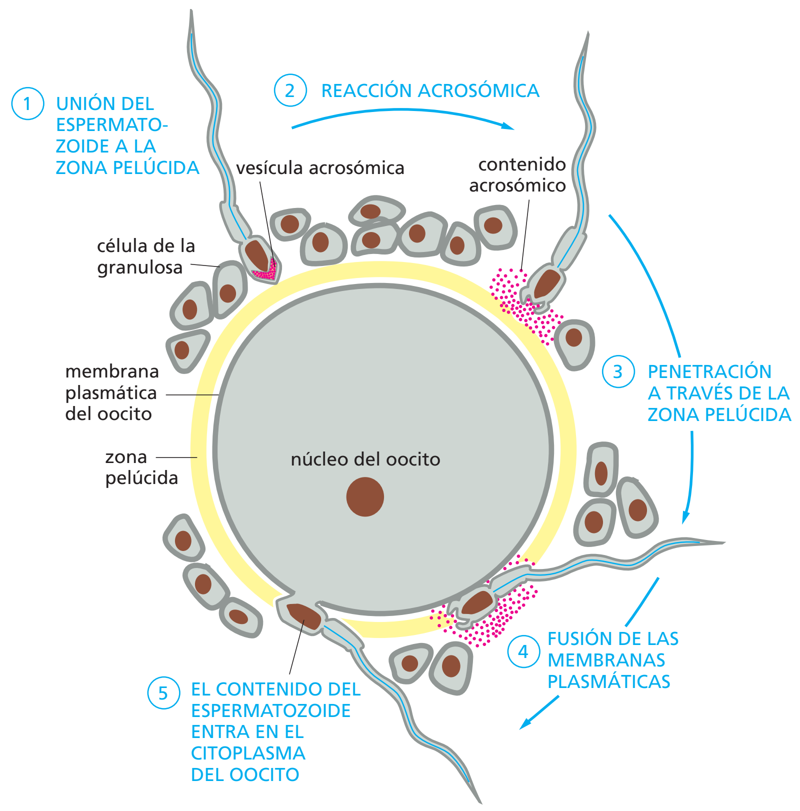


Figura 21–33 La reacción acrosómica se produce en los mamíferos cuando un espermatozoide fecunda un oocito. En el ratón, la zona pelúcida tiene alrededor de 6 μm de grosor; el espermatozoide la atraviesa a una velocidad de 1 μm/min aproximadamente.

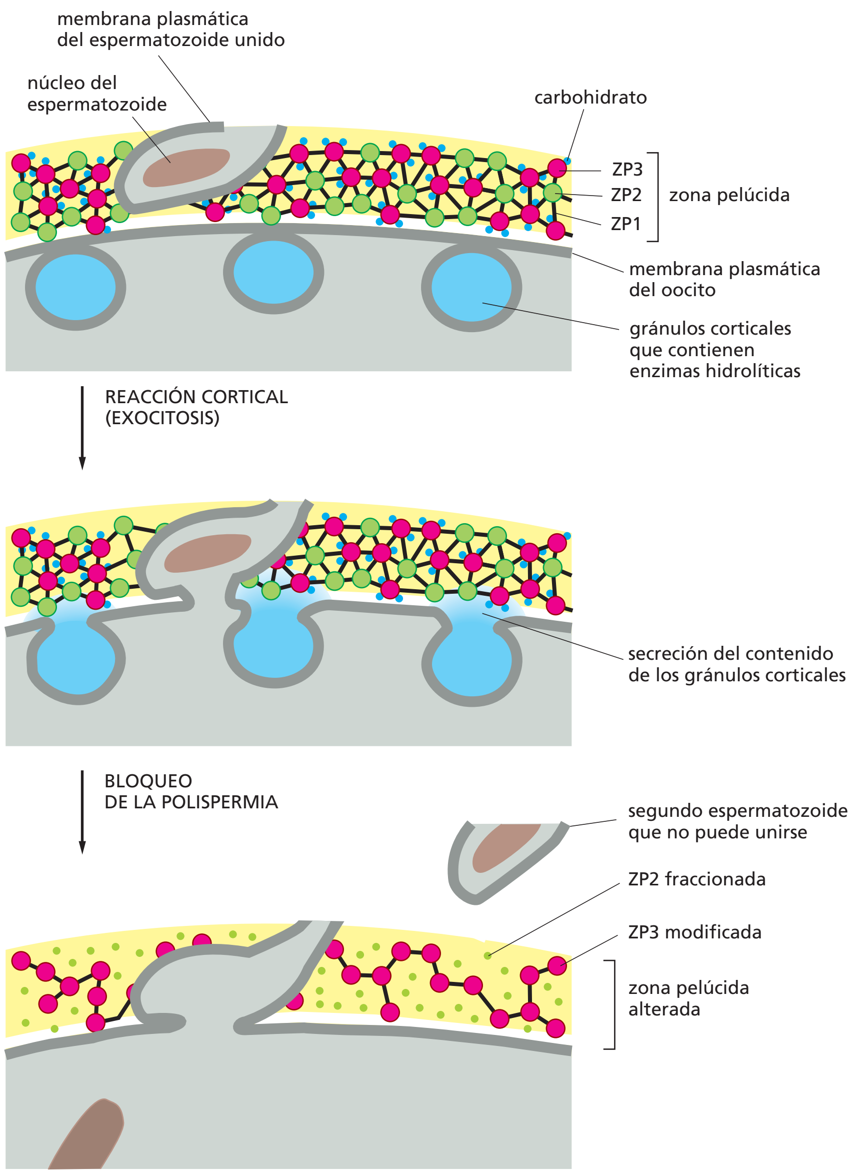


Figura 21–34 La reacción cortical puede impedir que entre más de un espermatozoide en un oocito de ratón. <TGAC> La liberación de los contenidos de los gránulos corticales inactiva ZP3, de manera que ya no puede unirse a la membrana plasmática del espermatozoide. También fracciona parcialmente la ZP2, endureciendo la zona pelúcida para que no puedan entrar más espermatozoides. Estos dos cambios provocan un bloqueo de la polispermia.

completo, una cabeza de espermatozoide o un extracto de espermatozoide, se obtienen los mismos resultados. Todos estos tratamientos incrementan la concentración de inositol 1,4,5- trisfosfato (IP_3), el cual libera Ca^{2+} del retículo endoplasmático e inicia la ola de reacciones y las oscilaciones de Ca^{2+} (tal como se describió en el Capítulo 15). Un firme candidato al factor determinante que los espermatozoides de los mamíferos introducen en el oocito es una forma específica de fosfolipasa C (PLCζ), que hidroliza directamente el fosfoinositol 4,5-bisfosfato (PI 4,5)P_2) produciendo IP_3 (y diacilglicerol) (véase la Figura 15–39).

La reacción cortical asegura que el oocito sea fecundado por un solo espermatozoide

A pesar de que a un oocito se le pueden unir muchos espermatozoides, normalmente sólo uno de ellos se fusiona con su membrana plasmática, e introduce su citosol, su núcleo y otros orgánulos. Si se fusionan más de un espermatozoide –situación que se denomina *polispermia*– se forman varios husos mitóticos o husos multipolares, dando lugar a una segregación anormal de los cromosomas durante la primera división mitótica; se producen células aneuploides y, general se detiene el desarrollo.

Dos mecanismos son los responsables de asegurar que cada oocito sea fecundado por un solo espermatozoide. En primer lugar, un cambio en la membrana plasmática del oocito cau-

sado por la fusión del primer espermatozoide impide que se fusionen otros espermatozoides. En los oocitos del erizo de mar, el cambio se debe a una rápida despolarización de la membrana; en los oocitos de mamífero se desconoce el mecanismo. En segundo lugar, se impide la polispermia mediante la **reacción cortical** del oocito, mediante la cual se liberan varias enzimas que cambian la estructura de la zona pelúcida de manera que los espermatozoides no pueden adherirse a ella ni penetrarla. Entre los cambios que se producen en la zona pelúcida en los mamíferos, está la inactivación de ZP3 de forma que no puede unirse a los espermatozoides ni inducir una reacción acrosómica; además, se produce la hidrólisis de ZP2, con lo que de alguna manera ayuda a que la zona sea impenetrable (**Figura 21–34**).

El espermatozoide proporciona al zigoto los centríolos y su genoma

Una vez fecundado, el óvulo se denomina **zigoto**. Sin embargo, la fecundación no se completa hasta que los dos núcleos haploides (llamados *pronúcleos*) –uno procedente del óvulo y el otro del espermatozoide– se fusionan y combinan sus cromosomas formando un solo núcleo diploide. En los óvulos fecundados de mamífero, los dos pronúcleos no se fusionan directamente como ocurre en muchas otras especies. Se acercan uno a otro pero permanecen independientes hasta que la membrana de cada pronúcleo se rompe, preparándose para la primera división mitótica del zigoto (**Figura 21–35**).

En la mayoría de animales, incluido el hombre, el espermatozoide aporta al zigoto algo más que su genoma. Aporta también un centríolo –estructura de la que carecen los oocitos humanos no fecundados. El centríolo del espermatozoide entra en el oocito junto con el núcleo y parte de la cola, formándose un centrosoma a su alrededor. En la especie humana, el centrosoma se duplica y los dos centrosomas resultantes participan en la organización y ensamblaje del primer huso mitótico en el zigoto (**Figura 21–36** y véase la Figura 21–35). Este hecho explica por qué se forman varios husos o husos multipolares en los casos de polispermia, cuando muchos espermatozoides transfieren sus centriolos al oocito.

IVF e ICSI han revolucionado el tratamiento de la infertilidad humana

Alrededor de un 10% de las parejas humanas presentan fertilidad reducida, es decir, que la mujer no queda embarazada después de 12 a 18 meses de práctica de relaciones sexuales sin protección. Aproximadamente en la mitad de los casos el problema radica en el hombre y en la otra mitad de los casos en la mujer. Existen numerosas causas que reducen la fecundidad tanto en hombres como en mujeres y en la mayoría de casos se puede solventar el problema mediante alguna técnica de reproducción asistida.

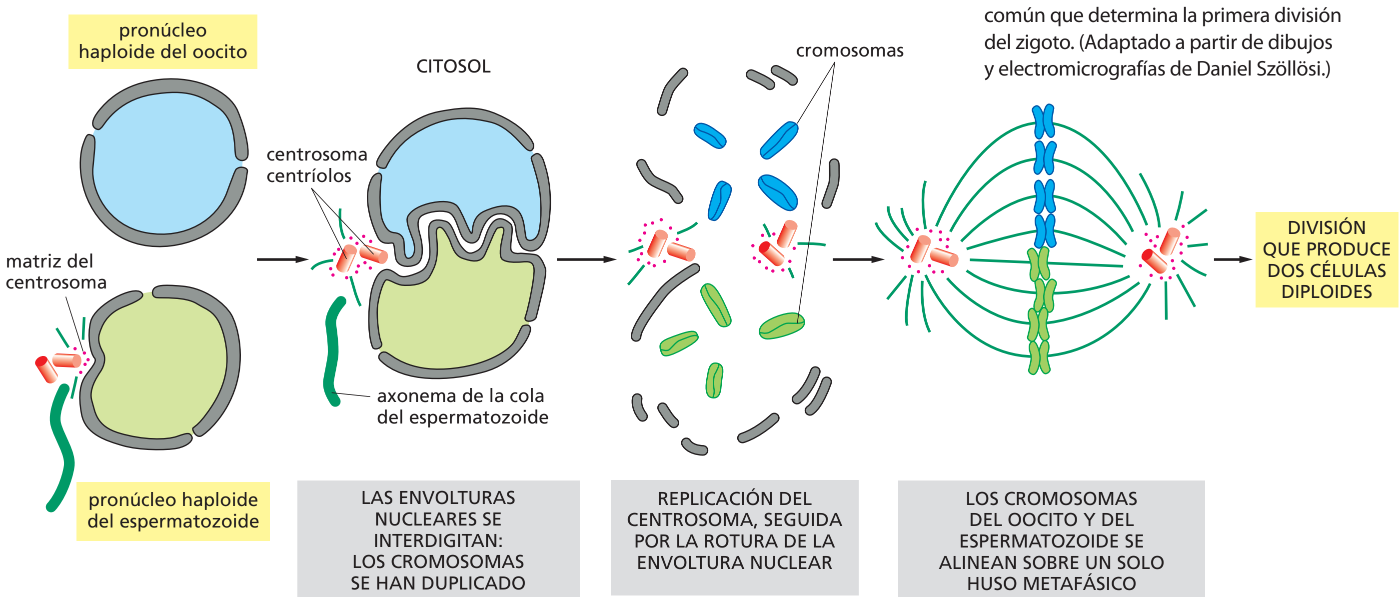


Figura 21–35 Unión de los pronúcleos del espermatozoide y del oocito después de la fecundación en los mamíferos. Los pronúcleos migran hacia el centro del óvulo. Cuando se encuentran, las envolturas nucleares se interdigitan. Los centrosomas se duplican, las envolturas nucleares se rompen y los cromosomas de ambos gametos se integran formando un huso mitótico común que determina la primera división del zigoto. (Adaptado a partir de dibujos y electromicrografías de Daniel Szöllösi.)

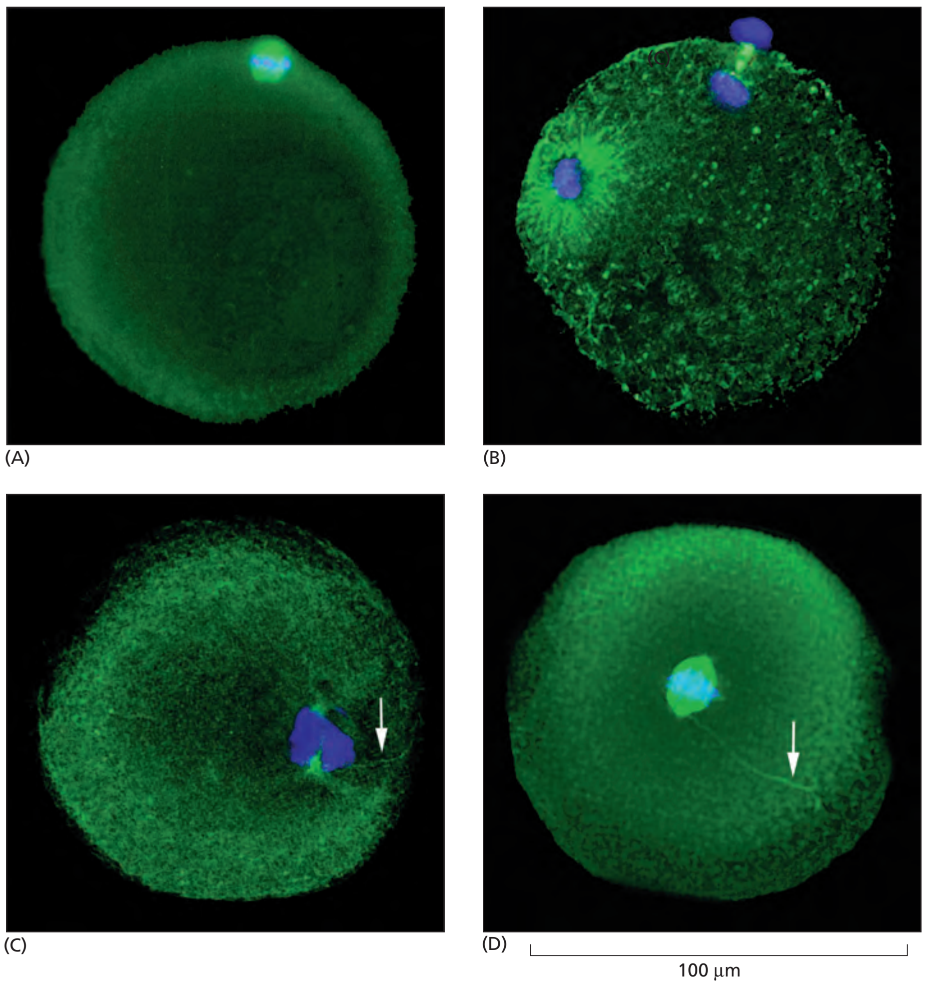


Figura 21–36 Micrografía mediante la técnica de inmunofluorescencia de un espermatozoide humano y el pronúcleo de un óvulo aproximándose en un proceso de fecundación *in vitro*. Los microtúbulos del huso se han teñido de color *verde* con anticuerpos antitubulina; el DNA está marcado en *azul* mediante un colorante específico. (A) Huso meiótico en un oocito secundario maduro no fecundado. (B) El óvulo fecundado expulsa su segundo corpúsculo polar aproximadamente a las 5 horas de la fusión con el espermatozoide. La cabeza del espermatozoide (*izquierda*) ha nucleado un conjunto de microtúbulos. Los dos pronúcleos aún están alejados. (C) Los dos pronúcleos se encuentran. (D) A las 16 horas de la fusión, el centrosoma que ha entrado con el espermatozoide se ha duplicado y los dos centrosomas hijos han organizado un huso mitótico bipolar. Los cromosomas de ambos pronúcleos se alinean en la placa metafásica del huso. Como indican las flechas en (C) y (D), la cola del espermatozoide se asocia con uno de los centrosomas. (De C. Simerly et al., *Nat. Med.* 1:47-53, 1995. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

El primer gran avance en el tratamiento de la infertilidad ocurrió en 1978 con el nacimiento de Louise Brown, el primer bebé logrado a partir de **fecundación *in vitro*** (**IVF**: ***i****n* ***v****itro* ***f****ertilization*). Antes de este acontecimiento había encendidos debates acerca de la ética y la seguridad de la IVF –muy similares a los actuales debates éticos sobre la producción y la utilización de células madre embrionarias (ES). En la actualidad, la IVF es un procedimiento rutinario mediante la cual han nacido más de un millón de niños. Para iniciar el proceso se trata a la mujer con hormonas que estimulan la maduración simultánea de varios oocitos. Inmediatamente antes de su expulsión por la ovulación, los oocitos se extraen del ovario (utilizando una larga aguja a través de la vagina) y se fecundan en una placa de cultivo con espermatozoides del hombre. Después de unos días en cultivo, 2 o 3 de los embriones que presentan mejor aspecto se transfieren, mediante un catéter, al útero de la mujer; los embriones restantes por lo general se congelan en nitrógeno líquido, por si se necesitan en implantaciones posteriores. La principal complicación de la IVF son los embarazos múltiples, que se producen en un 30% de los casos, en comparación con el 2% aproximadamente en los embarazos naturales.

El procedimiento de IVF descrito ha permitido que muchas mujeres en principio infértiles puedan tener hijos con normalidad. Sin embargo, esto no soluciona el problema para los hombres infértiles que generalmente producen pocos espermatozoides o los que producen presentan anormalidades. Un segundo avance ocurrido en 1992 aportó la solución para la mayoría de estos hombres. Se trata de una modificación de la IVF, llamada **inyección intracitoplasmática del espermatozoide** (**ICSI**: ***i****ntra****c****ytoplasmatic* ***s****perm* ***i****njection*), que consiste en fecundar un oocito mediante la inyección en su citoplasma de un solo espermatozoide (**Figura 21–37**). Esta estrategia elimina la exigencia de un gran número de espermatozoides móviles y evita las muchas barreras que normalmente debe salvar un espermatozoide para fecundar un oocito, que incluyen la capacitación, el desplazamiento hasta el oocito, la reacción acrosómica, el paso a través de la zona pelúcida y la fusión con la membrana plasmática del oocito. La proporción de éxito de la ICSI es superior al 50% y ha permitido el nacimiento de más de 100.000 niños.

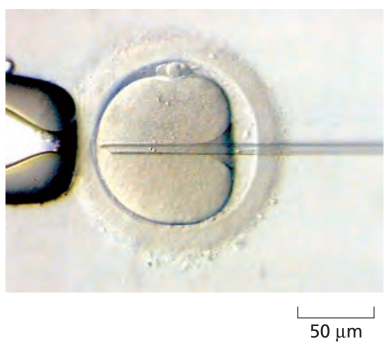


Figura 21–37 Inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI). Micrografia de un oocito secundario humano sujetado con una micropipeta (a la izquierda) al que se inyecta un único espermatozoide humano mediante una aguja de vidrio. La zona pelúcida rodea el oocito y el corpúsculo polar. (Cortesía de Reproductive Biology Associates, Atlanta, Georgia.)

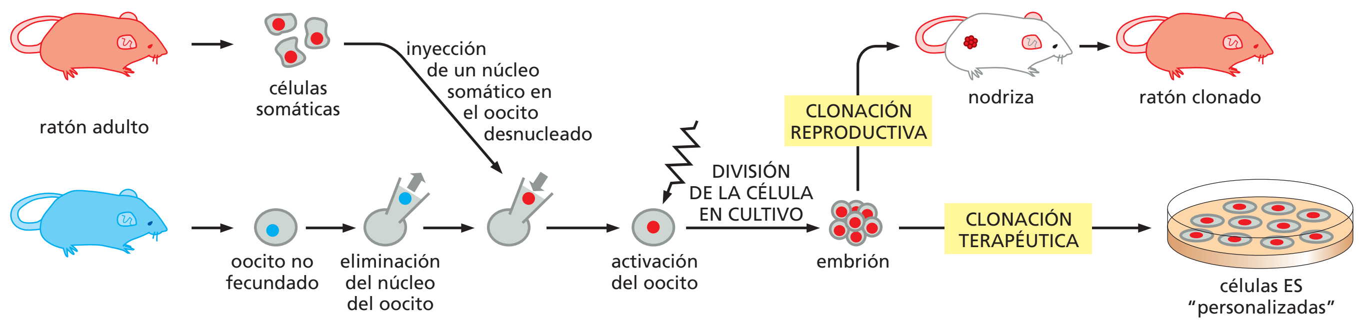


Figura 21–38 Diferencias entre la clonación reproductiva y la preparación de células madre embrionarias "personalizadas". En ambos casos se reconstruye un embrión extrayendo (o destruyendo) el núcleo de un oocito no fecundado y reemplazándolo por un núcleo de una célula somática del animal que se quiere clonar. El oocito reconstruido se activa mediante un shock eléctrico. En la *clonación reproductiva,* el embrión desarrollado en el cultivo se trasplanta al útero de una madre nodriza y se desarrolla como un animal clónico. Por el contrario, en la preparación de las células madre embrionarias personalizadas (ES) –algunas veces llamadas *clones terapéuticos*–, el embrión produce células ES en cultivo, que pueden ser utilizadas para producir distintos tipos de células especializadas para el tratamiento del individuo donante del núcleo somático; gracias a que las células especializadas obtenidas a partir de estas células ES son idénticas en términos genéticos a las del donante del núcleo somático, no serán rechazadas inmunológicamente.

Además de revolucionar el tratamiento de la infertilidad, la IVF ha aportado nuevas posibilidades de manipulación de los procesos reproductivos. Por ejemplo, ha hecho posible evitar que padres portadores de un gen defectuoso lo transmitan a sus hijos, mediante cribado de embriones de IVF para este gen antes de su implantación en el útero.

Como ya se ha comentado, las técnicas de manipulación *in vitro* de oocitos de mamíferos han hecho posible la obtención de clones de muchos tipos de mamíferos mediante transferencia del núcleo de una célula somática del animal que se va a clonar a un oocito no fecundado al que se la ha extraído o destruido su núcleo. La técnica no es fácil; el éxito es bajo y todavía no se sabe si de esta manera se podría clonar un ser humano. Además, existen serios argumentos éticos acerca de si se debería intentar clonar un ser humano alguna vez. Existe un acuerdo general respecto a que no debería ni intentarse con las técnicas que existen en la actualidad, porque la probabilidad de producir bebés anormales es muy alta; además, en muchos países incluidos los Estados Unidos no está permitido por la ley.

Sin embargo, la *clonación reproductiva* no debe confundirse con la *clonación terapéutica*, en la cual el embrión temprano obtenido *in vitro* a partir de un zigoto reconstruido no se implanta en un útero para que dé lugar a un nuevo individuo, sino que se utiliza para obtener células ES que son genéticamente iguales a las del donante del núcleo somático (**Figura 21–38**). Para el tratamiento del donante se podrían utilizar varios tipos de células especializadas procedentes de estas células ES "personalizadas", evitando el problema del rechazo inmunológico que conlleva el uso de células ES genéticamente distintas. La sociedad en su conjunto deberá tomar decisiones comprometidas para determinar hasta dónde se puede llegar en la utilización de estas nuevas tecnologías de manipulación del proceso reproductivo para obtener un potencial beneficio del individuo. En el futuro cabe la posibilidad de producir células personalizadas similares a las ES mediante vías alternativas que permitan superar estos dilemas éticos: por ejemplo, en un reciente experimento se ha utilizado la ingeniería genética para expresar en fibroblastos de ratón en cultivo un número de proteínas reguladoras de genes que normalmente se expresan en las células ES: cuando cuatro de estos transgenes se expresaban de forma simultánea, los fibroblastos se comportaban de forma muy parecida a la células ES.

La fecundación determina el inicio de uno de los más decisivos fenómenos de toda la biología: el proceso de la embriogénesis, durante el cual el zigoto se transforma en un nuevo individuo. Este es el tema del capítulo siguiente.

Resumen

La fecundación en los mamíferos empieza normalmente cuando un espermatozoide, que ha sido capacitado en el tracto genital femenino, se adhiere a la zona pelúcida que rodea un oocito dentro del oviducto. Este hecho induce la reacción acrosómica del espermatozoide, liberándose el contenido de la vesícula acrosómica, que facilita la digestión de la zona pelúcida y el paso a través de ella. La reacción acrosómica es necesaria también para que el espermatozoide se adhiera y se fusione con la membrana plasmática del oocito. La fusión del espermatozoide y el oocito induce una ola y oscilaciones de Ca^{2+} *en el citosol del oocito que provocan su activación. La activación incluye la reacción cortical, mediante la cual los gránulos corticales liberan su contenido alterando la zona pelúcida con el fin de evitar que otros espermatozoides puedan unirse al oocito y penetrar en él. La señalización por* Ca^{2+} *también desencadena el desarrollo del zigoto, que comienza después de que los pronúcleos entren en contacto y sus cromosomas se hayan alineado en un huso mitótico único, que determina la primera división del zigoto. Muchas parejas, en principio infértiles, actualmente pueden reproducirse gracias a la IVF y la ICSI.*

BIBLIOGRAFÍA

General

Austin CR & Short RV eds (1984) Reproduction in Mammals Vol I Germ Cells and Fertilization 2nd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
Gilbert SF (2006) Developmental Biology 8th ed pp 175–210, 529–554, 593–626. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.

Visión general de la reproducción sexual

Cavalier-Smith T (2002) Origins of the machinery of recombination and sex. *Heredity* 88:125–41.
Charlesworth B (2006) The evolutionary biology of sex. *Curr Biol* 16:R693–R695.
Hoekstra RF (2005) Evolutionary biology: why sex is good. *Nature* 434:571–573.
Maynard Smith J (1978) Evolution of Sex. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Meiosis

Blat Y, Protacio RU, Hunter N & Kleckner N (2002) Physical and functional interactions among basic chromosome organizational features govern early steps of meiotic chiasma formation. *Cell* 111:791–802.
Börner GV, Kleckner N & Hunter N (2004) Crossover/noncrossover differentiation, synaptonemal complex formation and regulatory surveillance at the leptotene/zygotene transition of meiosis. *Cell* 117:29–45.
De Massy B (2003) Distribution of meiotic recombination sites. *Trends Genet* 19:514–522.
Gerton JL, & Hawley RS (2005) Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nature Rev Genet* 6:477–487.
Hall H, Hunt P & Hassold T (2006) Meiosis and sex chromosome aneuploidy: how meiotic errors cause aneuploidy; how aneuploidy causes meiotic errors. *Curr Opin Genet Dev* 16:323–329.
Hauf S & Watanabe Y (2004) Kinetochore orientation in mitosis and meiosis. *Cell* 119:317–327.
Hunt PA & Hassold TJ (2002) Sex matters in meiosis. *Science* 296:2181–2183.
Jordan P (2006) Initiation of homologous chromosome pairing during meiosis. *Biochem Soc Trans* 34:545–549.
Nasmyth K (2001) Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu Rev Genet* 35:673–745.
Page SL & Hawley RS (2004) The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:525–558.
Petronczki M, Siomos MF & Nasmyth K (2003) Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112:423–440.

Células germinales primordiales y determinación del sexo en los mamíferos

Bowles J, Knight D, Smith C et al (2006) Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 312:596–600.
Extavour CG & Akam M (2003) Mechanisms of germ cell specification cross the metazoans: epigenesis and preformation. *Development* 130:5869–5884.
Goodfellow PN & Lovell-Badge R (1993) SRY and sex determination in mammals. *Annu Rev Genet* 27:71–92.
Knower KC, Kelly S & Harley VR (2003) Turning on the male—SRY, SOX9 and sex determination in mammals. *Cytogenet Genome Res* 101:185–198.
McLaren A (2003) Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol* 262:1–15.
Morrish BC & Sinclair AH (2002) Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction* 124:447–457.
Surani MA, Ancelin K, Hajkova P et al (2004) Mechanism of mouse germ cell specification: a genetic program regulating epigenetic reprogramming. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 69:1–9.
Tilmann C & Capel B (2002) Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. *Recent Prog Horm Res* 57:1–18.

Oocitos

Gosden RG (2002) Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 186149–186153.
Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM& Eppig JJ (2002) Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 296:2178–2180.
Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H et al (2002) Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev* 61:414–424.
Wassarman PM, Jovine L & Litscher ES (2004) Mouse zona pellucida genes and glycoproteins. *Cytogenet Genome Res* 105:228–234.

Espermatozoides

Clermont Y (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 52:198–236.
Moreno RD & Alvarado CP (2006) The mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence. *Mol Reprod Dev* 73:1430–1434.
Ogawa T, Ohmura M & Ohbo K (2005) The niche for spermatogonial stem cells in the mammalian testis. *Int J Hematol* 82:381–388.
Toshimori K (2003) Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Microsc Res Tech* 61:1–6.

Fecundación

De Jonge C (2005) Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update* 11:205–214.
Hafez ES, Goff L & Hafez B (2004) Mammalian fertilization, IVF, ICSI:physiological/molecular parameters, clinical application. *Arch Androl* 50:69–88.
Jaenisch R (2004) Human Cloning—The Science and Ethics of Nuclear Transplantation. *N Eng J Med* 351:2787–2791.
Shur BD, Rodeheffer C & Ensslin MA (2004) Mammalian fertilization. *Curr Biol* 14:R691–692.
Stein KK, Primakoff P & Myles D (2004) Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane. *J Cell Sci* 117:6269–6274.
Takahashi K & Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–676.
Tsaadon A, Eliyahu E, Shtraizent N & Shalgi R (2006) When a sperm meets an egg: block to polyspermy. *Mol Cell Endocrinol* 252:107–114.
Wassarman PM (2005) Contribution of mouse egg zona pellucida glycoproteins to gamete recognition during fertilization. *J Cell Physiol* 204:388–391.
Whitaker M (2006) Calcium at fertilization and in early development. *Physiol Rev* 86:25–88.

Capítulo 22

Desarrollo de los organismos pluricelulares

22

En este capítulo

MECANISMOS GENERALES DEL DESARROLLO ANIMAL 1305

CAENORHABDITIS ELEGANS: SU DESARROLLO DESDE LA PERSPECTIVA DE LA CÉLULA INDIVIDUAL 1321

DROSOPHILA Y LA GENÉTICA MOLECULAR DE LA FORMACIÓN DEL PATRÓN: GÉNESIS DEL ESQUEMA CORPORAL 1328

LOS GENES SELECTORES HOMEÓTICOS Y SU PAPEL EN LA FORMACIÓN DEL PATRÓN DEL EJE ANTEROPOSTERIOR 1341

ORGANOGÉNESIS Y DISEÑO DE LOS APÉNDICES 1347

LOS DESPLAZAMIENTOS CELULARES Y LA FORMACIÓN DEL CUERPO DE LOS VERTEBRADOS 1363

EL RATÓN 1378

EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO 1383

EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS 1397

Todo animal o planta empieza su vida como una sola célula: un huevo fecundado. Durante el desarrollo esta célula se divide repetidas veces produciendo muchas células distintas, que configuran finalmente un patrón de una complejidad y precisión espectaculares. En última instancia es el genoma lo que determina el diseño; el reto de la biología del desarrollo es comprender de qué forma lo hace.

Por lo general el genoma es idéntico en todas las células; éstas se diferencian no por contener distinta información genética, sino porque expresan distintos grupos de genes. Esta expresión selectiva controla los cuatro procesos esenciales mediante los cuales se construye el embrión: (1) la *proliferación celular*, que produce muchas células a partir de una sola; (2) la *especialización celular*, que genera células con distintas características en lugares diferentes; (3) las *interacciones celulares*, que coordinan el comportamiento de una célula con respecto a sus vecinas, y (4) el *desplazamiento celular*, que reorganiza las células formando tejidos y órganos estructurados (**Figura 22–1**).

En un embrión en desarrollo todos estos procesos ocurren a la vez, en una variedad calidoscópica de maneras distintas en las diferentes partes del organismo. Para entender las estrategias básicas del desarrollo, tenemos que observarlo con mayor detalle. En particular tenemos que comprender la sucesión de cambios que ocurren desde el punto de partida de la célula individual y de qué forma el genoma actúa en su interior. En la contienda, no hay ningún comandante al mando para dirigir las tropas; cada una de las células de las millares que forman el embrión debe tomar sus propias decisiones, de acuerdo con su copia de las instrucciones genéticas y con sus circunstancias particulares.

La complejidad de los animales y de las plantas radica en una característica capital en el sistema de control genético: las células tienen memoria, es decir, los genes que expresa una célula determinada y el modo en que ésta se comporta dependen del pasado de dicha célula, así como de sus circunstancias presentes. Las células de nuestro cuerpo (células musculares, neuronas, células epiteliales, células intestinales, etc.) mantienen sus caracteres especializados no porque reciban continuamente las mismas instrucciones de su entorno, sino porque retienen un registro de señales que recibieron de sus antepasadas durante el desarrollo embrionario temprano. Los mecanismos moleculares de la memoria celular se han tratado en el Capítulo 7. En el presente capítulo, analizaremos sus consecuencias.

MECANISMOS GENERALES DEL DESARROLLO ANIMAL

Existen unos diez millones de especies de animales y son prodigiosamente variadas. Sería impensable que un gusano, una pulga, un águila o un calamar gigante se generasen por los mismos mecanismos de desarrollo, como tampoco podríamos esperar que los mismos procedimientos se usaran tanto para hacer un zapato como para construir un avión. Quizá algunos principios abstractos serían similares, pero ¿cómo van a estar involucradas las mismas moléculas específicas?

Uno de los hallazgos más sorprendentes de los últimos diez o veinte años ha sido que estas suposiciones eran erróneas. De hecho, la mayor parte de la maquinaria del desarrollo es esencialmente la misma, no tan sólo en todos los vertebrados, sino también en todos los fílums de invertebrados. Las moléculas que definen los diversos tipos de células especializadas son similares y están relacionadas desde un punto de vista evolutivo. Estas moléculas marcan las diferencias entre las distintas regiones del cuerpo y participan en la creación de

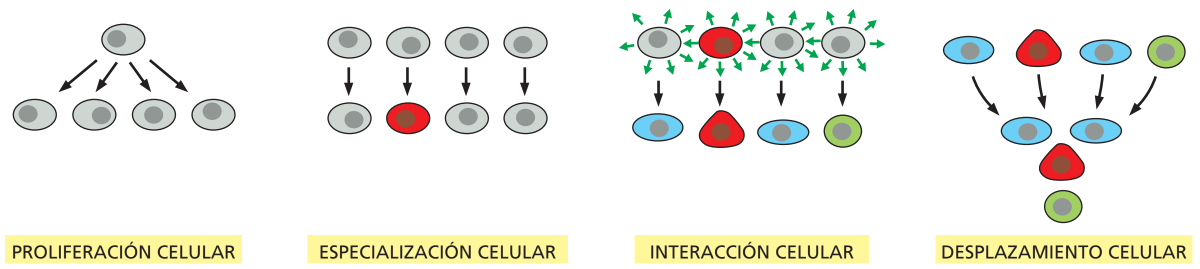


Figura 22–1 Los cuatro procesos esenciales por los que se forma un organismo pluricelular: proliferación celular, especialización celular, interacción celular y desplazamiento celular.

su diseño. Hay una serie de proteínas homólogas que a menudo son funcionalmente intercambiables entre especies muy diferentes. Una proteína de ratón producida de manera artificial a menudo es capaz de llevar a cabo la misma función en una mosca de la misma manera que lo haría si se tratase de la versión de la proteína propia de la mosca, y viceversa, controlando a la perfección, por ejemplo, el desarrollo de un ojo o la arquitectura del cerebro (**Figura 22–2**). Gracias a esta unidad de mecanismos fundamentales, podremos comprobar que los biólogos del desarrollo están ahora en vías de obtener un conocimiento coherente del desarrollo animal.

Las plantas pertenecen a un reino aparte: su organización pluricelular ha evolucionado independientemente de los animales. También podemos referir para ellas un mecanismo fundamental unificado, pero distinto del que opera en los animales. En este capítulo trataremos sobre todo del reino animal, pero hacia el final del mismo, nos referiremos brevemente a las plantas.

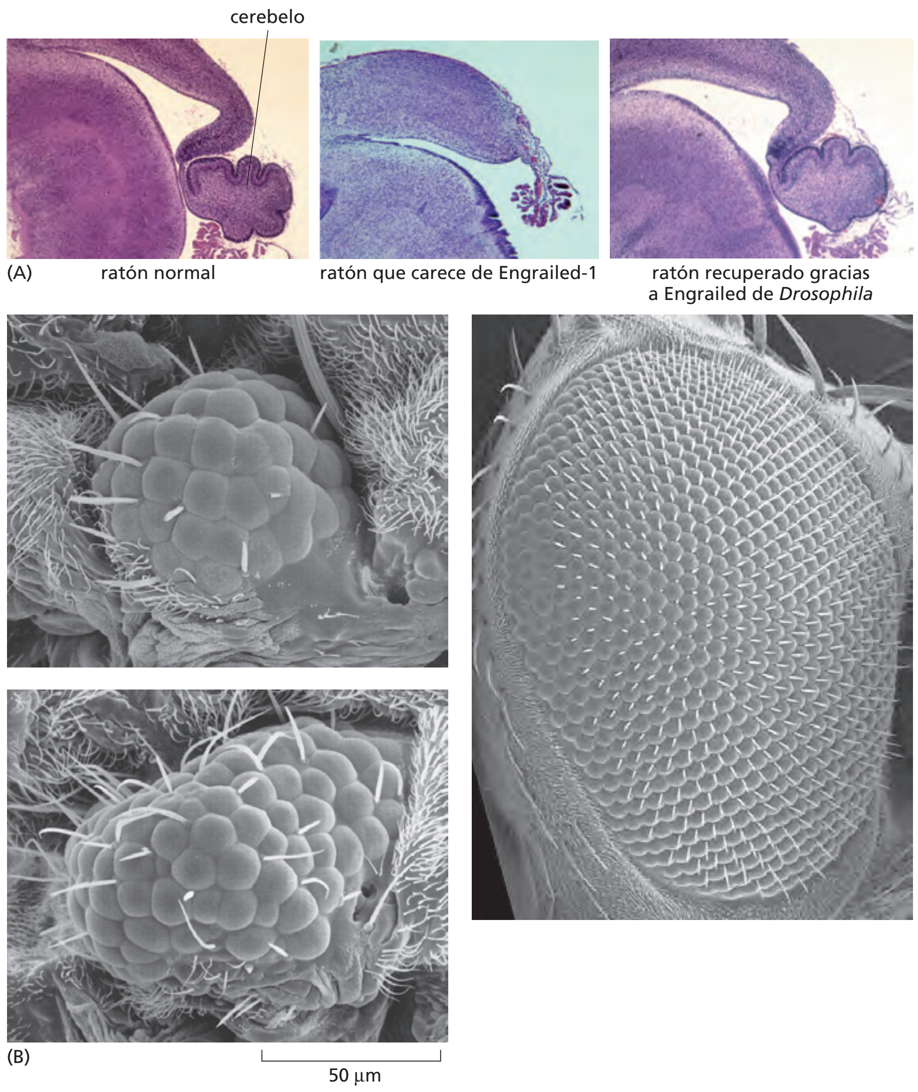


Figura 22–2 Proteínas homólogas actúan de forma intercambiable en el desarrollo de ratones y de moscas. (A) Una proteína de mosca utilizada en un ratón. La secuencia del DNA de *Drosophila* que codifica la proteína Engrailed (una proteína de regulación génica) puede sustituir a la correspondiente secuencia que codifica la proteína Engrailed-1 de ratón. La carencia de Engrailed-1 en el ratón provoca un defecto evidente en el encéfalo (no se desarrolla el cerebelo); la proteína de *Drosophila* sustituye de forma eficiente esta carencia, recuperando al ratón transgénico de su deformidad. (B) Una proteína de molusco utilizada en una mosca. La proteína Eyeless controla el desarrollo del ojo en *Drosophila;* cuando se expresa erróneamente puede ser causa de que el ojo se desarrolle en un lugar no habitual, por ejemplo, en una pata. Cuando en una mosca transgénica se expresa erróneamente la proteína homóloga Pax-6 de un ratón, de una sepia o de casi cualquier animal que tenga ojos, tiene este mismo efecto. Las electromicrografías de barrido muestran un trozo de tejido ocular en la pata de una mosca, resultante de la expresión errónea de *Eyeless* de *Drosophila* (arriba) y de *Pax-6* de sepia (abajo). Para poder comparar, en el panel de la derecha se muestra un ojo entero de una *Drosophila* normal, a bajos aumentos. (A, de M.C. Hanks et al., *Development* 125:4521-4530, 1998. Con autorización de The Company of Biologists; B, de S.I Tomarev et al., *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A* 94:2421-2426, 1997. Con autorización de National Academy of Sciences y por cortesía de Kevin Moses.)

En primer lugar, se explicarán los principios generales básicos del desarrollo animal y se presentarán las siete especies de animales que los biólogos del desarrollo han adoptado como organismos modelo.

Los animales comparten algunas características anatómicas básicas

Las semejanzas entre las especies animales, en lo que respecta a los genes que controlan el desarrollo, reflejan una evolución de los animales a partir de un ancestro común en el cual estos genes ya estaban presentes. Aunque no sepamos qué aspecto tenía, el antepasado común de lombrices, moluscos, insectos, vertebrados y otros animales complejos, debía poseer muchos tipos de células diferenciadas que podríamos reconocer: por ejemplo células epidérmicas que formarían una capa externa protectora; células intestinales que absorberían los nutrientes de la comida ingerida; células musculares, que tendrían la finalidad del movimiento; neuronas y células sensoriales, que controlarían el movimiento. El cuerpo debería estar organizado de forma que una capa de piel lo cubriera, debería existir una boca para la alimentación y un tubo digestivo que contuviera y procesara la comida; los músculos, nervios y otros tejidos estarían colocados en el espacio existente entre la piel o capa externa y el tubo digestivo interno.

Estas características son comunes a casi todos los animales y corresponden a un esquema anatómico básico de desarrollo. La célula huevo (un almacén gigante de sustancias) se divide, o se **segmenta**, formando muchas células de menor tamaño. <ATTT> Estas células se cohesionan dando lugar a una lámina epitelial que mira hacia el medio externo. La mayor parte de esta lámina sigue siendo externa y constituye el **ectodermo** (el precursor de la epidermis y del sistema nervioso). Una parte de esta lámina se dobla hacia el interior formando el **endodermo** (el precursor del tubo digestivo y de apéndices como los pulmones y el hígado). Otro grupo de células se desplaza hacia el espacio entre el ectodermo y el endodermo formando el **mesodermo** (el precursor de los músculos, tejidos conjuntivos y otros elementos diversos). Esta transformación de una sencilla bola o esfera vacía de células en una estructura con tubo digestivo es lo que llamamos **gastrulación** (del griego: vientre), que de una forma u otra constituye una característica casi universal de cualquier animal en desarrollo. En la **Figura 22–3** se ilustra el proceso tal como lo observamos en el erizo de mar.

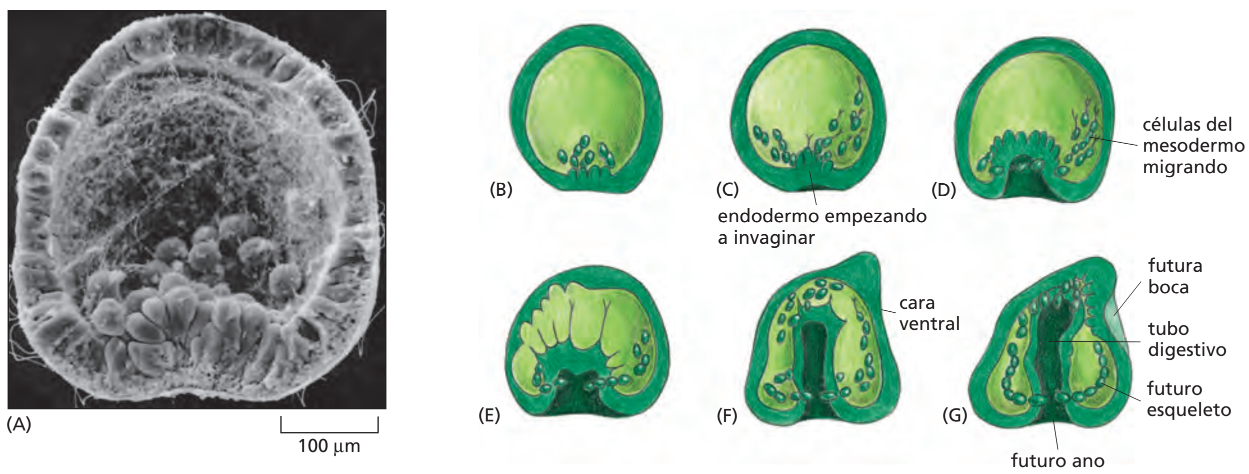
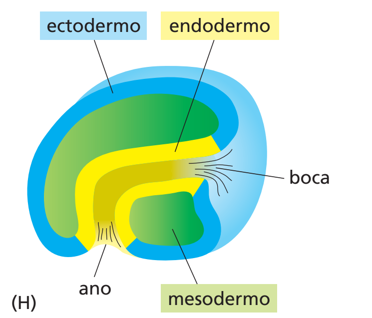


Figura 22–3 Gastrulación en el erizo de mar. Un huevo fecundado se divide y produce una *blástula*, una esfera hueca formada por células epiteliales que delimita una cavidad. En el proceso de gastrulación, algunas células se dirigen hacia el interior formando el intestino y otros tejidos internos.
(A) Electromicrografía de barrido que muestra el plegamiento incipiente del epitelio. (B) Dibujo que muestra de qué forma un grupo de células se desgaja del epitelio formando el mesodermo. (C) Entonces, estas células reptan por la cara interna de la pared de la blástula. (D) Mientras tanto el epitelio continúa plegándose hacia adentro formando el endodermo. (E y F) El endodermo invaginado se extiende en forma de un largo tubo. (G) El extremo del tubo digestivo entra en contacto con la pared de la blástula en el lugar de la futura abertura bucal. El ectodermo y el endodermo se fusionarán y se formará un orificio. (H) Plan corporal animal básico, con una hoja ectodérmica exterior, un tubo endodérmico interior y el mesodermo intercalado entre ambos. (A, de R.D. Burke et al., *Dev. Biol.* 146:542-557, 1991. Con autorización de Academic Press; B-G, de L. Wolpert y T. Gustafson, *Endeavour* 26::85-90, 1967. Con autorización de Elsevier.)



La evolución se ha diversificado a partir de los fundamentos anatómicos y moleculares que describiremos en el presente capítulo, produciendo la maravillosa variedad de las especies actuales. Pero la perpetuación subyacente de los genes y de los mecanismos significa que el estudio del desarrollo de un animal en particular a menudo lleva a la percepción del desarrollo de muchos otros tipos de animales. De todo ello podemos inferir que los biólogos del desarrollo, al igual que los biólogos celulares, tienen la ventaja de poder abordar los problemas fundamentales utilizando cualquier especie que ofrezca el camino más sencillo para encontrar una respuesta.

Los animales pluricelulares son ricos en proteínas que intervienen en las interacciones celulares y la regulación génica

La secuenciación del genoma revela hasta qué punto llega la similitud molecular entre especies. El nematodo *Caenorhabditis elegans*, la mosca *Drosophila melanogaster* y el vertebrado *Homo sapiens* son los tres primeros animales de los cuales se obtuvo una secuenciación completa del genoma. En el árbol filogenético de la evolución animal se encuentran muy distantes entre sí: se cree que el linaje del que proceden los vertebrados se separó del de los nematodos, insectos y moluscos hace más de 600 millones de años. A pesar de ello, cuando comparamos sistemáticamente los 20.000 genes de *C. elegans* con los 14.000 de *Drosophila* y con los 25.000 genes humanos, encontramos que alrededor del 50% de los genes de cada una de estas especies tienen homólogos claramente identificables en las otras dos especies o por lo menos en una de ellas. En otras palabras, el 50% o más del conjunto de todos los genes humanos tiene versiones que ya estaban presentes en el antepasado común de gusanos moscas y humanos.

Como es lógico, no todo se conserva: hay algunos genes que desempeñan un papel clave en el desarrollo de los vertebrados que no tienen homólogos en el genoma de *C. elegans* ni en el de *Drosophila* y viceversa. Sin embargo una gran parte del 50% no tiene homólogos identificables en otros fílums, seguramente porque sus funciones son de menor importancia. Aunque estos genes no conservados se transcriben y están bien representados en las bibliotecas de cDNA, los estudios sobre la variabilidad de la secuencia de aminoácidos y del DNA en y entre poblaciones naturales indican que estos genes raramente pueden mutar sin ocasionar alteraciones importantes; cuando se inactivan de forma artificial, las consecuencias no son tan graves como en el caso de genes que tienen homólogos en especies evolutivamente distantes. Debido a que estas especies son capaces de evolucionar con rapidez, algunas decenas de millones de años bastarían para borrar cualquier semejanza familiar o para que se produzca su desaparición del genoma.

Los genomas de las distintas clases de animales difieren también por el hecho, ya descrito en el Capítulo 1, de que existen variaciones sustanciales en la capacidad de duplicación génica: la cantidad de genes duplicados a lo largo de la evolución de los vertebrados es realmente importante, lo que implica que un mamífero o un pez tiene a menudo varios homólogos que corresponden a un solo gen de gusano o de mosca.

A pesar de estas diferencias, en una primera aproximación podríamos decir que todos estos animales tienen a su disposición una dotación de proteínas similar para llevar a cabo funciones esenciales. En otras palabras, estos animales construyen su cuerpo utilizando, a groso modo, el mismo equipo molecular.

¿Cuáles son los genes necesarios en la construcción de animales pluricelulares, más allá de los que utiliza una célula aislada? La comparación de los genomas animales con los de levadura (un eucariota unicelular) sugiere que existen dos clases de proteínas que son especialmente importantes en la organización pluricelular. El primer tipo es el de las moléculas transmembrana, que intervienen en la adhesión y la señalización celular. Hasta 2000 genes de *C. elegans* codifican receptores de superficie, proteínas de adhesión celular y canales iónicos que no están presentes en las levaduras o lo están en un número muy reducido. El segundo tipo de proteínas son las reguladoras de genes: son proteínas que se unen al DNA y se encuentran en mayor número en el genoma de *C. elegans* que en el de las levaduras. Por ejemplo, la familia de estructura básica hélice-bucle-hélice tiene 41 miembros en *C. elegans*, 84 en *Drosophila*, 131 en humanos y sólo 7 en las levaduras; otras familias de reguladores de la expresión génica también están mucho más representadas en los animales que en las levaduras. No es sorprendente, pues, que estas dos clases de proteínas sean centrales en la biología del desarrollo: como veremos más adelante, el desarrollo de los animales pluricelulares está dominado por las interacciones célula-célula y por la expresión génica diferencial.

Como ya se ha comentado en el Capítulo 7, los micro-RNA también tienen un papel destacado en el control de la expresión génica durante el desarrollo, pero parece que tienen menor importancia comparados con las proteínas. Así pues, un embrión mutante de pez cebra, que carece por completo de la enzima Dicer (necesaria en la producción de miRNA funcionales), empieza su desarrollo casi normalmente, mediante la formación de distintos tipos celulares y con un esquema corporal organizado de forma más o menos correcta, antes de que las anormalidades sean graves.

El DNA regulador define el programa de desarrollo

Gusanos, moscas, moluscos y mamíferos comparten muchos de los tipos básicos de células y todos ellos tienen boca, tubo digestivo, sistema nervioso y piel; pero más allá de algunas características esenciales, son radicalmente distintos en su estructura corporal. Si es el genoma lo que determina la estructura del cuerpo y estos animales tienen una dotación de genes tan similar, ¿cómo pueden ser tan distintos?

Las proteínas codificadas por el genoma pueden considerarse como los componentes de una caja de construcción. Con ella se pueden construir muchas cosas, al igual que con un juego infantil de construcciones. Podemos construir camiones, casas, puentes, grúas, etc., tan sólo uniendo las piezas en combinaciones diferentes. Algunas piezas deben ir necesariamente juntas (tuercas con tornillos, ruedas con neumáticos y con ejes), pero la organización a gran escala del objeto final no está definida por estas subestructuras, sino más bien por el manual de instrucciones que acompaña las piezas e indica cómo se tienen que ensamblar.

En gran parte, las instrucciones necesarias en la formación de un animal pluricelular se encuentran en el DNA regulador no-codificante que está relacionado con cada gen. Como ya se mencionó en el Capítulo 4, cada uno de los genes de un organismo pluricelular tiene asociados millares o decenas de millares de nucleótidos de DNA no-codificante. El DNA contiene, diseminados en su interior, docenas de elementos reguladores distintos llamados *activadores* (son segmentos cortos de DNA que reactúan como lugares de unión de complejos específicos de proteínas reguladoras). En términos generales, como se explicó en el Capítulo 7, la presencia de un determinado módulo regulador de este tipo conduce a la expresión del gen, cualquiera que sea el lugar de ensamblaje en la célula de este complejo de proteínas que reconoce un segmento determinado de DNA; en algunos casos se produce una inhibición, o un efecto más complicado, en vez de la expresión del gen. Si pudiéramos descifrar el conjunto total de módulos reguladores asociados a un gen, comprenderíamos cuáles son las condiciones moleculares bajo las cuales se sintetiza el producto génico. Podemos decir, pues, que este DNA regulador define el programa secuencial del desarrollo, es decir, las reglas para pasar de un estado al siguiente, a medida que las células proliferan y se van situando en el embrión en relación con su entorno; entonces se ponen en funcionamiento nuevos grupos de genes, según las actividades de las proteínas que contengan en cada momento (**Figura 22–4**). Es obvio que las variaciones en las proteínas también contribuyen a generar diferencias entre las especies. Pero aunque las proteínas codificadas por el genoma permanecieran invariables por completo, un cambio en el DNA regulador sería suficiente para generar tejidos y estructuras corporales radicalmente diferentes.

Cuando comparamos especies animales con esquemas corporales muy semejantes (p. ej., peces, aves y mamíferos), vemos que por lo general los genes correspondientes tienen

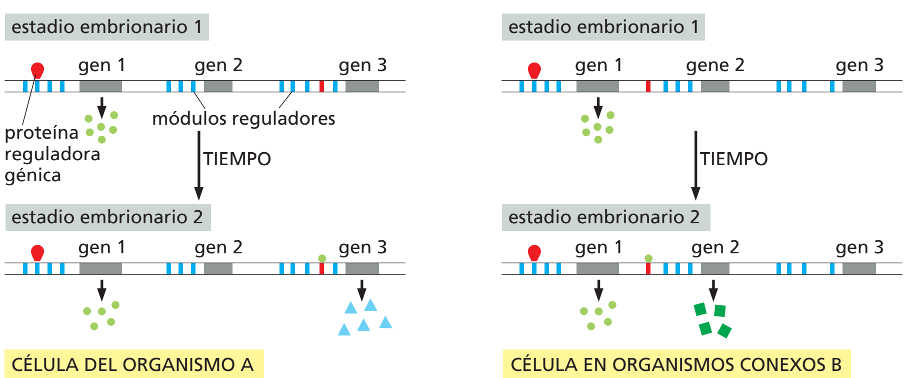


Figura 22–4 De qué forma el DNA regulador define la pauta en la secuencia de expresión génica durante el desarrollo. Los genomas de los organismos A y B codifican el mismo grupo de proteínas pero tienen un DNA regulador distinto. Las dos células del panel empiezan en el mismo estado; en el estadio 1 expresan las mismas proteínas, pero en el estadio 2 muestran estados totalmente distintos a causa de una disposición diferente de los módulos reguladores.

equipos de unidades reguladoras similares: las secuencias de DNA de muchas de ellas están bien conservadas y podemos reconocer homólogos en los diversos animales. Lo mismo es cierto si comparamos diferentes especies de nematodos o diferentes especies de insectos. Pero cuando comparamos regiones reguladoras de vertebrados con las de un gusano o una mosca, es difícil ver tal semejanza. Las secuencias de codificación de proteínas son indiscutiblemente similares, pero las secuencias correspondientes al DNA regulador son muy distintas. Este hallazgo es lo que cabría esperar si los diferentes esquemas corporales fuesen principalmente el resultado de cambios en el programa del DNA regulador y conservaran la mayor parte de los grupos de proteínas.

La manipulación del embrión revela las interacciones entre sus células

Ante la complejidad de un animal adulto, ¿cómo empezar el análisis del proceso que lo ha traído a la existencia? El primer paso esencial sería describir los cambios anatómicos (los patrones de división celular, crecimiento y movimiento) que transforman el huevo en un organismo maduro. Esta es la tarea que asume la *embriología descriptiva*, y es más difícil de lo que en un principio se podría pensar. Para explicar el desarrollo en términos de comportamiento celular necesitamos poder seguir los pasos de las células individuales a través de sus divisiones, transformaciones y migraciones en el embrión. Los fundamentos de la embriología descriptiva se trazaron durante el siglo XIX, pero el trabajo minucioso de *rastrear los linajes celulares* continúa siendo un reto para el ingenio de los biólogos del desarrollo (**Figura 22–5**).

Dada una descripción, ¿cómo podemos continuar hasta descubrir los mecanismos causales? Tradicionalmente los *embriólogos experimentales* han intentado comprender el desarrollo en términos de modos de interaccionar de las células y los tejidos, que llevan a generar la estructura pluricelular. Por otro lado, los *genéticos del desarrollo* han intentado analizar el desarrollo en términos de acciones de los genes. Estas dos metodologías son complementarias y convergen configurando el conocimiento actual.

En embriología experimental, las células y los tejidos de los animales en desarrollo se eliminan, se redistribuyen, se trasplantan o bien se cultivan de forma aislada; con todo ello

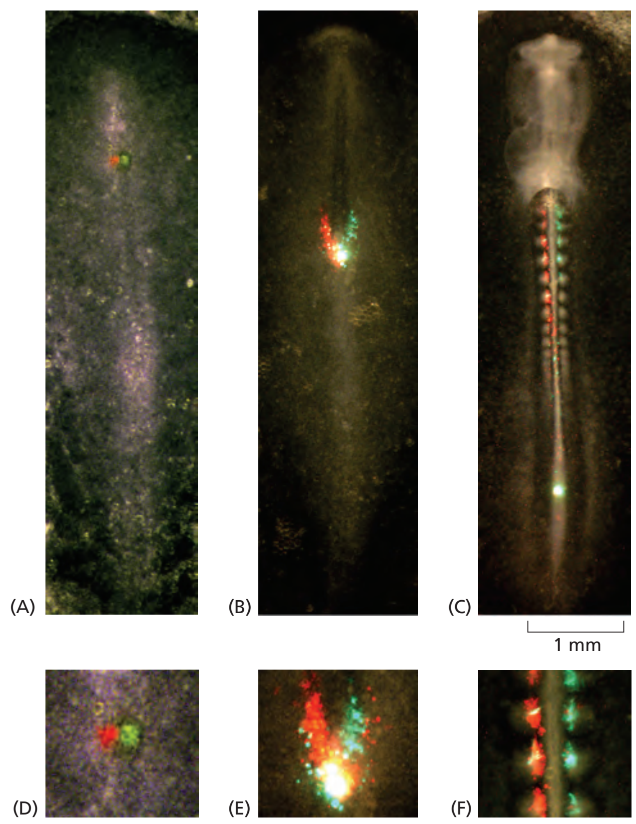


Figura 22–5 Experimento de seguimiento de un linaje celular en un embrión temprano de pollo. Las figuras de la fila superior se presentan a bajo aumento y muestran el embrión entero; las figuras de la fila inferior son de detalles, mostrando la distribución de células marcadas. El experimento de seguimiento revela reordenamientos celulares complejos y drásticos. (A, D) Se han utilizado dos manchas finas de colorante fluorescente, una *roja* y otra *verde*, para teñir pequeños grupos de células en un embrión a las 20 horas de incubación. Aunque el embrión todavía aparece como un pliego de tejidos sin forma, ya presenta alguna especialización. Las manchas se han situado a cada lado de una estructura llamada nodo. (B, E) Seis horas más tarde, algunas de las células marcadas permanecen en el nodo (que se ha desplazado hacia atrás), formando una mancha brillante de fluorescencia, mientras que otras células han empezado a desplazarse hacia delante en relación al nodo. (C, F) Después de otras 8 horas, el plan corporal es claramente visible, con una cabeza en el extremo frontal (*arriba*), un eje central y, a cada uno de sus lados, filas de segmentos corporales embrionarios llamados somitas. El nodo ha retrocedido aún más hacia la cola; algunas células marcadas al principio permanecen junto al nodo, formando una mancha brillante fluorescente, mientras que otras han migrado a posiciones más anteriores formando parte de las somitas. (Cortesía de Raquel Mendes y Leonor Saúde.)

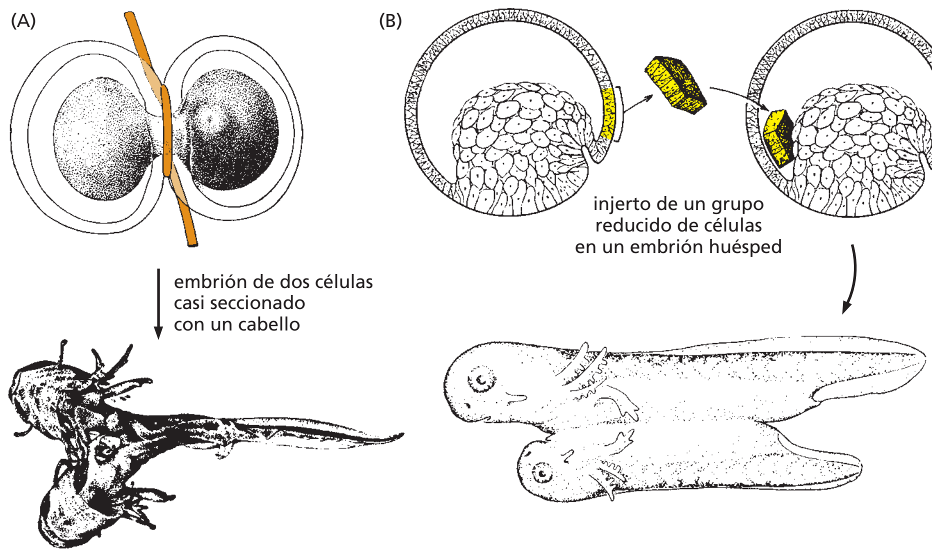


Figura 22–6 Algunos resultados sorprendentes que se han obtenido en embriología experimental. <ATTG> En (A), un embrión temprano de anfibio se secciona casi totalmente por la mitad haciendo un nudo con un cabello. En (B), un embrión de anfibio en un estadio algo más tardío recibe un injerto de un grupo reducido de células procedente de otro embrión en el mismo estadio. Estas dos operaciones totalmente distintas dan lugar a un solo embrión que desarrolla un par de gemelos unidos (siameses). En el experimento (A) también es posible seccionar el embrión en dos mitades separadas por completo; en este caso se desarrollan dos renacuajos separados y perfectamente formados. (A, según H. Spemann, Embryonic Development and Induction. New Haven: Yale University Press, 1938; B, según J. Holtfreter y V. Hamburger, en Analysis of Development [B.H. Willier, P.A. Weiss y V. Hamburger, eds.], pp. 230-296. Philadelphia: Saunders, 1955.)

se intenta descubrir la influencia que ejercen unos sobre otros. A menudo los resultados son sorprendentes: por ejemplo, un embrión en un estadio temprano del desarrollo que es cortado por la mitad, puede dar lugar a dos animales completos y perfectamente formados; o un trozo pequeño de tejido trasplantado a una nueva localización puede reorganizar toda la estructura del cuerpo en desarrollo (**Figura 22–6**). Este tipo de observaciones se pueden extender y precisar de modo que podamos descifrar las interacciones célula-célula y las reglas del comportamiento celular. Los experimentos son más fáciles de llevar a cabo en embriones de gran tamaño, que son fácilmente accesibles mediante microcirugía. Por lo tanto, las especies más utilizadas son las aves, especialmente el pollo y los anfibios, sobre todo la rana africana *Xenopus laevis*.

Los estudios de animales mutantes identifican los genes que controlan los procesos del desarrollo

La genética del desarrollo empieza con el aislamiento de animales mutantes cuyo desarrollo es anormal. Es habitual utilizar un *cribaje genético*, tal como se ha descrito en el Capítulo 8. Los animales progenitores se tratan con mutágenos químicos o con radiación ionizante para inducir alteraciones en sus células germinales; luego se examina un gran número de sus descendientes. Los escasos individuos mutantes que muestran alguna anomalía interesante (p. ej., el desarrollo alterado de un ojo), son los que se eligen para su estudio posterior. De esta forma es posible descubrir los genes que son necesarios para el desarrollo normal de una característica determinada. Mediante la clonación y la secuenciación podemos identificar el producto proteico, investigar cómo funciona y empezar un análisis del DNA regulador que controla su expresión.

El método genético es más fácil con animales de pequeño tamaño, con tiempos de generación cortos y que puedan criarse en el laboratorio. El primer animal que se estudió de esta forma fue la mosca *Drosophila melanogaster*, sobre la cual nos extenderemos más adelante. Pero el mismo método se ha aplicado con éxito al nematodo *Caenorhabditis elegans*, al pez cebra *Danio rerio* y al ratón *Mus musculus*. Aunque los humanos no son objeto de mutación intencionada, también en casos de anormalidades han sido objeto de cribajes genéticos, práctica que se ha realizado en numerosos individuos a través del sistema sanitario. Han surgido muchas mutaciones en humanos que causan anormalidades compatibles con la vida; el análisis de los individuos afectados y de sus células ha proporcionado conocimientos importantes sobre la naturaleza de los procesos del desarrollo.

La célula toma decisiones sobre su desarrollo mucho antes de mostrar algún cambio visible

Simplemente a través de una observación cuidadosa, o con la ayuda de colorantes trazadores (vitales) o de otras técnicas de marcaje celular, se puede descubrir cuál será el destino

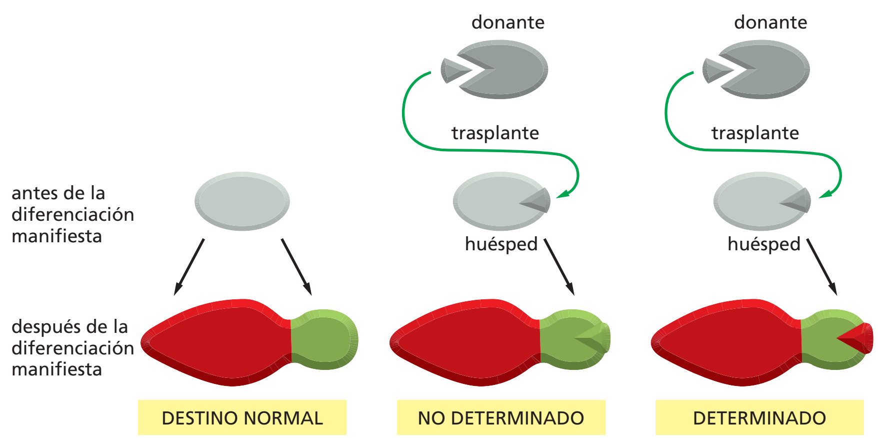


Figura 22–7 Test estándar para la determinación celular.

de una célula determinada en un embrión que se desarrolla normalmente. Por ejemplo, la célula podría estar destinada a morir, o a convertirse en una neurona, o formar parte de un órgano como el pie o producir una progenie diseminada por todo el cuerpo. No obstante, conocer el **destino celular**, en este sentido, es no conocer casi nada sobre el carácter intrínseco de la célula. Como máximo, la célula destinada a convertirse, por ejemplo, en una neurona podría estar especializada de antemano de tal forma que existiera plena garantía de que será una neurona con independencia de las perturbaciones de su entorno; esta célula se dice que está **determinada** a su destino. La situación extrema opuesta a la anterior sería que la célula fuera bioquímicamente idéntica a otras células con destinos distintos, la única diferencia entre ellas sería su localización, la cual determinaría la exposición de las células a distintas influencias en un futuro.

Se puede examinar el estado de determinación de una célula trasplantándola a un entorno alterado (**Figura 22–7**). Una de las conclusiones más importantes de la embriología experimental ha sido que, gracias a la memoria celular, una célula puede convertirse en determinada mucho antes de que muestre algún signo externo evidente de diferenciación.

Entre los dos extremos de una célula plenamente determinada y una indeterminada por completo hay un amplio espectro de posibilidades. Por ejemplo, una célula puede estar ya algo especializada para su destino normal, con una fuerte tendencia a desarrollarse en tal dirección, pero ser todavía capaz de cambiar y experimentar un destino distinto si se coloca en un entorno coercitivo. Algunos biólogos del desarrollo describían esta célula como una célula *especificada* o *comprometida*, pero todavía no determinada. También puede darse el caso de que una célula esté determinada, por ejemplo, a convertirse en una célula del cerebro, pero todavía no esté determinada sobre si será un componente neuronal o glial. Parece ser que no es raro que células adyacentes del mismo tipo interaccionen y dependan unas de otras para mantener su carácter especializado, de forma que se comportan como determinadas cuando permanecen juntas, pero no si se aíslan de sus compañeras habituales.

Las células recuerdan valores posicionales que reflejan su localización en el cuerpo

En muchos sistemas, mucho antes de que las células queden comprometidas a diferenciarse en un tipo celular específico, han pasado a ser *regionalmente determinadas,* esto es, activan y mantienen la expresión de genes que se podrían considerar marcadores de una localización o región del cuerpo. Este carácter, específico de posición de una célula, se llama **valor posicional** y sus efectos se manifiestan en el tipo de comportamiento de la célula en los estadios subsiguientes de la formación del patrón corporal.

El desarrollo de la pata y el ala del pollo constituye un ejemplo notable de ello. Tanto la pata como el ala de un adulto están formados por músculos, huesos, piel, etc., con una distribución de tejidos diferenciados que es casi exactamente igual en ambos casos. La distinción entre las dos extremidades no está en los tipos de tejidos sino en la forma en que estos se distribuyen en el espacio. ¿Cómo se llega a esta diferencia?

En el embrión de pollo, la pata y el ala se originan casi al mismo tiempo, en unas yemas lingüiformes que sobresalen del costado. Al principio, las células de los dos pares de yemas tienen un aspecto similar y son uniformemente indiferenciadas. Pero un experimento

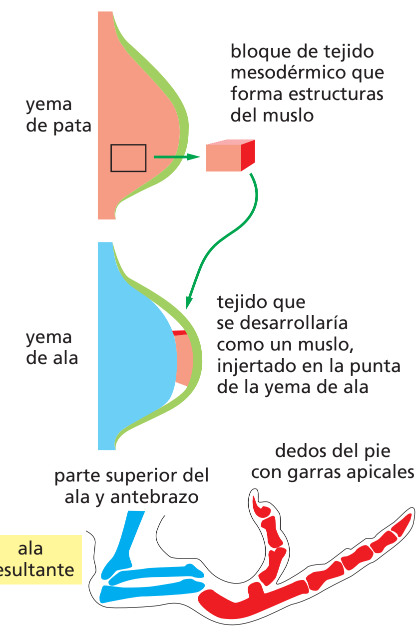


Figura 22–8 Un tejido, que se desarrollaría como un muslo, al ser injertado en la punta de la yema de un ala de pollo da lugar a dedos del pie. (Según J.W. Saunders et al., *Dev. Biol.* 1:281-301,1959. Con autorización de Academic Press.)



Figura 22–9 Embrión de pollo a los 6 días de incubación, mostrando las yemas de las extremidades teñidas mediante hibridación *in situ* con sondas que detectan la expresión de los genes *Tbx4* y *Tbx5* y *Pitx1*, que codifican proteínas relacionadas con la regulación de genes. Las células que expresan *Tbx5* formarán un ala; las que expresan *Tbx4* y *Pitx1* formarán una pata. Cuando *Pitx1* se expresa erróneamente de forma artificial en la yema de un ala, hace que la extremidad se desarrolle con características de pata. (Cortesía de Malcolm Logan.)

muy sencillo demuestra que esta apariencia de similitud es engañosa. Se puede cortar un trozo pequeño de tejido indiferenciado de la base de una yema de pata, a partir de la región que daría lugar al muslo, y luego injertarse en la punta de la yema del ala. Sorprendentemente, el injerto no desarrolla la parte apropiada de la punta del ala, ni tampoco un trozo de tejido de muslo, sino un dedo del pie (**Figura 22–8**). Este experimento demuestra que las células de la yema de pata están ya determinadas a ser una pata, pero no están aún comprometidas de forma irreversible a formar una parte concreta de la pata: todavía pueden responder a las indicaciones de la yema de ala, de forma que pueden dar lugar a estructuras más apropiadas a la parte distal que a la base. El sistema de señales que controla las diferencias entre las partes de una extremidad es en apariencia el mismo, tanto para la pata como para el ala. La diferencia entre las dos extremidades resulta de una diferencia en el estado interno de las células respectivas al principio del desarrollo de la extremidad.

En los vertebrados, la diferencia del valor posicional entre las células de los miembros anteriores y la de los posteriores corresponde a la expresión de distintos grupos de genes que codifican proteínas reguladoras; se cree que estas proteínas son las responsables de que las células de cada yema se comporten de modo distinto (**Figura 22–9**). Más adelante, en este mismo capítulo, se explicará cómo empieza el siguiente nivel de diseño, que es más detallado, en una determinada yema de extremidad.

Mediante señales inductoras se generan, de una manera ordenada, diferencias entre células inicialmente idénticas

En cada una de las etapas del desarrollo, una célula embrionaria goza de un número limitado de opciones según el estadio que haya alcanzado. Durante el desarrollo, esta célula viaja por una ruta que se ramifica repetidamente. En cada ramificación ha de tomar decisiones y es la secuencia de estas decisiones la que determina su destino final. De esta forma se origina un sistema complejo de tipos celulares.

Para comprender el desarrollo hemos de saber cómo se ejerce el control sobre cada una de las decisiones y cómo influyen las opciones tomadas previamente. El problema podría reducirse a una sencilla pregunta: ¿cómo llegan a ser distintas dos células con el mismo genoma, pero separadas espacialmente?

El método más habitual de obtener células diferenciadas es exponerlas a diferentes condiciones ambientales; las inducciones más importantes que ejerce el entorno en las células embrionarias son las señales que proceden de las células vecinas. Por lo tanto, en el modelo que es probablemente el más común, cuando un grupo de células con el mismo potencial de desarrollo inicial recibe una señal de las células de fuera del grupo, el resultado es que uno o más miembros de este grupo entra en una vía de desarrollo que conduce a un carácter distinto. Este proceso se llama **interacción inductiva**. Por lo general, la señal está limitada en espacio y tiempo, de forma que sólo un subgrupo de las células competentes (aquellas que están más cerca del origen de la señal) toman el carácter inducido (**Figura 22–10**).

Algunas señales inductoras son de corto alcance (sobre todo las que se transmiten por contacto célula-célula); otras son de largo alcance, mediadas por moléculas capaces de difundir a través del medio extracelular. El grupo de células inicialmente competentes que responden a la señal a veces se denomina *grupo de equivalencia* o *campo morfogénico*. Este grupo puede consistir sólo en dos células o en millares de células; el número de las que pueden ser inducidas varía según la magnitud y la distribución de la señal.

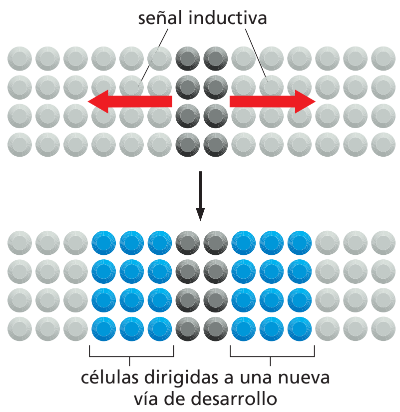


Figura 22–10 Señalización inductiva.

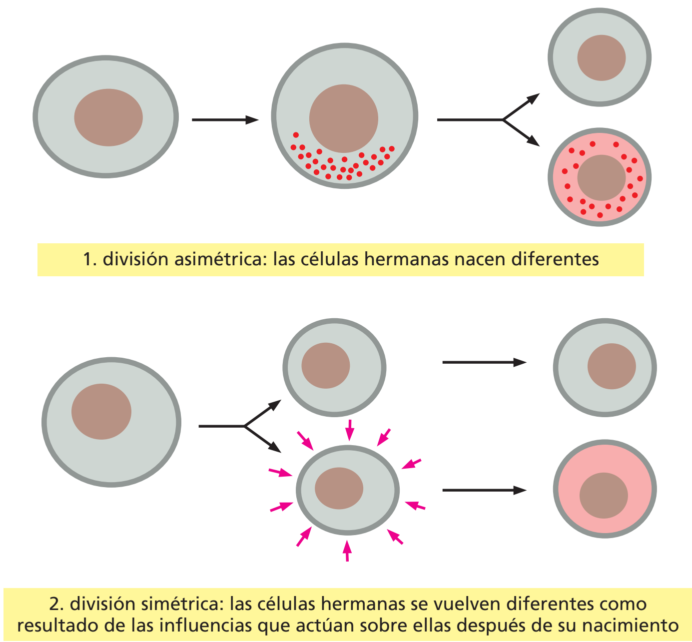


Figura 22–11 **Dos vías de formación de células hermanas diferentes.**

Una división celular asimétrica puede dar lugar a células hermanas diferentes

La diversificación celular no siempre depende de señales extracelulares; en algunos casos, nacen células hermanas que son diferentes como resultado de una **división asimétrica**, durante la cual se reparte de forma desigual entre las dos células un grupo significativo de moléculas. La molécula o grupo de moléculas segregadas asimétricamente actúan como *determinantes* del destino de una de las células y alteran de forma directa o indirecta el modelo de expresión génica de la célula hija que la recibe (**Figura 22–11**).

Las divisiones asimétricas ocurren a menudo al principio del desarrollo, cuando el huevo fecundado se divide y produce células hijas con distintos destinos, pero también pueden ocurrir en etapas posteriores, como por ejemplo durante la génesis de las células nerviosas.

La retroalimentación positiva genera asimetría donde antes no la había

La señalización inductora y la división celular asimétrica representan dos estrategias distintas que dan como resultado diferencias significativas entre las células. No obstante, los dos procesos presuponen algún tipo de asimetría anterior en el sistema: la fuente de la señal inductora tiene que estar localizada de manera que algunas células reciban la señal con fuerza y otras no; o bien la célula madre antes de dividirse ya ha de tener una asimetría interna. Muy a menudo, la historia del sistema asegura que algunas de estas asimetrías estén presentes. Pero ¿qué ocurre cuando no es así, o cuando la asimetría inicial es muy leve?

La respuesta está en la **retroalimentación positiva**: gracias a ella un sistema que empieza siendo homogéneo y simétrico puede modelarse a sí mismo de manera espontánea, aunque no exista ninguna señal externa organizada. Y ocurre con frecuencia que, donde el entorno o las condiciones iniciales imponen alguna asimetría incipiente y débil pero definida, la retroalimentación positiva permite magnificar el efecto y generar un patrón maduro.

Para ilustrar la idea, consideremos un par de células adyacentes que empiezan en un estado similar y que pueden intercambiar señales influyendo una en el comportamiento de la otra (**Figura 22–12**). La célula que más sustancia X produce, que más indicaciones envía a su vecina para que ésta inhiba la producción de X. Este tipo de interacción célula a célula se llama *inhibición lateral* y origina un circuito de retroalimentación positiva que tiende a amplificar cualquier diferencia inicial entre las dos células. Tal diferencia puede surgir a partir de un sesgo impuesto por algún factor externo anterior o se podría originar simplemente por fluctuaciones al azar o “ruido”, una característica inevitable de los circuitos de control

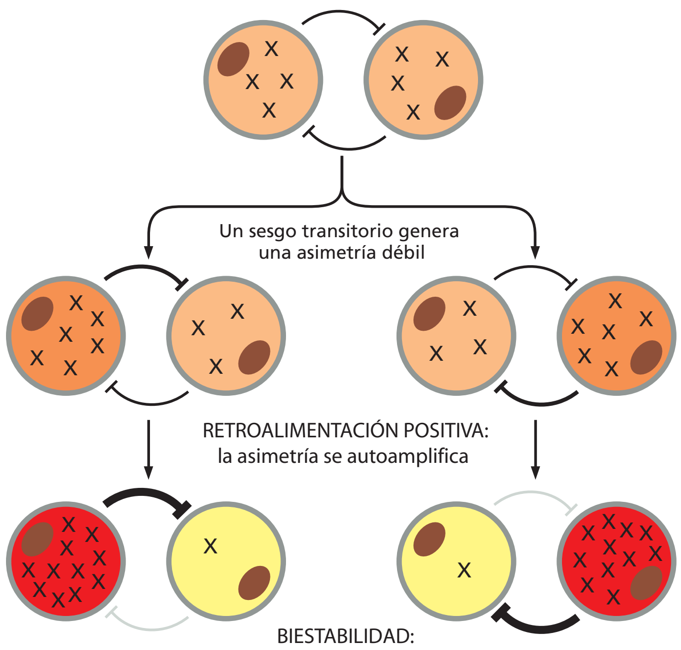


Figura 22–12 Génesis de asimetría por retroalimentación positiva. En este ejemplo dos células interactúan entre sí de forma que cada una de ellas produce una sustancia X que actúa sobre la otra célula inhibiendo la produción de X, un efecto conocido como inhibición lateral. Un aumento de X en una de las células conduce a una retroalimentación positiva que tiende a incrementar X aún más en esta célula y a disminuir X en la célula vecina. Este hecho puede generar una inestabilidad desbocada, y provocar que las dos células se vuelvan radicalmente diferentes. En último término, el sistema acaba por quedarse en uno u otro de los dos estados estables opuestos. La elección final de uno de los estados representa una forma de memoria: la pequeña influencia que inicialmente dirigió la elección, ya no es necesaria para que el estado se mantenga.

genético tratados en el Capítulo 7. En cualquier caso, la inhibición lateral significa que si una célula n.º 1 produce un poco más de X, será la causa de que la célula n.º 2 produzca menos; y como la célula n.º 2 produce menos X, entonces transmite menos inhibición a la célula n.º 1 y de esta forma permite que la cantidad de X en la célula n.º 1 aumente todavía más; y así podría continuar hasta alcanzar un estado estacionario en el cual la célula n.º 1 contenga mucho X y la célula n.º 2 muy poco.

Los análisis matemáticos muestran que este fenómeno depende de la fuerza del efecto de la inhibición lateral: si es muy débil, las fluctuaciones van desapareciendo y no tiene ningún efecto duradero, pero si es bastante fuerte y brusco, las fluctuaciones se irán amplificando aceleradamente hasta romper la simetría inicial entre las dos células. A menudo en la inhibición lateral interviene el intercambio de señales por contacto célula-célula por la vía de señalización Notch (como se explicó en el Capítulo 15), que es un mecanismo común de diferenciación celular en tejidos animales que permite a las células especializarse de distintos modos.

La retroalimentación positiva genera patrones, respuestas de todo o nada y proporciona memoria

Procesos similares de retroalimentación pueden actuar en series más grandes de células y generar muchos tipos de modelos espaciales. Por ejemplo, una sustancia A (un activador de corto alcance) podría estimular su propia producción en las células que la contienen y en sus vecinas más próximas y, al mismo, tiempo inducirlas a producir una señal H (un inhibidor de largo alcance) que difundiera rápidamente e inhibiera la producción de A en las células situadas en un lugar más alejado. Si todas las células empiezan al mismo ritmo pero un grupo de ellas gana una pequeña ventaja fabricando un poco más de A que el resto, entonces la asimetría se autoamplifica. La activación de corto alcance combinada con la inhibición de largo alcance podrían dar lugar a la formación de grupos de células en el interior de un tejido homogéneo que se especializarían como *centros de señales* localizados.

Por otro lado, la retroalimentación positiva también puede ser un instrumento mediante el que una célula individual se transforma de forma espontánea en polarizada e internamente asimétrica, mediante sistemas de señales intracelulares que permiten que una asimetría inicialmente débil se autoamplifique.

Ciertos principios generales se ponen en práctica gracias a éstas y otras muchas variaciones sobre el tema de la retroalimentación positiva. En cada uno de los ejemplos descritos la retroalimentación positiva lleva a una *rotura de la simetría,* y ésta se comporta como un fenómeno de *todo o nada*. Si la retroalimentación se encuentra por debajo de un cierto um-

bral, las células quedan esencialmente iguales. Pero si se halla por encima, entonces sufren una diferenciación súbita. Por encima de este umbral el sistema es *biestable* o *multiestable*, es decir, oscila hacia uno u otro de los dos o más estados posibles, según cuál sea la célula (o cuál de los dos extremos de una sola célula) que gana la ventaja inicial.

La elección de uno de los resultados alternativos puede venir determinada por una señal externa que confiere a una de las células una pequeña ventaja inicial. Pero cuando ha actuado la retroalimentación positiva, esta señal externa es ya irrelevante. La rotura de la simetría, una vez establecida, es difícil que revierta; la retroalimentación positiva hace que el estado asimétrico escogido se automantenga, incluso después de que la señal que ha iniciado el proceso haya desaparecido. De esta forma, la retroalimentación positiva proporciona al sistema una *memoria* de señales pasadas.

Todos estos efectos de la retroalimentación positiva (rotura de la simetría, respuestas todo o nada, biestabilidad y memoria) van siempre juntos y los encontramos una y otra vez en los organismos en desarrollo. Son fundamentales en la producción de modelos celulares estables y delineados con precisión.

Un pequeño grupo de vías de señalización, utilizado de forma repetida, controla el patrón de desarrollo

¿Qué son, pues, las moléculas que actúan como señales y coordinan la formación del patrón de desarrollo en un embrión, ya sea generando asimetría *de novo* o como inductoras de centros de señales establecidas controlando la diversificación de las células vecinas? En principio, cualquier clase de molécula extracelular podría servir. En la práctica, la mayoría de los casos inductivos bien conocidos en el desarrollo animal están gobernados sólo por unas cuantas familias de proteínas señal altamente conservadas, que se reutilizan una y otra vez en diferentes contextos y situaciones. El descubrimiento de este vocabulario limitado que utilizan las células en sus comunicaciones durante el desarrollo ha tenido lugar recientemente y constituye uno de los grandes hallazgos que más ha simplificado la biología del desarrollo. En la **Tabla 22–1** se muestran las seis familias principales de proteínas señal que sirven como inductoras del desarrollo animal. Los detalles de los mecanismos intracelulares por los cuales actúan estas moléculas se han explicado en el Capítulo 15.

El resultado final de la mayoría de los fenómenos inductivos es un cambio en la transcripción del DNA celular, activándose algunos genes y desactivándose otros. Diferentes moléculas señal activan clases distintas de proteínas que intervienen en la regulación génica. Además, el efecto activador de una determinada proteína reguladora dependerá de cuáles son las otras proteínas reguladoras presentes en la célula, ya que por lo general actúan en combinación. Como resultado de ello, diferentes tipos de células responderán de forma distinta a una misma señal en otro momento. La respuesta dependerá tanto de las otras proteínas reguladoras que estén presentes antes de que llegue la señal como de otras señales

Tabla 22–1 Algunas proteínas señal que intervienen una y otra vez como inductores en el desarrollo animal

VÍA SEÑALIZADORA	FAMILIA DE LIGANDOS	FAMILIA DE RECEPTORES	INHIBIDORES/MODULADORES EXTRACELULARES
Receptor tirosina quinasa (RTK)	EGF	receptores EGF	Argos
	FGF (Branchless)	receptores FGF (Breathless)	
	Efrinas	receptores Eph	
Superfamilia TGFβ	TGFβ	receptores TGFβ	cordina (Sog), noguina
	BMP (Dpp)	receptores BMP	
	Nodal		
Wnt	Wnt (Wingless)	Frizzled	Dickkopf, Cerberus
Hedgehog	Hedgehog	Patched, Smoothened	
Notch	Delta	Notch	Fringe

Solo se han enumerado las más representativas de cada clase, principalmente las mencionadas en este capítulo. Los nombres peculiares para *Drosophila* se muestran entre paréntesis. Muchos de los componentes listados tienen varios homólogos que se distinguen con números (FGF1, FGF2, etc.) o con sobrenombres (Sonic hedgehog, Lunatic fringe). Otras vías de señalización, como JSK/STAT, receptor de la hormona nuclear y las vías con receptor acoplado a proteína G también desempeñan un papel importante en algunos procesos de desarrollo.

que la célula esté recibiendo en el mismo momento, hecho que refleja que la célula recuerda las señales recibidas previamente.

Los morfógenos son inductores de largo alcance que ejercen efectos graduales

Parece ser que las moléculas señal gobiernan decisiones del tipo sí o no, dando una u otra respuesta en función de si su concentración es alta o baja. La retroalimentación positiva es capaz de producir respuestas celulares de todo o nada, de manera que cuando la señal tiene una intensidad por debajo de un cierto punto crítico se obtiene un resultado y cuando se sitúa por encima de este punto otro resultado distinto. Sin embargo, en muchos casos las respuestas son más graduales; por ejemplo, una concentración alta puede dirigir las células objetivo hacia una vía de desarrollo, mientras que una concentración intermedia las dirigiría hacia otra vía y una concentración baja hacia otra distinta. Un caso importante es el que tiene lugar cuando la molécula señal difunde a partir de un centro de señales localizado y genera un gradiente de concentración. Las células que se encuentran a diferentes distancias del origen de la señal quedan inducidas a seguir una variedad de vías distintas, según la concentración de señal que experimentan.

Una molécula que impone un patrón a un conjunto de células, de la forma que hemos descrito, se llama **morfógeno**. Las extremidades de los vertebrados proporcionan un ejemplo llamativo al respecto: un grupo de células situadas a un lado de la yema embrionaria de la extremidad se especializa en centro de señales y segrega la proteína Sonic hedgehog (un miembro de la familia de moléculas señal hedgehog). Esta proteína difunde desde su origen formando un *gradiente morfogénico* que controla los caracteres de las células a lo largo del eje pulgar-meñique de la yema. Si se injerta en el lado opuesto de la yema otro grupo de células señal, se produce una duplicación quiral del patrón de los dedos (**Figura 22–13**).

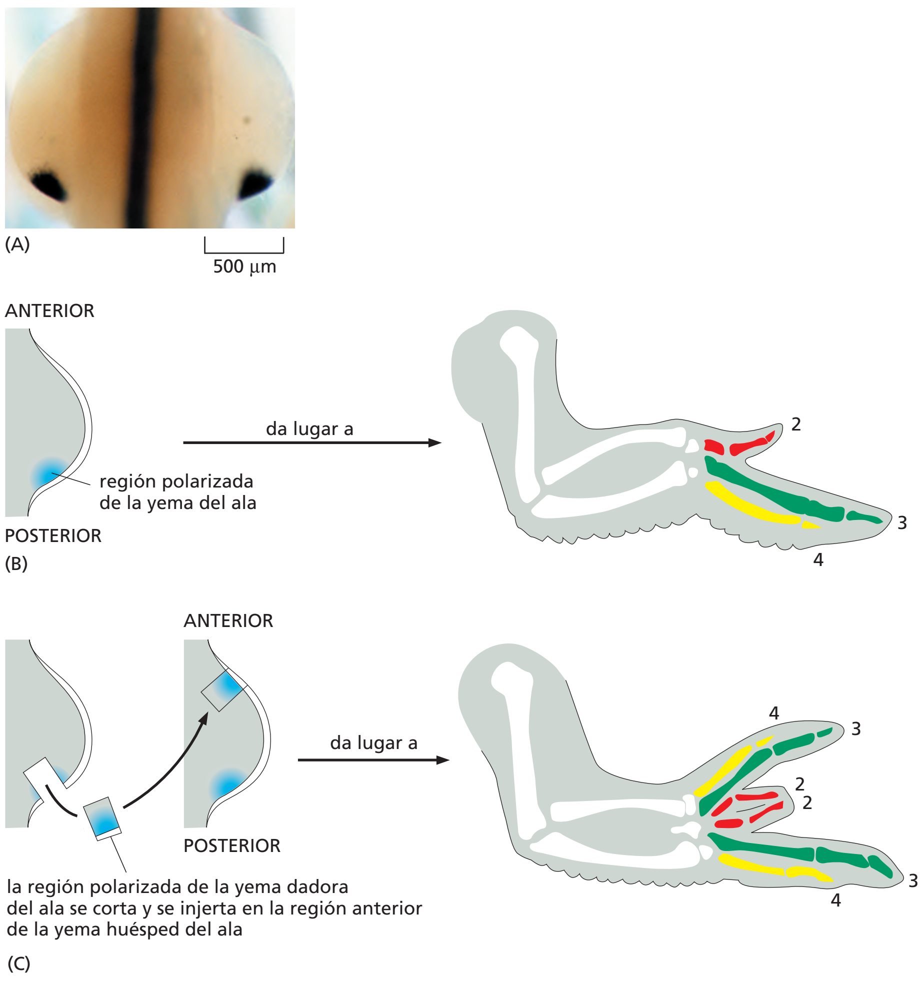


Figura 22–13 Sonic hedgehog como morfógeno en el desarrollo de las extremidades del pollo. (A) Expresión del gen Sonic hedgehog en un embrión de pollo de 4 días, mostrado mediante hibridación *in situ* (vista dorsal del tronco al nivel de las yemas de las alas). El gen se expresa en la línea media del cuerpo y en el borde posterior (la región polarizada) de cada una de las yemas de las alas. La proteína Sonic hedgehog difunde desde estos lugares donde se sintetitza. (B) Desarrollo normal del ala. (C) Un injerto de tejido procedente de la región polarizada causa una duplicación simétrica del patrón del ala huésped. Parece que el tipo de dedo que se desarrolla está determinado por la concentración local de la proteína Sonic hedgehog, por lo que se forman diferentes tipos de dedos (señalados por 2, 3 y 4) según su distancia a la fuente de Sonic hedhehog. (A, cortesía de Randall S. Johnson y Robert D. Riddle.)

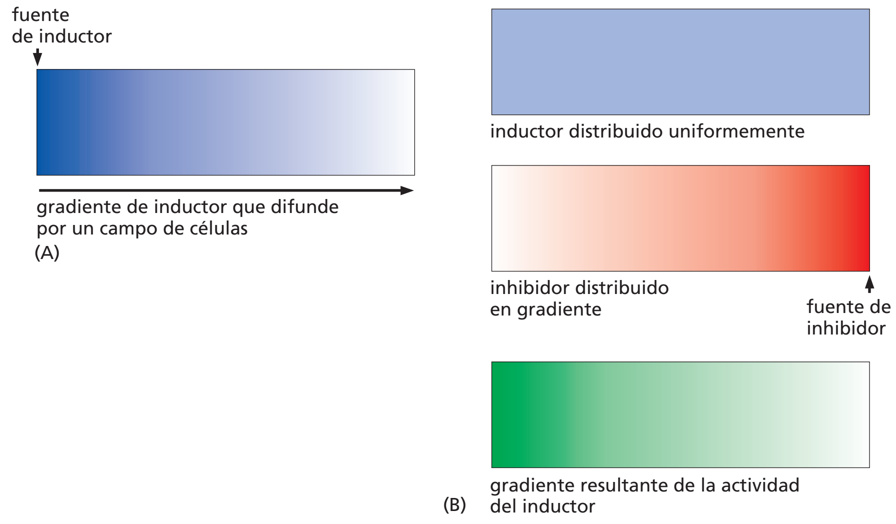


Figura 22–14 Dos sistemas mediante los cuales se puede generar un gradiente de morfógeno. (A) Mediante la producción localizada de un inductor, un morfógeno, que difunde desde su fuente. (B) Mediante la producción localizada de un inhibidor que difunde desde su fuente y bloquea la acción de un inductor distribuido uniformemente.

Inhibidores extracelulares de las moléculas señal modelan la respuesta del inductor

Es en especial importante limitar la acción de la señal de las moléculas que actúan a distancia, así como su producción. Muchas proteínas señal tienen antagonistas extracelulares que pueden inhibir su función. Por lo general estas sustancias son proteínas que se unen a la señal o a su receptor e impiden que tenga lugar una interacción productiva.

Un número sorprendentemente elevado de las decisiones tomadas en el desarrollo se regulan en realidad por inhibidores más que por la molécula que ejerce la señal primaria. El sistema nervioso de un embrión de rana surge de un banco de células que es competente para formar tanto tejido nervioso como epidérmico. Un tejido inductor libera la proteína cordina y favorece la formación de tejido nervioso. La cordina no tiene ningún receptor específico. Al contrario, es un inhibidor de proteínas señal de la familia BMP/TGFβ, las cuales inducen el desarrollo epidérmico y se hallan a lo largo de la región neuroepitelial, que es donde se forman las neuronas y la epidermis. Por lo tanto, la inducción a tejido nervioso se realiza gracias a un gradiente de inhibición de una señal antagónica (**Figura 22–14**).

Las señales del desarrollo pueden difundir por el tejido de diferentes maneras

Parece que muchas señales del desarrollo se propagan a través de los tejidos mediante difusión simple entre los espacios intercelulares. Si un grupo especializado de células produce una molécula señal a un ritmo constante, y este morfógeno se va degradando mientras difunde, se formará un gradiente uniforme que tendrá un máximo en el origen. La velocidad de difusión y la vida media del morfógeno determinan la pendiente del gradiente (**Figura 22–15**).

Este sencillo mecanismo se puede modificar de muchas maneras a fin de ajustar la forma y la pendiente del gradiente. A lo largo de su camino, el morfógeno puede ser atrapado por receptores de superficie, causando así su degradación por endocitosis, con lo cual se acorta su vida media efectiva. También puede ocurrir que se asocie a moléculas de la matriz extracelular, reduciéndose así su tasa de difusión efectiva. En algunos casos, parece que el morfógeno entra en las células por endocitosis y más tarde es excretado para ser atrapado y excretado de nuevo por otras células, de manera que la señal se propaga a través de una ruta principalmente intracelular.

Existe otro mecanismo de propagación de señales que se realiza mediante finos filópodos o *citonemas* que se extienden más allá de unas cuantas células desde algunos tejidos epiteliales. Una célula puede enviar citonemas que entran en contacto con otras más alejadas, tanto para transmitir como para recibir señales de ellas. De esta forma una célula puede por ejemplo generar una inhibición lateral vía Notch a un conjunto extenso de células vecinas.

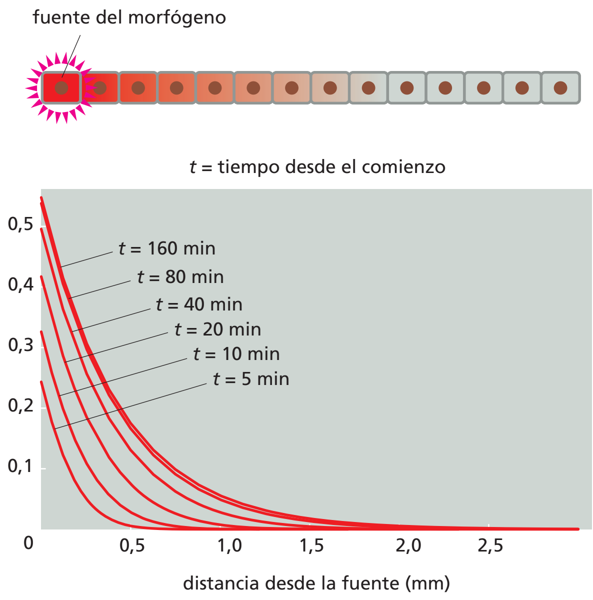


Figura 22–15 Formación de un gradiente de señal mediante difusión. Las gráficas muestran estadios sucesivos en el establecimiento de un gradiente de concentración de una molécula señal producida en el origen a velocidad mantenida, desde el momento 0. La molécula se degrada a medida que difunde desde la fuente, y se genera un gradiente de concentración con un máximo en esta fuente. Las gráficas se han calculado asumiendo que la difusión tiene lugar en un sentido en el espacio, que la molécula tiene una semivida $t_{1/2}$ de 20 minutos y que difunde con una constante de difusión $D = 0{,}4\ mm^2\ h^{-1}$, típica de una molécula pequeña de proteína (30 kilodaltons). Nótese que al cabo de una hora el gradiente ya ha alcanzado el estado estacionario y que la concentración en el estado estacionario (tiempos largos) disminuye exponencialmente con la distancia.

Los programas intrínsecos de una célula definen la temporización de su desarrollo

Los tipos de señales a los que nos hemos referido tienen un papel importante en la temporización de las etapas del desarrollo, pero sería erróneo pensar que todos los cambios necesitan una señal inductiva que los desencadene. Muchos de los mecanismos que alteran el carácter celular son intrínsecos a la propia célula y no requieren indicación alguna que provenga de su alrededor; la célula seguirá su programa aunque permanezca en un entorno sin cambios. En muchos casos podemos sospechar la duración del proceso de desarrollo se controla por algún mecanismo de este tipo. Por ejemplo, en un ratón las células progenitoras de la corteza cerebral se dividen y generan neuronas durante tan sólo 11 ciclos celulares, mientras que en el mono lo hacen aproximadamente en 28 ciclos y después paran. En las distintas etapas de este programa se generan tipos distintos de neuronas, lo que sugiere que mientras la célula progenitora envejece, cambia las especificaciones que suministra a las hijas.

En el contexto de un embrión intacto resulta difícil demostrar que esta serie de sucesos es estrictamente el resultado de un proceso cronorregulador autónomo, ya que el entorno celular está cambiando. Sin embargo, experimentos realizados con células en cultivo ofrecen una evidencia clara. Por ejemplo, las células progenitoras de la glía, aisladas del nervio óptico de una rata de 7 días y cultivadas bajo condiciones constantes en un medio apropiado, continúan proliferando durante un tiempo limitado (que corresponde a un máximo de unos 7 ciclos de división celular) y luego se diferencian en oligodendrocitos (las células gliales que forman las cubiertas de mielina alrededor de los axones en el cerebro), ajustándose a un horario similar al que habrían seguido si se hubiesen dejado en su sitio en el embrión.

Todavía no se conocen los mecanismos moleculares subyacentes de estos cambios tan lentos del estado interno de las células, que siguen funcionando durante días, semanas, meses e incluso años. Una posibilidad es que reflejen cambios progresivos en el estado de la cromatina (como se ha descrito en el Capítulo 4).

Los mecanismos que controlan la temporización de los procesos más rápidos, aunque se conocen poco, no son ningún misterio. Más adelante explicaremos un ejemplo sobre el oscilador de expresión génica, conocido como *reloj de segmentación*, que gobierna la formación de los somitas (rudimentos de las vértebras, costillas y músculos asociados) en los embriones de los vertebrados.

Los patrones iniciales se establecen en pequeños campos de células, se perfeccionan por inducción secuencial y el embrión crece

Por lo general, la señales que organizan el modelo espacial de un embrión actúan a distancias cortas y gobiernan decisiones relativamente sencillas. Por ejemplo, un morfógeno con un radio de acción inferior a 1 mm, que se considera una tasa de difusión efectiva (véase la

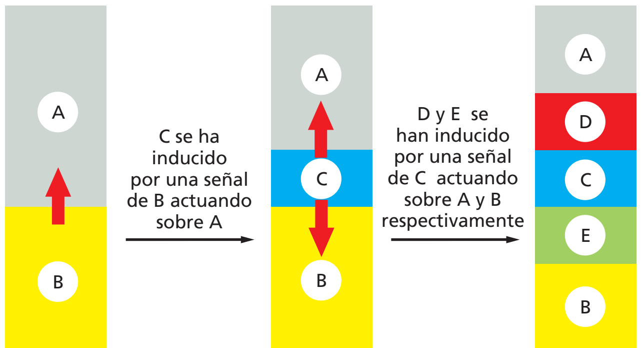


Figura 22–16 Diseño mediante inducción secuencial. Una serie de interacciones inductivas pueden generar muchos tipos celulares a partir de un número muy reducido de ellos.

Figura 22–15), induce a las células sobre las que actúa a elegir entre unas cuantas opciones de desarrollo. No obstante, los órganos que al final se desarrollan son mucho más grandes y mucho más complejos.

La proliferación celular que sigue a la especificación inicial explica el aumento de tamaño, mientras que el perfeccionamiento del modelo se explica por una serie de inducciones locales que van puliendo los niveles sucesivos de detalle sobre un esbozo inicialmente sencillo. En el momento en que están presentes dos tipos celulares, uno de ellos puede producir un factor que induzca a un subgrupo de células vecinas a especializarse en un tercer tipo. Éste puede a su vez devolver la señal a los otros dos tipos de células cercanas, generando un cuarto y un quinto tipo celular, etc. (**Figura 22–16**).

Esta estrategia que genera un modelo progresivamente más complicado recibe el nombre de **inducción secuencial**. Es sobre todo a través de este mecanismo que el esquema corporal de un animal en desarrollo, una vez formado un esbozo en pequeño, pasa a elaborarse con detalles más precisos conforme avanza el desarrollo.

En las secciones que siguen en este capítulo se centrará la atención en una pequeña selección de organismos modelo y veremos cómo actúan, en la práctica, los principios esquematizados en esta primera sección. Empezaremos con el análisis del nematodo *Caenorhabditis elegans*.

Resumen

Los cambios evidentes en el comportamiento celular que observamos a medida que se va desarrollando un organismo pluricelular son los signos externos de una compleja ordenación molecular que depende de la memoria celular. Esta ordenación tiene lugar en el interior de las células a medida que reciben y procesan señales de sus vecinas y emiten señales respuesta. Por tanto, el modelo final de tipos celulares diferenciados es el resultado de un programa encubierto de especialización celular. El programa actúa sobre los variados modelos de expresión de las proteínas reguladoras, confiriendo a cada célula diferentes potencialidades mucho antes de que empiece la diferenciación terminal. Los biólogos del desarrollo, mediante experimentos genéticos y de microdisección, pretenden descifrar este programa y relacionarlo con las señales intercambiadas entre las células mientras proliferan, interactúan y se desplazan.

Animales tan distintos como gusanos, moscas y humanos utilizan conjuntos de proteínas muy similares para controlar su desarrollo; por lo tanto, lo que descubrimos en un organismo a menudo nos da una idea de lo que sucede en los otros. Diferentes organismos utilizan en multitud de ocasiones y en situaciones distintas, unas cuantas vías de señalización célula-célula evolutivamente bien conservadas, que regulan la formación de un modelo pluricelular organizado. En un embrión, la mayor parte de las diferencias del esquema corporal derivan de diferencias en el DNA regulador asociado a cada gen. Este DNA tiene un papel clave en la definición del programa secuencial de desarrollo, desencadenando la acción de los genes en momentos y lugares específicos, según el patrón de expresión presente en cada célula en la etapa anterior del desarrollo.

Las diferencias entre las células de un embrión pueden surgir de varios modos. La retroalimentación positiva puede llevar a una rotura de la simetría generando una diferencia radical y permanente entre células inicialmente casi idénticas. También pueden nacer células hermanas distintas como resultado de una división celular asimétrica. Otra forma de diferenciación de un grupo de células inicialmente similares es la exposición a señales inductoras emitidas por células externas al grupo; los inductores de largo alcance, con efectos graduales, llamados morfógenos, son capaces de organizar un patrón complejo. Gracias a la memoria celular, estas señales transitorias pueden

tener un efecto duradero en el estado interno de la célula, convirtiéndola en determinada para un destino concreto. Por un método o por otro, las señales sencillas que actúan sobre series de células en distintos momentos y lugares, dan lugar a los organismos pluricelulares complejos y variados que pueblan el mundo que nos rodea.

CAENORHABDITIS ELEGANS: SU DESARROLLO DESDE LA PERSPECTIVA DE LA CÉLULA INDIVIDUAL

El nematodo *Caenorhabditis elegans* es un pequeño organismo, relativamente sencillo y perfectamente estructurado. Se ha descrito la anatomía de su desarrollo con un detalle extraordinario y se ha podido establecer el linaje exacto de cada una de las células que componen su cuerpo. También se conoce la secuencia completa de su genoma y se han analizado numerosos fenotipos de mutantes determinando sus funciones génicas. Es el animal pluricelular ideal para poder entender su desarrollo en términos de control genético.

Las comparaciones entre secuencias de DNA indican que, aunque los linajes de los nematodos, de los insectos y de los vertebrados se separaron más o menos al mismo tiempo, el ritmo del cambio evolutivo en el linaje de los nematodos ha sido sustancialmente mayor: sus genes, su estructura corporal y sus estrategias de desarrollo son más divergentes que las de los humanos y las de *Drosophila*. No obstante, a nivel molecular muchos de estos mecanismos son similares a los de los insectos y vertebrados, y están gobernados por sistemas homólogos de genes. Para saber cómo se desarrolla un ojo, una extremidad o el corazón, hemos de observarlo en otro organismo que no sea *C. elegans*, ya que éste carece de estos órganos. Pero a un nivel más fundamental es muy instructivo, ya que muestra las cuestiones básicas del desarrollo animal de una forma relativamente sencilla y permite interpretarlas en términos de funciones génicas y de comportamiento de células individuales concretas.

Caenorhabditis elegans es anatómicamente sencillo

El adulto de *C. elegans* se compone de 1000 células somáticas y entre 1000 y 2000 células germinales (959 núcleos de células somáticas y unas 2000 células germinales en un sexo; 1031 núcleos de células somáticas más unas 1000 células germinales en el otro sexo) (**Figura 22–17**). Se ha reconstruido su anatomía célula a célula mediante microscopía electrónica de cortes seriados. El esquema corporal de este gusano es muy sencillo: su cuerpo es alargado y de simetría bilateral, y está compuesto por los mismos tejidos básicos que aparecen en otros animales (nervios, músculos, tubo digestivo, piel), con la boca y el cerebro en el extremo anterior y el ano en el posterior. El tegumento exterior del cuerpo se compone de dos capas: la epidermis protectora y la capa muscular subyacente. Un tubo de células endodérmicas forma el intestino. Un segundo tubo situado entre el intestino y el tegumento exterior constituye la gónada, con las células germinales envueltas por una cubierta de células somáticas.

C. elegans tiene dos sexos: uno hermafrodita y el otro masculino. El hermafrodita se podría interpretar sencillamente como una hembra que produce una cantidad limitada de espermatozoides: se puede reproducir por autofecundación, utilizando su propio semen o

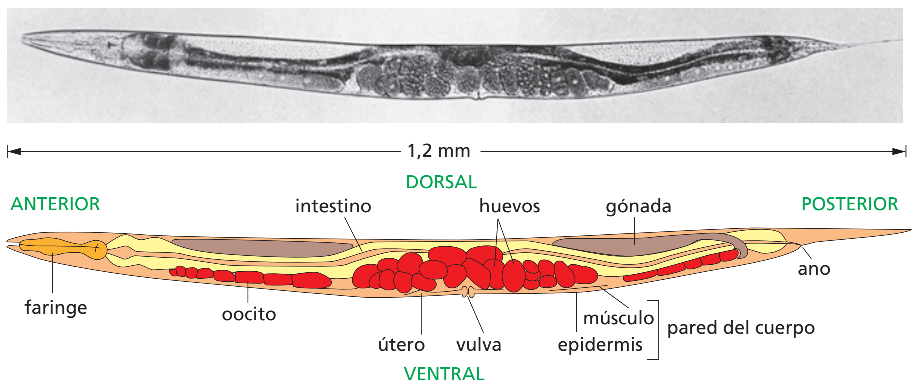


Figura 22–17 ***Caenorhabditis elegans***. Vista lateral de un adulto hermafrodita. (De J.E. Sulston y H.R. Horvitz, *Dev. Biol.* 56:110-156, 1977. Con la autorización de Academic Press.)

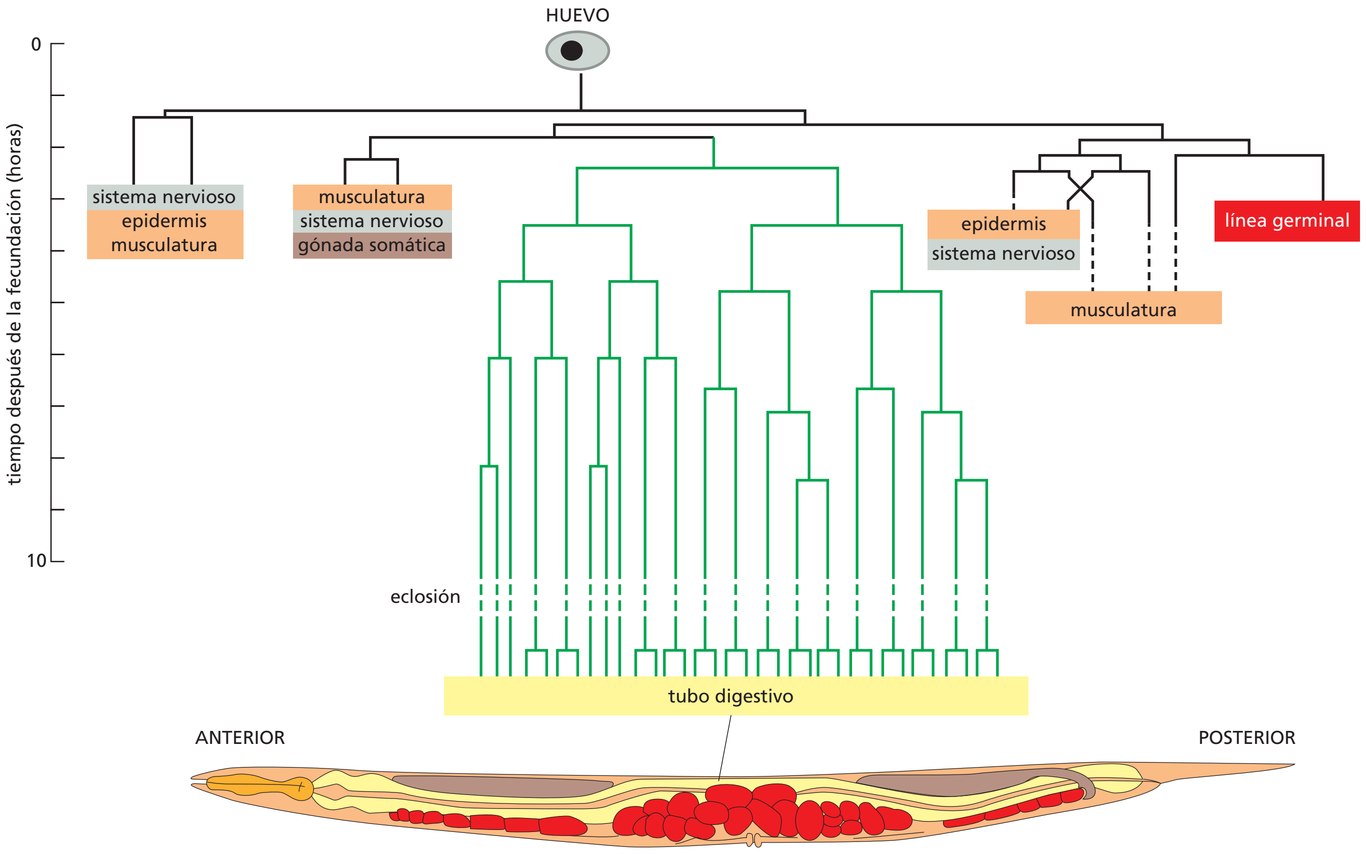


Figura 22–18 Árbol genealógico de las células del intestino de *C. elegans*. Nótese que aunque las células del tubo digestivo forman un solo clon (como las células de la línea germinal), las células de muchos otros tejidos no lo hacen. Las células nerviosas (no representadas en el dibujo del adulto, parte inferior de la figura) están agrupadas principalmente en ganglios cerca de los extremos anterior y posterior y en un cordón nervioso ventral que recorre todo el cuerpo del animal.

bien por fecundación cruzada, mediante la transferencia de espermatozoides masculinos a través de la cópula. Gracias a la autofecundación, un solo gusano heterocigoto engendra una prole homocigota. Esta es una característica importante que hace de *C. elegans* un organismo excepcionalmente útil para los estudios genéticos.

En el desarrollo de un nematodo, el destino celular se puede predecir casi perfectamente

C. elegans empieza su vida como una célula única, el huevo fecundado, que da lugar, tras repetidas divisiones celulares, a 558 células que forman un pequeño gusano en el interior de la cubierta del huevo. Después de eclosionar, las divisiones siguientes llevan al crecimiento y maduración sexual del gusano a través de sucesivas etapas larvarias, separadas por mudas. Después de la última muda, que lleva a la etapa adulta, el gusano hermafrodita empieza a producir sus propios huevos. La secuencia completa, de huevo a huevo, dura sólo unos tres días.

Mediante observación directa del animal en desarrollo, se ha cartografiado el linaje de todas las células, desde el huevo unicelular al adulto pluricelular. Una célula precursora concreta sigue el mismo patrón de divisiones en todos los individuos y, con muy pocas excepciones, el destino de cada célula descendiente se puede predecir a partir de su posición en el árbol genealógico (**Figura 22–18**).

Este grado de precisión estereotipada no se observa en el desarrollo de animales más grandes. A primera vista, sugiere que cada linaje del embrión del nematodo está programado para seguir un patrón de división y especialización celular de una forma rígida e independiente. Esto podría hacer pensar que el gusano no es un organismo representativo. No obstante, más adelante veremos que no es así, ya que, como en otros animales, el desarrollo depende de interacciones célula-célula, así como de procesos internos de las células individuales. El resultado es predecible casi a la perfección, simplemente porque el patrón de interacciones entre células es reproducible en gran medida y correlacionado de forma exacta con la secuencia de divisiones celulares.

Como en el caso de otros animales, en un gusano en desarrollo la mayoría de las células no están restringidas a generar una prole de un solo tipo diferenciado hasta un estadio avan-

zado del desarrollo; por lo general las células de un tipo particular, por ejemplo de músculo, derivan de varios precursores espacialmente dispersos que también pueden dar lugar a otros tipos celulares. En el gusano, las excepciones son el tubo digestivo y la gónada, cada uno de los cuales se forma a partir de una única *célula fundadora*; ésta aparece en la etapa de 8 células en el caso del tubo digestivo, y en el de 16 células, en el linaje de las células germinales o *línea germinal*. Pero en cualquier caso, la diversificación celular empieza temprano, en cuanto el huevo comienza a hendirse; es decir, mucho antes de la diferenciación terminal, las células pasan por una serie de estados intermedios de especialización, siguiendo diferentes programas según su localización y sus interacciones con las células vecinas. Pero, ¿cómo surgen estas diferencias tempranas entre las células?

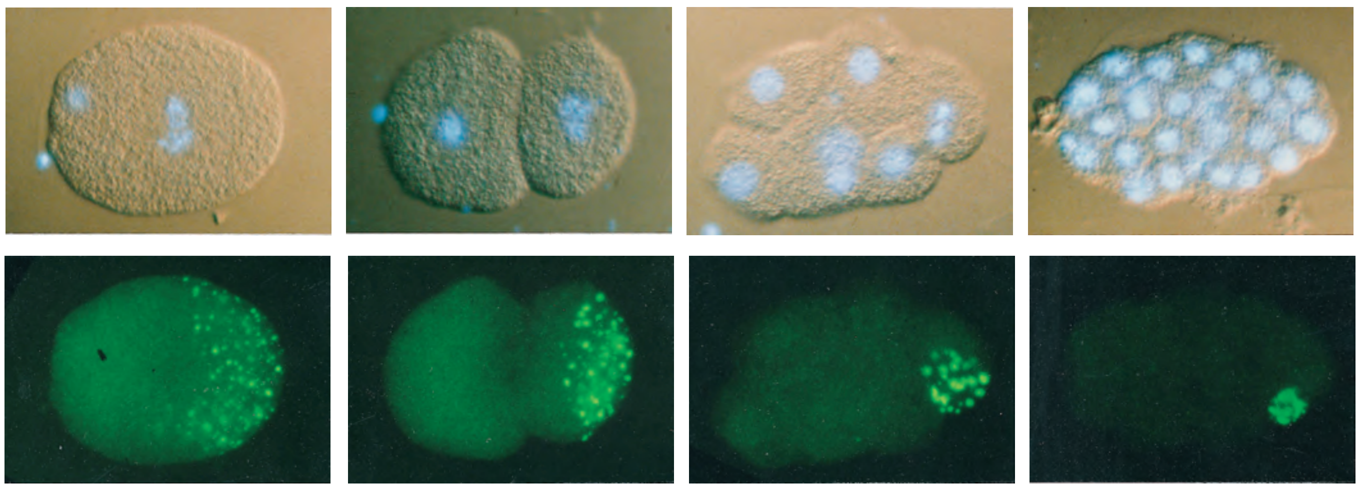
La división asimétrica del huevo se organiza mediante los productos de los genes de efecto materno

Este gusano es un ejemplo típico de entre muchos animales en la especificación temprana de las células que finalmente darán lugar a las células germinales (óvulos o espermatozoides). La línea germinal del gusano surge de una serie exacta de divisiones celulares asimétricas del huevo fecundado. La asimetría se origina siguiendo una indicación del medio externo del huevo: el punto de entrada del espermatozoide define el futuro polo posterior del huevo elongado. Luego, las proteínas del huevo interactúan entre ellas y se organizan en relación a dicho punto a fin de crear una asimetría más elaborada en el interior de la célula. Las proteínas que intervienen son traducciones de los mRNA acumulados que han sido transcritos de genes maternos. Dado que estos mRNA se generan antes de la puesta del huevo, el genotipo materno sólo dicta lo que ocurrirá en las primeras etapas del desarrollo. Los genes que actúan de esta forma se llaman **genes de efecto materno**.

Un subconjunto de estos genes son los que se requieren específicamente en la organización del patrón asimétrico del huevo del nematodo. Se llaman genes *Par* (de ***Par**tición defectuosa*) de los cuales se han identificado por lo menos seis, mediante cribado genético de mutantes en los cuales este modelo está alterado. Los genes *Par* tienen homólogos en insectos y en vertebrados, en los que tienen un papel fundamental en la organización de la polaridad, como ya se explicó en el Capítulo 19. De hecho, una de las claves de nuestro conocimiento actual de los mecanismos generales de la polaridad celular fue el descubrimiento de estos genes en estudios sobre el desarrollo temprano de *C. elegans*.

En el huevo del nematodo, así como en otras células de éste y de otros animales, las proteínas Par (los productos de los genes *Par*) están a su vez distribuidas de forma asimétrica, algunas en un extremo de la célula y otras en el otro. Éstas aportan al huevo un conjunto de partículas ribonucleoproteicas denominadas *gránulos P*, que se sitúan en el polo posterior, de forma que la célula hija posterior hereda los gránulos P y la otra no. A lo largo de las divisiones siguientes, las proteínas Par actúan de forma similar, orientando el huso mitótico y segregando, en cada mitosis, los gránulos P para una de las células hijas, hasta llegar al estadio de 16 células, donde sólo una célula contiene los gránulos P (**Figura 22–19**). Esta célula es la que dará lugar a la línea germinal.

Figura 22–19 Divisiones asimétricas que segregan gránulos P en la célula fundadora de la línea germinal de *C. elegans*. Las micrografías de la fila superior muestran el patrón de división celular, con los núcleos celulares teñidos de *azul* mediante un colorante fluorescente específico del DNA; en la fila inferior, las mismas células pero teñidas con un anticuerpo contra los gránulos P. Estos pequeños gránulos (0,5-1 μm de diámetro) están distribuidos al azar por el citoplasma del huevo no fecundado (no se presenta). Después de la fecundación, en cada una de las divisiones celulares hasta el estadio de 16 células tanto los gránulos como la maquinaria intracelular que regula su localización asimétrica se segregan en una sola célula hija. (Cortesía de Susan Strome.)



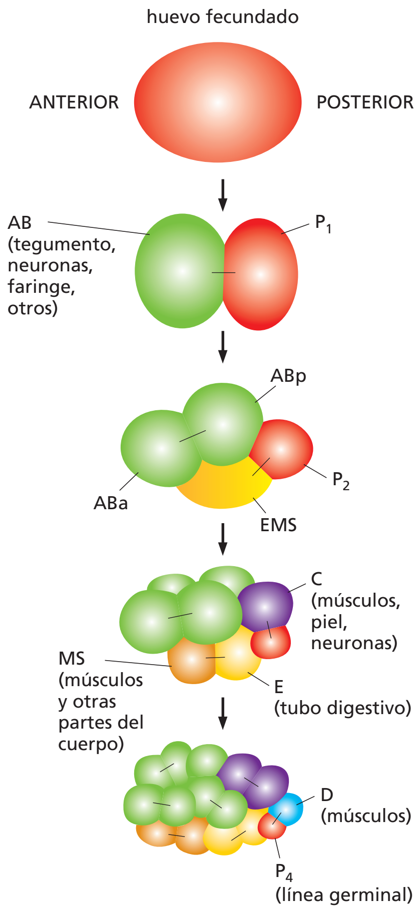


Figura 22–20 Patrón de divisiones celulares en el embrión joven de *C. elegans*. Se indican los nombres y los destinos de cada una de las células. Las células hermanas aparecen unidas por una *corta línea negra*. (Según K. Kemphues, *Cell* 101:345-348, 2000. Con autorización de Elsevier.)

La distinta especificación de los precursores de la célula germinal en relación con los precursores de las células somáticas es clave en el desarrollo de casi todos los tipos de animales y el proceso tiene características comunes incluso en fílums con esquemas corporales muy distintos. Así, por ejemplo, en *Drosophila* también se segregan partículas similares a los gránulos P en uno de los polos del huevo y luego se incorporan a las células precursoras de la línea germinal, determinando su destino. Fenómenos similares ocurren en peces y en ranas. En todas estas especies podemos reconocer algunas de estas mismas proteínas en el material que determina el linaje germinal, incluyendo homólogos de una proteína, denominada Vasa, que se une al RNA. Todavía no se sabe de qué manera actúan el RNA, Vasa y las proteínas asociadas a ella, en la determinación de la línea germinal.

Las interacciones célula-célula generan patrones progresivamente más complejos

En *C. elegans*, como en otros animales, el huevo es una célula extraordinariamente grande, con espacio para un complejo diseño interno. Además de los gránulos P, otros factores se distribuyen de forma ordenada a lo largo del eje anteroposterior, bajo el control de las proteínas Par, y de esta misma forma se asignan estos factores a las diferentes células cuando el huevo sufre los primeros ciclos de división celular. Estas divisiones tienen lugar sin crecimiento, ya que la alimentación no puede empezar hasta que se hayan formado la boca y el tubo digestivo; por lo tanto, el huevo se subdivide en células progresivamente más pequeñas. Varios de los factores localizados son proteínas reguladoras, las cuales actúan de forma directa en la célula que las hereda, ya sea bloqueando o dirigiendo la expresión de determinados genes o bien añadiendo diferencias entre esta célula y sus vecinas, comprometiéndola a un destino especializado.

Mientras que las primeras diferencias entre las células situadas a lo largo del eje anteroposterior de *C. elegans* proceden de divisiones asimétricas, la modelación posterior, incluyendo el patrón de tipos celulares, se sitúa a lo largo de otros ejes y depende de las interacciones que se dan entre las células. En el embrión, las estirpes celulares son tan reproducibles que las células individuales se pueden nombrar e identificar en cada animal (**Figura 22–20**); por ejemplo, en el estadio de cuatro células, se llaman ABa y ABp (las dos células hermanas anteriores) y EMS y P_2 (las dos posteriores). Como resultado de las divisiones asimétricas que acabamos de describir, la célula P_2 expresa una proteína señal de superficie, que es un homólogo en nematodos del ligando Delta de Notch, mientras que la ABa y la ABp expresan el correspondiente receptor transmembrana (un homólogo de Notch). La forma alargada de la cubierta del huevo obliga a estas células a colocarse de forma que la más anterior (ABa) y la más posterior (P_2) dejan de estar en contacto. Como resultado de ello, sólo la célula ABp recibe la señal de P_2; el resultado es que ABp es diferente de ABa y se define así el eje dorsoventral del gusano (**Figura 22–21**).

Al mismo tiempo, P_2 también expresa otra molécula señal, una proteína Wnt, que actúa sobre un receptor Wnt (una proteína Frizzled) en la membrana de la célula EMS. La señal polariza a EMS en relación con el lugar de contacto con P_2, controlando la orientación del huso mitótico. Luego, EMS se divide y da lugar a dos células hijas que quedan comprometidas a diferentes destinos, como resultado de la acción de la señal Wnt procedente de P_2. Una

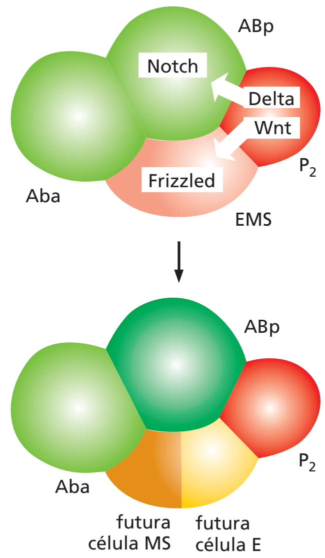


Figura 22–21 Vías de señalización celular que controlan la asignación de diferentes caracteres a las células del embrión de cuatro células en el nematodo. La célula P_2 utiliza la vía de señalización Notch para enviar una señal inductiva a la célula ABp, haciendo que ésta adopte un carácter especializado. La célula ABa presenta toda la maquinaria molecular necesaria para responder de la misma forma a la misma señal, pero no se produce así porque no está en contacto con P_2. Al mismo tiempo, la señal Wnt procedente de P_2 hace que la célula EMS reoriente su huso mitótico y genere dos células hijas: las células MS y E (esta última fundadora del tubo digestivo) que se comprometerán en dos destinos distintos como resultado de su diferente exposición a la proteína Wnt.

de las hijas, la célula MS, dará lugar a los músculos y a otras partes del cuerpo; la otra, la célula E, será exclusivamente la fundadora del tubo digestivo (véase la Figura 22–21).

Una vez esquematizada la cadena de sucesos de causa y efecto en el desarrollo temprano del nematodo, se examinarán algunos métodos que se han utilizado para descifrarla.

La microdisección y la genética revelan la lógica del control del desarrollo; la clonación génica y la secuenciación revelan sus mecanismos moleculares

Para descubrir los mecanismos causales es necesario saber cuál es el potencial de desarrollo de cada una de las células del embrión. ¿En qué momentos de sus vidas experimentan los cambios internos que son decisivos en la determinación a un destino particular, y en qué momentos dependen de señales de otras células? En el caso del nematodo, se pueden destruir una o más células vecinas, mediante microdisección con un minúsculo rayo láser, y luego observar directamente cómo se comportan las células en las nuevas condiciones. Otra opción es utilizar una aguja fina para manipular las células de un embrión temprano reubicándolas dentro del huevo. Por ejemplo, se pueden intercambiar las posiciones relativas de ABa y ABp en el estadio de cuatro células. Entonces la célula ABa experimenta el destino que normalmente sería el de ABp, y viceversa; esto indica que las dos células tienen inicialmente el mismo potencial de desarrollo y son las señales de sus vecinas lo que las hace diferentes. Una tercera estrategia es eliminar, por digestión enzimática, la cubierta del huevo de un embrión de *C. elegans* en fase temprana, y luego manipular las células en cultivo. De este modo se demostró la existencia de una señal polarizadora de P_2 a EMS.

Para identificar los genes que intervienen en la interacción celular P_2-EMS se utilizaron cribajes genéticos. Se investigaron cepas mutantes de gusanos en los que no se inducía ninguna célula de tubo digestivo; estos mutantes se denominan *Mom* (***mo**re **m**esoderm*) porque tienen más mesodermo, ya que es el destino de las células hijas de EMS cuando falla la inducción. El clonaje y la secuenciación de los genes *Mom* reveló que uno de ellos codifica una proteína señal, Wnt, que se expresa en la célula P_2, mientras que otro codifica una proteína, Frizzled, que es un receptor de Wnt que se expresa en EMS. Se realizó un segundo cribado genético a mutantes con el fenotipo opuesto, en los cuales se inducen las células a convertirse en células suplementarias del tubo digestivo; estos mutantes se llaman *Pop*, ya que muestran un defecto en la parte posterior de la faringe (***po**sterior **p**harynx defect*). Uno de los genes *Pop* (*Pop1*) codifica una proteína reguladora génica (una homóloga de LEF1/TCF) cuya actividad está regulada negativamente por la señal de Wnt en *C. elegans*. Cuando no existe actividad de Pop1, las dos hijas de EMS se comportan como si hubieran recibido la señal Wnt de P_2. Se han utilizado métodos genéticos similares para identificar los genes cuyos productos median la señal de P_2 a ABa, que es Notch dependiente.

Si continuamos por este camino, es posible construir un esbozo detallado de los acontecimientos que tienen lugar durante el desarrollo del nematodo y de la maquinaria genéticamente específica que los controla.

Con el tiempo, las células cambian su capacidad de respuesta frente a las señales de desarrollo

La complejidad que adquiere el cuerpo del nematodo adulto se consigue mediante el uso repetido de unos cuantos mecanismos de organización del patrón, incluyendo los que acabamos de describir, que actúan en el embrión temprano. Por ejemplo, durante todo el desarrollo de *C. elegans* tienen lugar divisiones celulares con asimetría molecular dependiente de las proteínas reguladoras Pop1, de las que resultan células hijas en posición anterior y posterior con caracteres diferentes.

Como ya se ha destacado anteriormente, aunque actúen los mismos tipos de señales repetidamente en momentos y lugares diferentes, sus efectos son distintos porque las células están programadas para responder de maneras distintas, según su edad y su historia. Por ejemplo, en el estadio de cuatro células, una de ellas, la ABp, cambia su potencial de desarrollo porque ha recibido una señal vía Notch. En el estadio de 12 células, las nietas de ABa y de ABp también reciben otra señal Notch, esta vez procedente de una hija de la célula EMS. La nieta de ABa cambia su estado interno en respuesta a esta señal y empieza a formar la faringe. La nieta de ABp no responde de esta manera, porque la exposición inicial a

Notch impide su respuesta. Por lo tanto, en diferentes momentos de su historia, las dos células del linaje ABa y ABp responden a Notch, pero los resultados son diferentes. De alguna forma la señal Notch en el estadio de 12 células induce la formación de la faringe, pero en el estadio de 4 células tiene otros efectos, que incluyen impedir la formación de faringe por inducción de Notch en un estadio posterior. Este fenómeno, en el cual el mismo mecanismo de señales induce efectos diferentes en diferentes etapas y en diferentes contextos, se observa en el desarrollo de todos los animales; en todos ellos, la señal Notch se utiliza de forma repetida.

Los genes heterocrónicos controlan la temporización del desarrollo

Las señales que ordenan cambios en las células no necesariamente tienen que ser externas: dentro de la célula, un grupo de moléculas reguladoras puede provocar la producción de otro grupo y entonces la célula inicia una serie de estados mediante sus propios mecanismos internos. Estos estados no solamente difieren en su capacidad de respuesta a señales externas sino también en otros aspectos de su composición química interna, incluyendo las proteínas que inician o detienen el ciclo de división celular. De esta forma, los mecanismos internos de la célula, junto con las señales recibidas en el pasado y en el presente, dictan la secuencia de los cambios bioquímicos y también la temporización de las divisiones celulares.

Los detalles moleculares específicos de los mecanismos que gobiernan el programa temporal de desarrollo todavía constituyen un misterio. Es muy poco lo que se sabe sobre cómo se controla la secuencia de las divisiones celulares, incluso en el embrión del nematodo, que tiene un patrón de división celular rigurosamente predecible. No obstante, en los estadios más avanzados, cuando la larva se alimenta, crece y muda convirtiéndose en un adulto, sí que se han podido identificar algunos genes que controlan la temporización de los acontecimientos celulares. Las mutaciones en estos genes generan fenotipos *heterocrónicos,* en que las células de una larva en una fase concreta se comportan como si estuvieran en una fase larvaria diferente, o las células del adulto continúan dividiéndose como si estuvieran en estado larvario (**Figura 22–22**).

Mediante análisis genéticos se puede comprobar que los productos de los genes heterocrónicos actúan en series y forman cascadas reguladoras. Curiosamente, dos genes que se encuentran al principio de sus respectivas cascadas, denominados *Lin4* y *Let7*, no codifican proteínas sino micro-RNA (moléculas cortas, de 21 o 22 nucleótidos, de RNA regulador que no se traduce). Estos mRNA actúan enlazándose a secuencias complementarias de las regiones no codificadoras de RNA mensajero, que ha sido transcrito a partir de otros genes heterocrónicos; de esta forma se inhibe su traducción y se activa su degradación, como se describió en el Capítulo 7. El incremento de los niveles de RNA de *Lin4* gobierna la progresión desde el comportamiento propio de un primer estadio larvario al de un tercer estadio; el incremento de RNA de *Let7*, induce la progresión desde el estadio larvario tardío hasta el

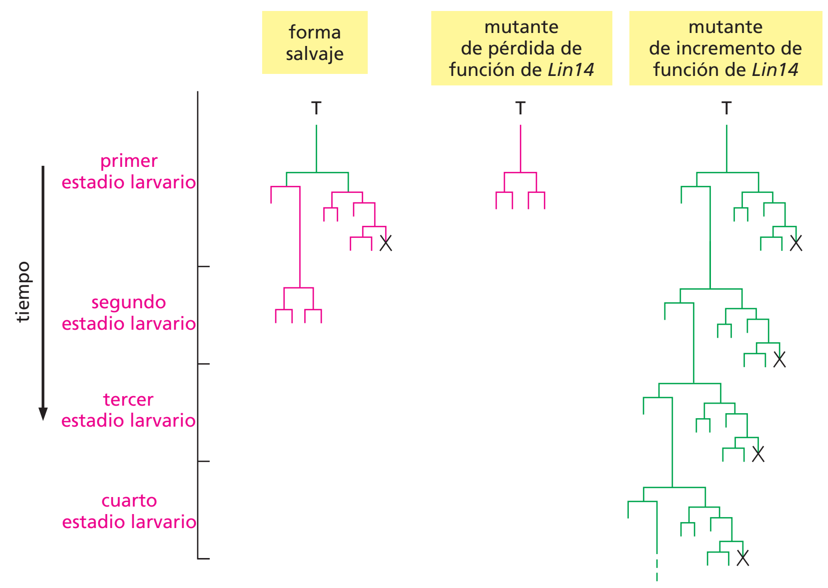


Figura 22–22 Mutaciones heterocrónicas en el gen *Lin-14* de *C. elegans*. Se muestran los efectos sobre uno de los muchos linajes afectados. La mutación de pérdida de función (o recesiva) en *Lin-14* es la causa de una aparición prematura de un patrón de división celular y de diferenciación característicos de larva tardía, de manera que el animal alcanza de forma prematura su estadio final y con un número anormalmente bajo de células. La mutación de incremento de función (dominante) tiene un efecto opuesto, haciendo que las células reiteren los patrones de divisiones celulares característicos del primer estadio larvario, continuando durante cinco o seis ciclos de muda, y persistiendo en la fabricación de un tipo inmaduro de cutícula. Las aspas indican muerte celular programada. Las *líneas verdes* representan células que tienen la proteína Lin-14 (que se une al DNA), las *líneas rojas*, células que no la tienen. En el desarrollo normal, la desaparición de Lin-14 tiene lugar en la larva que ya es capaz de comer. (Según V. Ambros y H.R. Horvitz, *Science* 226:409-416, 1984, con autorización de AAAS; y P. Arasu, B. Wightman y G. Ruvkun, *Growth Dev. Aging* 5:1825-1833, 1991, con autorización de Growth Publishing Co., Inc.)

adulto. De hecho, *Lin4* y *Let7* fueron los primeros micro-RNA que se describieron en animales, y fue gracias a los estudios en *C. elegans* que se descubrió la importancia de todo este conjunto de moléculas de regulación génica.

En muchas otras especies, incluyendo *Drosophila*, el pez cebra y los humanos, encontramos moléculas de RNA que son idénticas o casi idénticas al RNA de *Let7*. Además, estos RNA actúan del mismo modo regulando el nivel de las moléculas de mRNA diana, las cuales son homólogas a las dianas del RNA de *Let7* en el nematodo. En *Drosophila*, parece que este sistema de moléculas interviene en la metamorfosis de la larva a la mosca, hecho que sugiere que tiene una función conservada en el control de la temporización de las transiciones en el desarrollo.

El contaje de las divisiones celulares no forma parte del programa interno de temporización

Debido a que las fases de especialización celular tienen que estar coordinadas con las divisiones celulares, a menudo se ha sugerido que la división celular podría actuar como un reloj que controlase los diversos acontecimientos del desarrollo. Desde este punto de vista, los cambios en el estado interno estarían sujetos al paso de cada ciclo de división: es decir, la célula pasaría al estado siguiente al sufrir mitosis. Aunque hay algunos casos en que los cambios de estado celular están condicionados por las fases del ciclo celular, esto no ocurre como regla general. Normalmente las células de embriones en desarrollo, ya sean de gusanos, de moscas o de vertebrados, siguen un programa fijo estandarizado de determinación y diferenciación aunque se bloquee de forma artificial la división celular. Es inevitable que haya algunas anomalías, dado que una célula única e indivisa no puede diferenciarse de dos formas a la vez. Pero se han estudiado muchos casos en los que parece que la célula cambia su estado con el tiempo, sin tener en cuenta la división celular, y que este estado cambiante controla tanto la decisión de dividirse como la decisión de cuándo y cómo especializarse.

Algunas células mueren por apoptosis como parte del programa de desarrollo

El control del número de células depende tanto de la muerte cómo de la división celular. Un *C. elegans* hermafrodita genera 1030 núcleos de células somáticas a lo largo de su desarrollo, pero 131 de estas células mueren. Estas muertes programadas suceden según un patrón totalmente predecible. En *C. elegans* se pueden seguir con detalle, ya que se puede trazar el destino de cada célula individual y observar cuál es la que muere como víctima suicida de la apoptosis y cómo es rápidamente fagocitada y digerida por sus vecinas (**Figura 22–23**). En otros organismos en los que una observación detallada es más difícil, estas muertes pasan desapercibidas con facilidad; pero la muerte por apoptosis es probablemente el destino de una gran parte de células de un animal y desempeña un papel esencial en la generación de un individuo con los tipos celulares correctamente situados y en la proporción adecuada como ya se describió en el Capítulo 18.

Los cribados genéticos en *C. elegans* han sido cruciales en la identificación de los genes que causan la apoptosis y en subrayar su importancia en el desarrollo. Para que tengan lugar las 131 muertes normales se necesita la presencia de 3 genes denominados *Ced3*, *Ced4* (***c****ell* ***d****eath abnormal*; muerte celular anormal) y *Egl1*. Si estos genes se inactivan por mutación, las células que estarían destinadas a morir, sobreviven, diferenciándose en tipos celulares concretos como son las neuronas. A la inversa, la sobreexpresión o la expresión de los mismos genes en otros lugares tiene como consecuencia que mueran muchas células que en condiciones normales sobrevivirían; el mismo efecto resulta de las mutaciones que inactivan el gen *Ced9*, que por lo general reprime el programa de muerte celular.



Figura 22–23 Muerte celular apoptótica en *C. elegans*. La muerte depende de la expresión de los genes *Ced3* y *Ced4* en ausencia de la expresión de *Ced9*, todos ellos en la misma célula apoptótica. La posterior captación y procesamiento de los remanentes de la célula dependen de la expresión de otros genes en las células vecinas.

Todos estos genes codifican componentes conservados de la maquinaria de muerte celular. Como ya hemos detallado en el Capítulo 18, *Ced3* codifica un homólogo de la caspasa, mientras que *Ced4*, *Ced9* y *Egl1* son homólogos respectivamente de *Apaf1*, *Bcl2* y *Bad*. Sin los resultados obtenidos del análisis detallado del desarrollo de este nematodo transparente, tan fácil de tratar en términos genéticos, hubiera sido muy difícil descubrir estos genes y comprender los procesos de muerte celular en los vertebrados.

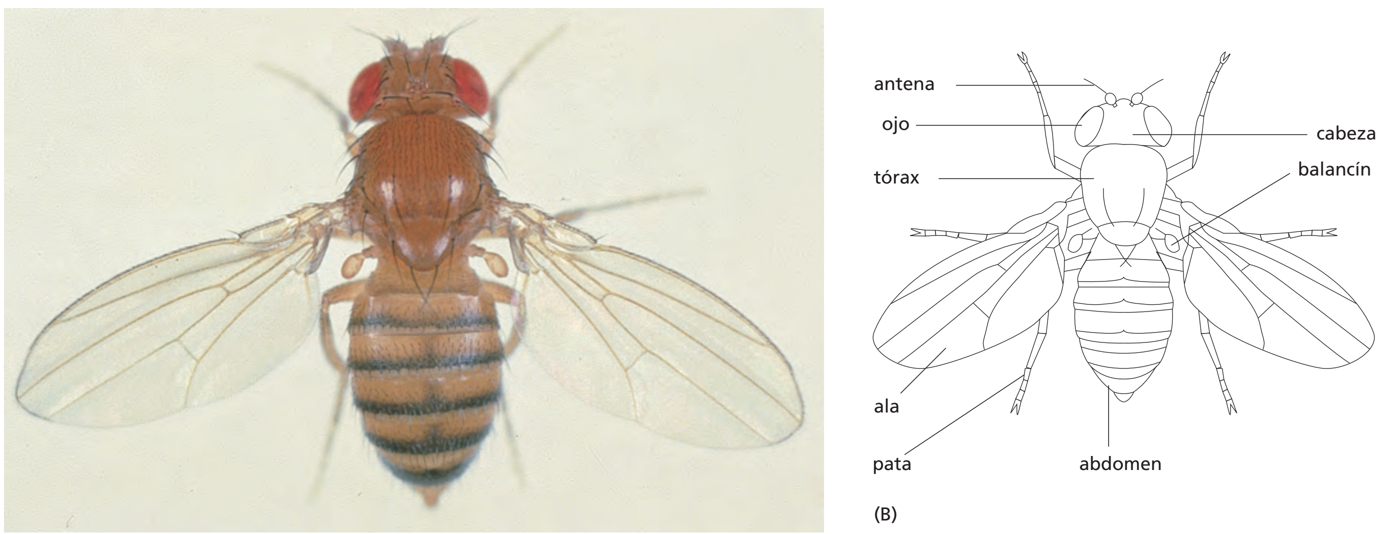
Resumen

Caenorhabditis elegans es *un nematodo pequeño, transparente y relativamente sencillo; su desarrollo es reproducible en extremo y conocido con detalle, de tal forma que una célula situada en un lugar concreto del cuerpo tiene el mismo linaje en todos y cada uno de los individuos y su linaje se conoce de un modo exhaustivo. Además, el genoma se ha secuenciado por completo. Así, se han combinado potentes métodos genéticos y de microdisección para descifrar los mecanismos del desarrollo. Como en otros organismos, el desarrollo depende de la combinación de interacciones célula-célula y de procesos celulares autónomos. El desarrollo empieza con una división asimétrica del huevo fecundado, de la que resultan dos células más pequeñas que contienen distintos determinantes del destino celular. Las células hijas de estas células interactúan mediante vías de señalización Notch y Wnt y generan un conjunto de estados celulares más diverso. Al mismo tiempo, gracias a las divisiones asimétricas, una célula hereda materiales del huevo que la determinarán ya en una etapa temprana, como progenitora de la línea germinal.*

Mediante cribado genético se identifican los grupos de genes responsables de esta etapa del desarrollo y de las posteriores, incluyendo los que controlan la muerte celular por apoptosis de un subgrupo específico de células como parte del programa normal del desarrollo. También se han identificado los genes heterocrónicos que gobiernan la temporización de los sucesos del desarrollo. No obstante, se ha hecho evidente que la temporización de las distintas fases del desarrollo no está marcada por el contaje del número de divisiones celulares.

DROSOPHILA Y LA GENÉTICA MOLECULAR DE LA FORMACIÓN DEL PATRÓN: GÉNESIS DEL ESQUEMA CORPORAL

La mosca *Drosophila melanogaster* (**Figura 22–24**) es el organismo que más ha transformado nuestros conocimientos sobre cómo los genes gobiernan el modelaje del cuerpo. La anatomía de *Drosophila* es más compleja que la de *C. elegans*, con un número de células 100 veces mayor y con más paralelismos con nuestra propia estructura corporal. Sorprendentemente, la mosca tiene menor número de genes que el gusano (unos 14.000 frente a 20.000). Por otro



(A) (B)

Figura 22–24 ***Drosophila melanogaster***. Vista dorsal de una mosca normal adulta. (A) Fotografía. (B) Dibujo ilustrado. (Fotografía por cortesía de E.B. Lewis.)

lado, la cantidad de DNA por gen es dos veces mayor (unos 10.000 nucleótidos de promedio, comparado con los aproximadamente 5000 del gusano), aunque la mayor parte lo constituyen secuencias no codificantes. La caja de construcción molecular contiene menos piezas, pero las instrucciones de montaje (especificadas por las secuencias reguladoras del DNA no codificante) son más voluminosas.

Décadas de estudios genéticos han culminado en grandes cribados genéticos sistemáticos, que han dado como resultado un catálogo de los genes que controlan el desarrollo definiendo el modelo espacial de tipos celulares y estructuras corporales de la mosca; además, la biología molecular ha proporcionado las herramientas para observar estos genes en acción. Podemos observar de forma directa cómo se define el estado interno de las células durante el desarrollo a través de la expresión de los genes reguladores, mediante hibridación *in situ* de embriones enteros, utilizando sondas de DNA o de RNA o bien anticuerpos marcados. Además, mediante el análisis de animales constituidos por una mezcla de células mutantes y no mutantes, es posible descubrir cómo actúa cada gen como parte del sistema que especifica la organización del cuerpo.

La mayoría de genes que controlan el patrón corporal en *Drosophila* tienen dobles muy semejantes en animales superiores, incluyendo a la especie humana. De hecho, muchas de las estrategias para definir la estructura del cuerpo y el modelaje de órganos y tejidos concretos son asombrosamente similares. Por lo tanto, aunque pueda parecer sorprendente, la mosca ha proporcionado la clave para comprender la genética molecular de nuestro propio desarrollo.

Como ocurre con los nematodos, las moscas son ideales para los estudios genéticos, ya que son baratas de mantener, es fácil obtener mutantes y tienen un ciclo reproductor corto. Pero existe otra razón más importante que explica por qué han resultado tan valiosas para los genetistas del desarrollo. Ya hemos destacado que los genomas de los vertebrados han sufrido duplicaciones y a menudo contienen dos o tres genes homólogos que en la mosca corresponden a un solo gen. Una mutación que destruya uno de estos genes no es útil para revelar la función central del gen porque los homólogos que comparten dicha función permanecen activos. En la mosca, con una dotación de genes menor, este fenómeno de redundancia genética no es tan relevante. Por lo tanto, en la mosca el fenotipo de una mutación determinada revela directamente la función del gen mutante.

El cuerpo del insecto está constituido por una serie de unidades o segmentos

En la **Figura 22–25** se esquematiza la cronología del desarrollo de *Drosophila* desde el huevo hasta el adulto. El periodo de *desarrollo embrionario* empieza con la fecundación y dura aproximadamente un día, al final del cual el huevo eclosiona y el embrión sale en forma de *larva*. La larva pasa luego por tres fases, o *estadios*, separados por mudas en las cuales abandona su cubierta cuticular y segrega otra más grande. Al final de la tercera fase, la larva pupa. En el interior de la *pupa* tiene lugar una remodelación radical del cuerpo: el proceso llamado *metamorfosis*. Finalmente, unos nueve días después de la fecundación sale la mosca adulta o *imago*.

La mosca se compone de una cabeza, con boca, ojos y antenas, seguida de tres segmentos torácicos (numerados de T1 a T3), y ocho o nueve segmentos abdominales (numerados de A1 a A9). Cada segmento, aunque es distinto de los demás, se construye según un esquema similar. Por ejemplo, el segmento T1 lleva un par de patas, el T2 un par de patas y un par de alas y el T3, un par de patas y un par de balancines, que son pequeñas protuberancias que se balancean y tienen importancia en el vuelo; éstos han evolucionado a partir del segundo par de alas que poseen otros insectos más primitivos. Esta segmentación casi repetitiva se desarrolla en el embrión durante las primeras horas después de la fecundación (**Figura 22–26**), pero es más evidente en la larva (**Figura 22–27**), donde los segmentos parecen más similares unos a otros que en el adulto. En el embrión se puede observar que también son segmentados los rudimentos de la cabeza, o por lo menos, los que formarán las partes de la boca del adulto. En los dos extremos del animal encontramos dos estructuras terminales especializadas que, no obstante, no se generan por segmentación.

Los límites entre los segmentos se definen tradicionalmente por marcas anatómicas visibles; pero cuando se trata de explicar los patrones de expresión génica es más conveniente dibujar otros límites y definir otra serie de segmentos denominados *parasegmentos*, en los que queda medio segmento fuera de registro con respecto a la segmentación tradicional (Figura 22–27).

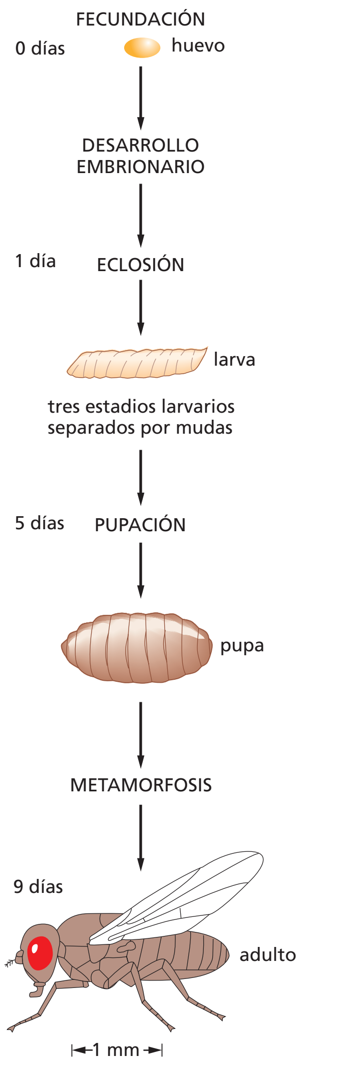


Figura 22–25 Sinopsis del desarrollo de *Drosophila* desde el huevo hasta la mosca adulta.

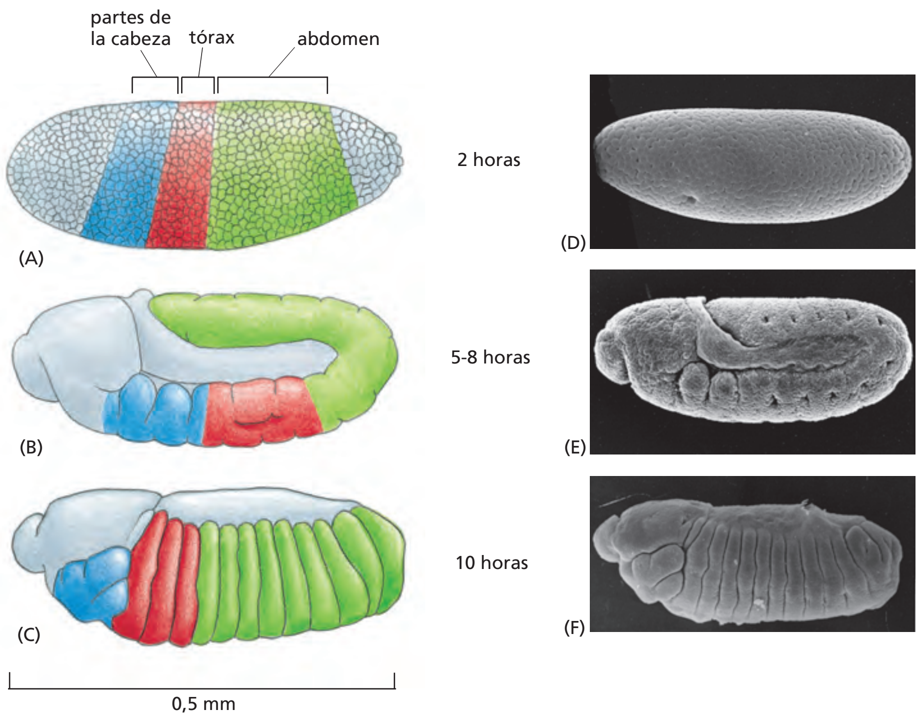


Figura 22–26 Origen de los segmentos corporales de *Drosophila* durante el desarrollo embrionario. <AACG> En los dibujos (A-C) y en las electromicrografías de barrido (D-F) el embrión se muestra de lado. (A y D) a las dos horas, el embrión está en el estadio de blastodermo sincitial (véase Figura 22–28) y no se aprecia ninguna segmentación, aunque ya se puede dibujar el mapa de destinos celulares, mostrando las futuras regiones segmentadas (colores en A). (B y E) De las 5 a las 8 horas, el embrión está en el estadio de banda germinal extendida: ha tenido lugar la gastrulación, empieza a ser visible la segmentación y se alarga el eje segmentado del cuerpo, curvándose dorsalmente sobre sí mismo por la cola adaptándose a la cubierta del huevo. (C y F) A las 10 horas, el eje corporal se ha contraído y otra vez se endereza y se definen claramente todos los segmentos. Las estructuras de la cabeza, visibles de forma externa en este estadio, sufrirán un plegamiento posterior hacia el interior de la larva, emergiendo de nuevo sólo cuando la larva supere la fase de pupa convirtiéndose en adulto (D y E, por cortesía de F.R. Turner y A.P. Mahowald, *Dev. Biol*. 50:95-108, 1976. Academic Press; F, de J.P. Petschek, N. Perrimon y A.P. Mahowald, *Dev. Biol*., 119:175-189, 1987. Todo con la autorización de Academic Press.)

Drosophila empieza su desarrollo como un sincitio

El huevo de *Drosophila* mide aproximadamente 0,5 mm de largo por 0,15 mm de diámetro y presenta una polaridad definida con claridad. A semejanza de los huevos de otros insectos y a diferencia de la mayoría de los vertebrados, comienza su desarrollo de forma inusual: una serie de divisiones nucleares sin división celular da lugar a un sincitio. Las primeras divisiones nucleares son sincrónicas y extremadamente rápidas (tienen lugar alrededor de cada 8 minutos). Las nueve primeras divisiones dan lugar a una nube de núcleos, la mayoría de los cuales migran desde el centro del huevo hacia la periferia formando una monocapa llamada *blastodermo sincitial*. Después de otras cuatro series de divisiones nucleares, las membranas plasmáticas engloban cada uno de los núcleos al crecer desde la periferia hacia el interior del huevo, transformando así el blastodermo sincitial en un *blastodermo celular* formado por unas 6000 células individuales (**Figura 22–28**). Cerca de 15 núcleos situados en el extremo posterior del huevo se segregan en células unos cuantos ciclos antes que los demás; estas *células polares* son las precursoras de la línea germinal (células germinales primordiales), que darán lugar a huevos o a espermatozoides

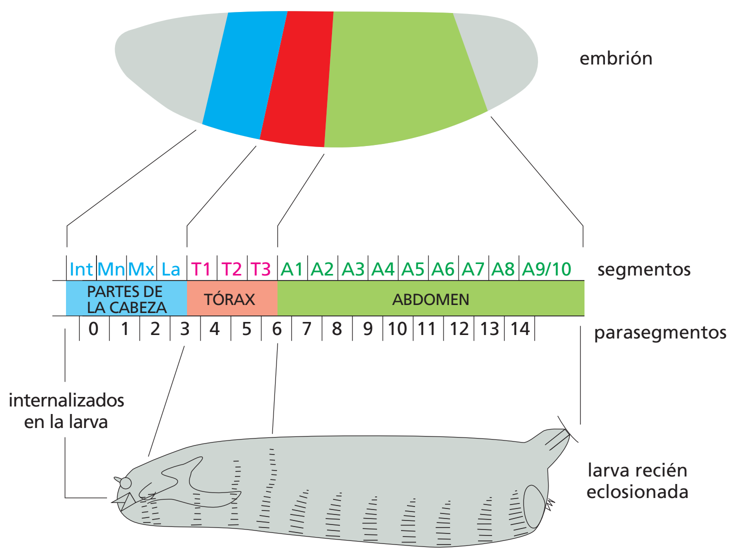


Figura 22–27 Segmentos de la larva de *Drosophila* y su correspondencia con regiones del blastodermo. En *color* se muestran las zonas del embrión que se organizan en segmentos. Los dos extremos del embrión, sombreados en *gris*, no son segmentados y se pliegan hacia el interior del cuerpo formando las estructuras internas de la cabeza y del intestino. (En la larva, las futuras estructuras segmentadas externas de la cabeza del adulto también se pliegan de forma transitoria hacia el interior.) La segmentación en *Drosophila* se puede describir en términos de segmentos o de parasegmentos: la relación se muestra en la parte media de la figura. En general los parasegmentos corresponden simplemente a patrones de expresión génica. El número exacto de segmentos abdominales es objeto de debate: están definidos de forma clara ocho segmentos, presentándose un noveno segmento vestigial en la larva, que desaparece en el adulto.

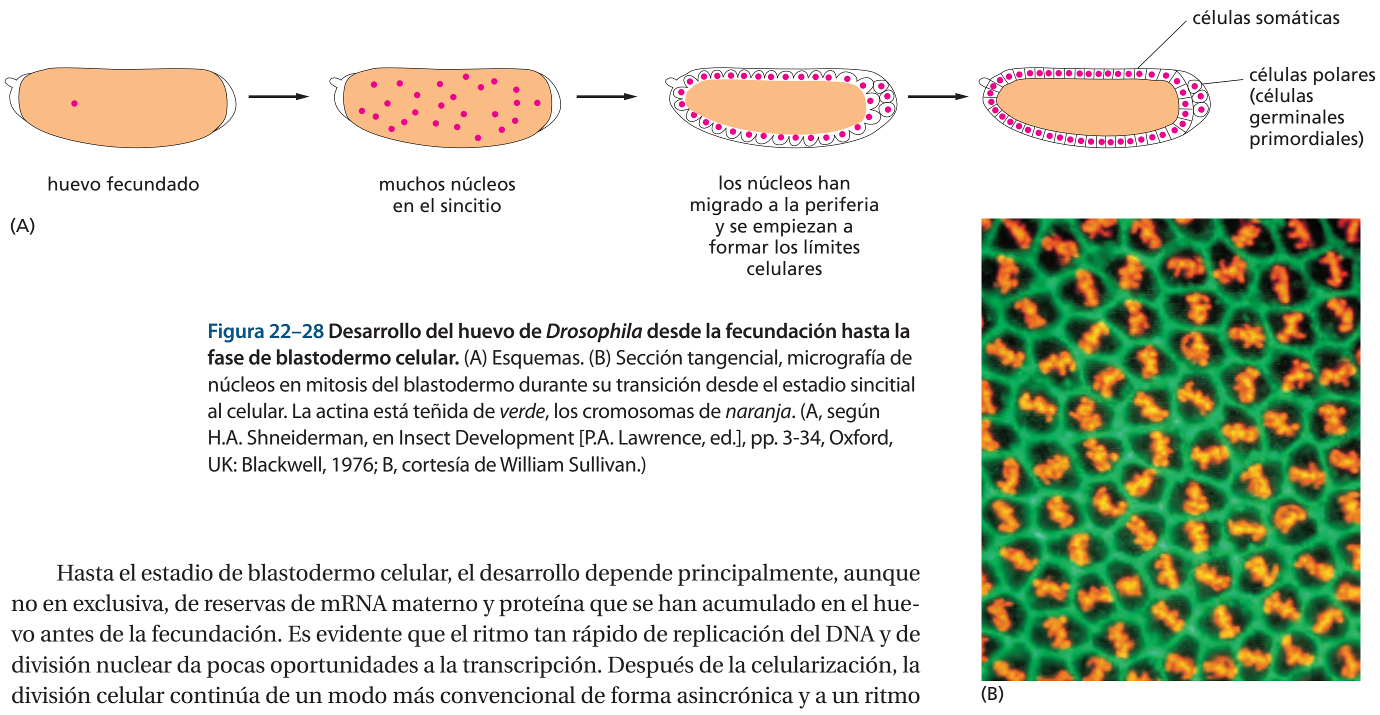


Figura 22–28 Desarrollo del huevo de *Drosophila* desde la fecundación hasta la fase de blastodermo celular. (A) Esquemas. (B) Sección tangencial, micrografía de núcleos en mitosis del blastodermo durante su transición desde el estadio sincitial al celular. La actina está teñida de *verde*, los cromosomas de *naranja*. (A, según H.A. Shneiderman, en Insect Development [P.A. Lawrence, ed.], pp. 3-34, Oxford, UK: Blackwell, 1976; B, cortesía de William Sullivan.)

Hasta el estadio de blastodermo celular, el desarrollo depende principalmente, aunque no en exclusiva, de reservas de mRNA materno y proteína que se han acumulado en el huevo antes de la fecundación. Es evidente que el ritmo tan rápido de replicación del DNA y de división nuclear da pocas oportunidades a la transcripción. Después de la celularización, la división celular continúa de un modo más convencional de forma asincrónica y a un ritmo más lento; entonces la velocidad de transcripción aumenta muchísimo. La gastrulación empieza un poco antes de que se haya completado la celularización, cuando algunas zonas de la capa exterior del embrión empiezan a invaginarse y forman el tubo digestivo, la musculatura y los tejidos internos asociados. Un poco más tarde y en otra zona del embrión, un grupo aislado de células se desplaza desde la superficie del epitelio hacia el interior, generando el sistema nervioso central. Mediante marcaje y seguimiento de las células en estos desplazamientos, se puede dibujar un esquema del destino que toman las células de la capa superficial del blastodermo (**Figura 22–29**).

A medida que la gastrulación se acerca a su etapa final, a lo largo del eje anteroposterior en la superficie del embrión aparecen una serie de indentaciones y protuberancias que señalan la subdivisión del cuerpo en segmentos (véase la Figura 22–26). Pronto surge una larva segmentada por completo capaz de empezar a comer y a crecer. Dentro del cuerpo de la larva, unos pequeños grupos de células permanecen en apariencia indiferenciados, formando unas estructuras llamadas *discos imaginales*. Estos discos crecerán mientras la larva va creciendo, y finalmente, como veremos más adelante, darán lugar a la mayor parte de las estructuras del cuerpo del adulto.

Las características de la estructura corporal de *Drosophila*, compartidas por muchos otros animales incluyéndonos a nosotros mismos, son las siguientes: un extremo cefálico, un extremo caudal, un lado ventral y uno dorsal, un tubo digestivo, un sistema nervioso y una serie de segmentos corporales. Empezaremos la explicación de los mecanismos del desarrollo de *Drosophila* prestando atención a cómo se construye este esquema corporal.

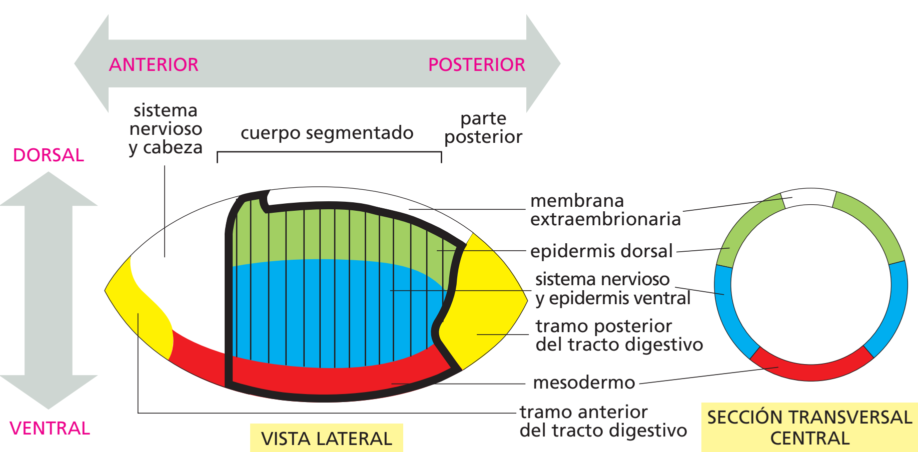


Figura 22–29 Mapa de destinos celulares de un embrión de *Drosophila* en la fase de blastodermo celular. El embrión se muestra de lado y en sección transversal, mostrando la relación entre la subdivisión dorsoventral de los principales tipos de tejidos y el patrón anteroposterior de los futuros segmentos. La línea gruesa limita la región en que se formarán las estructuras segmentadas. Durante la gastrulación, las células situadas a lo largo de la línea media ventral se invaginan formando el mesodermo, mientras que las células destinadas a formar el intestino se invaginan cerca de cada extremo del embrión. (Según V. Hartenstein, G.M. Technau y J.A. Campos-Ortega, *Wilhelm Roux' Arch. Dev. Biol.* 194:213-216, 1985. Con la autorización de Elsevier.)

Mediante cribajes genéticos se han definido los grupos de genes necesarios para determinados aspectos del patrón inicial

Después de llevar a cabo una serie de cribajes genéticos basados en la mutagénesis por saturación (explicados en el Capítulo 8), ha sido posible reunir una colección de mutantes de *Drosophila* que presentan cambios en una gran parte de los genes que afectan a su desarrollo. Podemos distinguir las mutaciones independientes de un mismo gen de las de genes distintos mediante complementación (véase el Panel 8–1, de la pág. 555); de esta manera se ha obtenido un catálogo de genes clasificados según sus fenotipos. En este catálogo, generalmente los genes que provocan fenotipos mutantes muy parecidos codifican proteínas que actúan juntas en el desarrollo de una función particular.

A veces los fenotipos mutantes revelan funciones en el desarrollo que son las que cabría esperar; pero a menudo se producen sorpresas. Los cribajes genéticos a gran escala centrados en el desarrollo temprano de *Drosophila* han revelado que los genes clave se clasifican en un conjunto relativamente pequeño de clases funcionales definidas por sus fenotipos. Algunos de ellos (como los *genes de polaridad del huevo;* **Figura 22–30**) son necesarios para la definición de los ejes anteroposterior y dorsoventral del embrión y señalan sus dos extremos para ciertos destinos particulares, mediante mecanismos en que están implicadas las interacciones entre el oocito y las células de su entorno en el ovario. Otros son los llamados *genes gap*, que se necesitan en amplias regiones específicas a lo largo del eje del embrión temprano para que su desarrollo sea normal. Una tercera categoría la constituyen los *genes de regla par*, los cuales son necesarios en el desarrollo de los segmentos del cuerpo, pero

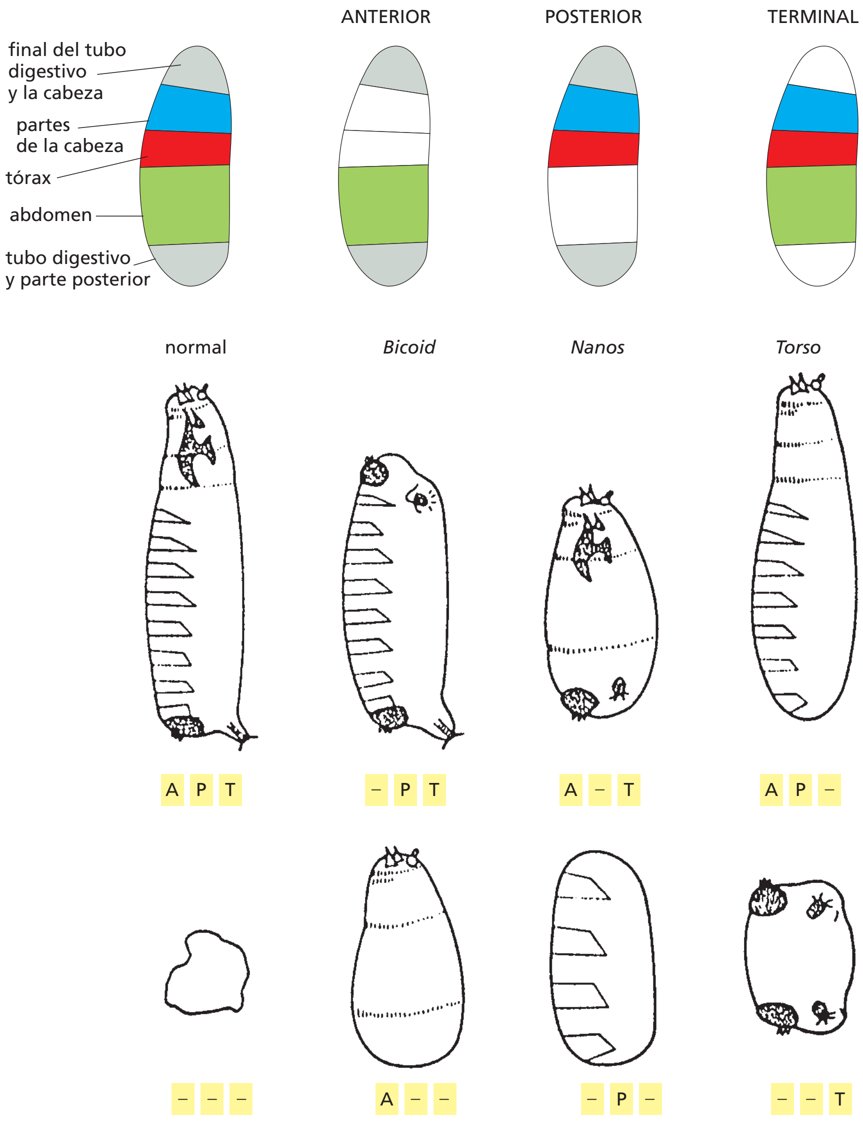


Figura 22–30 Dominios de los sistemas de genes de polaridad del huevo: anterior, posterior y terminal. Los diagramas superiores muestran los destinos de las diferentes regiones del huevo/embrión temprano, e indican (en *blanco*) las partes que no se desarrollan si el sistema anterior, posterior o terminal es defectuoso. La fila de en medio muestra de forma esquemática la apariencia de una larva normal y de larvas mutantes a las que les falta un gen del sistema anterior (p. ej., *Bicoid*), del sistema posterior (p. ej., *Nanos*) o del sistema terminal (p. ej., *Torso*). La fila inferior de dibujos muestra cómo aparecen las larvas en las cuales sólo es funcional uno (o no lo es ninguno) de los tres sistemas de genes. Las letras de debajo de cada larva indican qué sistema está intacto (A P T para la larva normal, – P T para la larva en la que no es funcional el sistema **a**nterior pero los sistemas **p**osterior y **t**erminal están intactos, y así sucesivamente). La inactivación de un sistema particular de genes causa la carencia del correspondiente grupo de estructuras corporales; las partes del cuerpo que se forman corresponden a los sistemas de genes que permanecen funcionales. Las larvas que tienen un defecto en el sistema anterior pueden seguir formando estructuras terminales en el extremo anterior, pero estas estructuras son del tipo que se encuentran por lo general en el extremo caudal y no en el extremo de la cabeza. (Ligeramente modificado de D. St. Johnston y C. Nüsslein-Volhard, *Cell* 68:201-219, 1992. Con autorización de Elsevier.)

sorprendentemente sólo para los alternos. Una cuarta categoría son los *genes de polaridad de segmento*, que son los responsables de la organización del patrón anteroposterior de cada segmento.

El descubrimiento de estos cuatro sistemas de genes y el análisis posterior de sus funciones (un cometido que todavía continúa) constituyó un logro excepcional de los genetistas del desarrollo. Tuvo un impacto revolucionario en la biología del desarrollo en general porque indican el camino hacia una explicación sistemática y comprensiva del control genético del desarrollo embrionario. En esta sección se tratarán de forma resumida las condiciones relativas a las primeras fases del desarrollo de *Drosophila* porque son específicas de los insectos; dedicaremos mucha más extensión a las partes del proceso que ilustran principios más generales.

Las interacciones entre el oocito y su entorno definen los ejes del embrión: el papel de los genes de polaridad del huevo

Sorprendentemente, los primeros pasos del desarrollo animal variables en grado sumo, incluso dentro de un mismo fílum. Por ejemplo, aunque una rana, un pollo y un mamífero se desarrollen de forma similar en estadios posteriores, sus huevos difieren de forma radical tanto en tamaño como en estructura, y empiezan su desarrollo con diferentes secuencias de divisiones celulares y distintos procesos de especialización celular.

El modelo de desarrollo temprano descrito para *C. elegans* es típico de muchas clases de animales. En cambio el de *Drosophila* constituye una variante muy extrema. Los ejes principales del cuerpo del futuro insecto se definen antes de la fecundación mediante un complejo intercambio de señales entre el huevo no fecundado, el oocito y las células foliculares que lo rodean en el ovario (**Figura 22–31**). Luego, en la fase sincitial que sigue a la fecundación tiene lugar una intensa actividad modeladora de construcción del patrón en los núcleos que se dividen rápidamente, antes de la primera partición del huevo en células separadas. Aquí no hay necesidad de las formas habituales de comunicación célula-célula que implican las señales transmembrana; las regiones vecinas del embrión temprano de *Drosophila* se comunica mediante proteínas reguladoras y moléculas de RNA, que difunden por el citoplasma de la gran célula plurinuclear o son transportadas activamente.

En etapas anteriores a la fecundación, el eje anteroposterior del futuro embrión queda definido la acción de tres sistemas de moléculas que generan marcas territoriales en el oocito (**Figura 22–32**). Después de la fecundación, cada marca territorial actúa de baliza y proporciona una señal en forma de gradiente morfogénico que organiza el proceso de desarrollo en sus alrededores. Dos de estas señales se generan a partir de acumulaciones de moléculas específicas de mRNA. El futuro extremo anterior del embrión contiene una elevada concentración de mRNA para una proteína reguladora llamada Bicoid; este mRNA se traduce produciendo la proteína Bicoid, la cual difunde lejos de su origen, formando una concentración de gradiente que tiene su máximo en el extremo anterior del huevo. El futuro extremo posterior del embrión contiene una elevada concentración de mRNA para un regulador de traslación llamado Nanos, que establece un gradiente posterior del mismo modo. La tercera señal se genera de forma simétrica a ambos extremos del huevo, por activación local de un receptor transmembrana de la tirosina quinasa llamado Torso. El receptor activado ejerce sus efectos a más corto alcance, marcando la localización de estructuras terminales

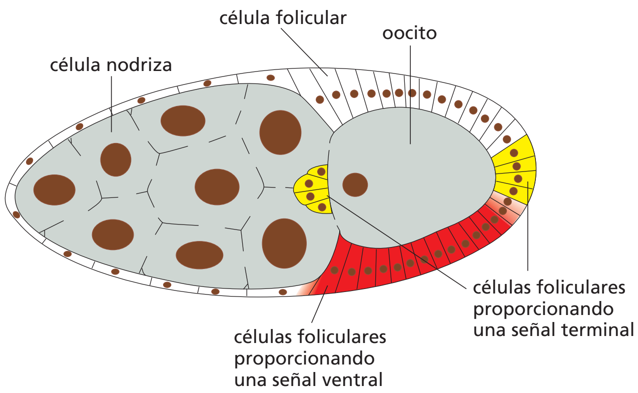


Figura 22–31 Oocito de *Drosophila* en su folículo. El oocito deriva de una célula germinal que se divide cuatro veces dando lugar a una familia de 16 células comunicadas entre sí por puentes citoplasmáticos (*gris*). Un miembro de la familia se convertirá en oocito, mientras que los otros se convertirán en células nodriza, las cuales fabrican muchos de los componentes que necesita el oocito y que se transfieren al mismo por los puentes citoplasmáticos. Las células foliculares que rodean parcialmente al oocito tienen un ancestro distinto. Tal como se indica, son fuentes de señales de polarización terminal y ventral del huevo.

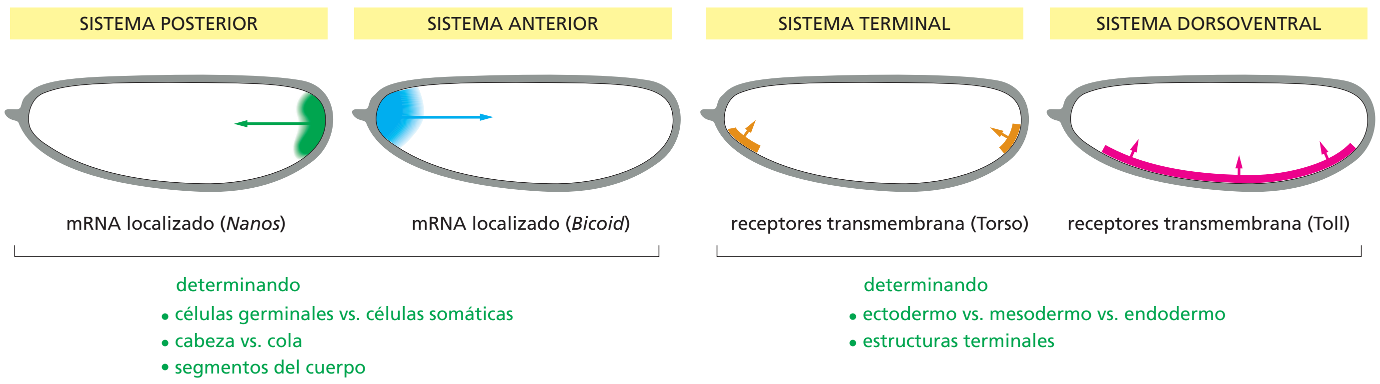


Figura 22–32 Organización de los cuatro sistemas de gradientes de polaridad del huevo. Los receptores Toll y Torso se distribuyen por toda la membrana; la coloración de los diagramas de la derecha indican el lugar donde serán activados por ligandos extracelulares.

especializadas que formarán los extremos de la cabeza y de la cola de la futura larva y también definirán los rudimentos del futuro tubo digestivo. Los tres conjuntos de genes responsables de estos determinantes de localización se llaman genes de **polaridad del huevo anteriores**, **posteriores** y **terminales**.

Una cuarta marca territorial define el eje dorsoventral (véase la Figura 22–32): una proteína producida por las células foliculares, situadas por debajo de la futura región ventral del embrión, induce una activación localizada de otro receptor transmembrana llamado Toll, que actúa en la membrana del oocito. Los genes necesarios para esta función se llaman genes **dorsoventrales** de la polaridad del huevo.

Todos los genes de polaridad del huevo de estas cuatro clases son genes de efecto materno: el genoma materno es el decisivo y no el del cigoto. Así, una mosca cuyos cromosomas son mutantes en las dos copias del gen *Bicoid* pero que nace de una madre con una copia normal de *Bicoid*, se desarrolla con toda normalidad, sin ningún defecto en el patrón de la cabeza. Sin embargo, si esta mosca hija es una hembra, no se puede depositar mRNA Bicoid funcional en el interior de sus propios huevos y, en consecuencia, todos los embriones se desarrollarán sin cabeza, sea cual fuere el genotipo del padre.

Estas cuatro señales de polaridad, proporcionadas respectivamente por Bicoid, Nanos, Torso y Toll, ejercen su efecto regulando (de forma directa o indirecta) la expresión de los genes de los núcleos del blastodermo. La utilización de estas moléculas en la organización del huevo no es una característica general del desarrollo temprano de los animales, ya que sólo *Drosophila* y otros insectos estrechamente relacionados poseen el gen *Bicoid*. Aunque en este caso Toll se haya unido al grupo de moléculas que definen el patrón dorsoventral, su función más antigua y universal está en la respuesta inmune, tal como se explicó en el Capítulo 24.

Sin embargo, el sistema de polaridad del huevo presenta algunas características muy conservadas. Por ejemplo, la localización de mRNA *Nanos* en un extremo del huevo es inherente a la localización de los determinantes de las células germinales en este extremo del huevo, como ocurre en *C. elegans*. En fases más avanzadas del desarrollo, a medida que el genoma del cigoto entra en acción bajo la influencia del sistema de polaridad del huevo, se hacen aparentes más similitudes con otras especies animales. A continuación, se utilizará el sistema dorsoventral para ilustrar este punto.

Los genes de señalización dorsoventral crean un gradiente de proteína reguladora de genes nucleares

La activación local del receptor Toll en el lado ventral del huevo controla la distribución de Dorsal, una proteína reguladora del interior del huevo. La proteína Dorsal pertenece a la misma familia que la NFκB, que es una proteína reguladora de los vertebrados (descrito en el Capítulo 15). La actividad regulada por Toll, como en el caso de NFκB, depende de su traslocación desde el citoplasma, donde se mantiene en una forma inactiva, hasta el núcleo, donde regula la expresión génica. En el huevo acabado de poner, tanto el mRNA de *Dorsal*, detectado por hibridación *in situ*, como la proteína que codifica, detectada por anticuerpos, están distribuidas de manera uniforme por el citoplasma. No obstante, después de la migración de los núcleos hacia la periferia del embrión, para formar el blastodermo, tiene lugar una redistribución de la proteína Dorsal: dorsalmente, la proteína permanece en el citoplasma, pero ventralmente se concentra en los núcleos formándose un gradiente de concentración homogéneo entre estos dos extremos (**Figura 22–33**). La señal transmitida por la



Figura 22–33 Gradiente de concentración de la proteína Dorsal en los núcleos del blastodermo, revelado con un anticuerpo. Dorsalmente, la proteína se localiza en el citoplasma y fuera de los núcleos; ventralmente, se concentra en los núcleos y es eliminada del citoplasma. (De S. Roth, D. Stein y C. Nüsslein-Volhard, *Cell* 59:1189-1202, 1989. Con autorización de Elsevier.)

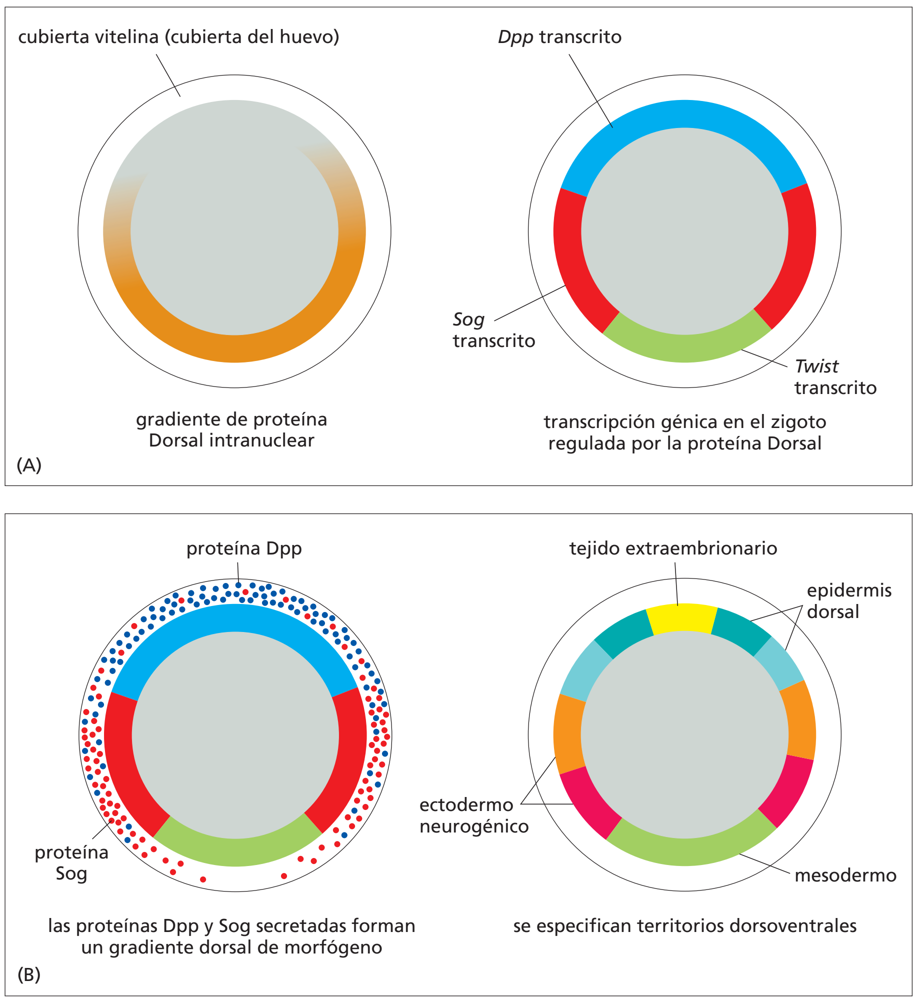


Figura 22–34 Gradientes de morfógeno que forman el patrón del eje dorsoventral del embrión. (A) El gradiente de la proteína Dorsal define tres territorios de expresión génica, marcados aquí por la expresión de tres genes representativos, *Dpp*, *Sog* y *Twist*. (B) Un poco más tarde, las células que expresan *Dpp* y *Sog* segregan, respectivamente, las proteínas señal Dpp (un miembro de la familia TGFβ) y Sog (un antagonista de Dpp). Estas dos proteínas difunden e interactúan una con otra (y con otros factores) generando un gradiente de actividad de Dpp que gobierna la formación de un patrón más detallado.

proteína Toll controla esta redistribución de Dorsal mediante una vía de señalización que es esencialmente la misma que la vía Toll-dependiente que interviene en la inmunidad innata.

Una vez dentro del núcleo, la proteína Dorsal inicia o impide, según sea su concentración, la expresión de diferentes grupos de genes. La expresión de cada gen que responde a la acción de Dorsal depende de su DNA regulador, específicamente del número y afinidad de los lugares de unión en este DNA para Dorsal u otras proteínas reguladoras. Por eso se dice que el DNA regulador *interpreta* la señal posicional que genera el gradiente de proteína Dorsal definiendo una serie de territorios dorsoventrales: bandas características de células que ocupan toda la longitud del embrión (**Figura 22–34**A). Sobre todo en la zona ventral, donde la concentración de Dorsal es la más alta, se inicia la expresión, por ejemplo, de un gen denominado *Twist*, que es específico para el mesodermo (**Figura 22–35**). En la zona dorsal, donde la concentración de Dorsal es la más baja, se activa *Decapentapléjico* (*Dpp*). Y en la zona intermedia, donde la concentración de Dorsal es lo bastante elevada para reprimir *Dpp*, pero demasiado baja para activar *Twist*, las células activan otro grupo de genes, incluyendo el llamado de *gastrulación corta (Sog)*.

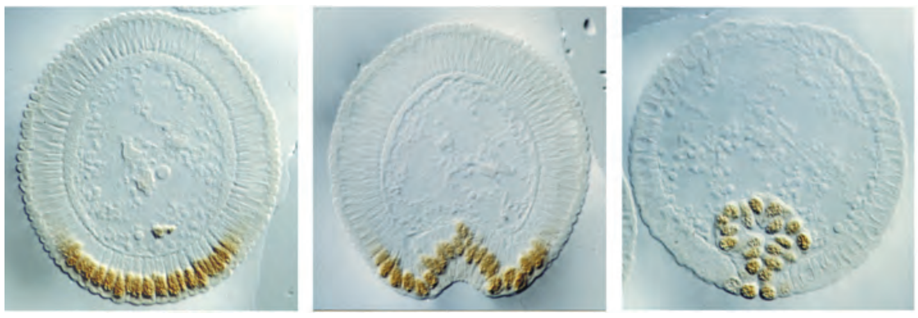


Figura 22–35 Origen del mesodermo a partir de células que expresan Twist. El embrión se ha fijado en fases sucesivas, se ha seccionado transversalmente y se ha teñido con un anticuerpo contra la proteína Twist, una proteína reguladora génica de la familia bHLH. Las células que expresan Twist se desplazan al interior del embrión y forman el mesodermo. (De M. Leptin, J. Casal, B. Grunewald y R. Reuter, *Development Suppl*. 23-31, 1992. Con autorización de The Company of Biologists.)

Dpp y Sog establecen un gradiente morfogénico secundario para perfeccionar el patrón de la parte dorsal del embrión

Los productos de los genes directamente regulados por Dorsal generan a su vez más señales locales que definen más subdivisiones en el eje dorsoventral. Estas señales intervienen después de la celularización y actúan como si se tratara de moléculas señal extracelulares convencionales. En particular, *Dpp* codifica la proteína de secreción Dpp, que produce un gradiente morfogénico local en la parte dorsal del embrión. A su vez, el gen *Sog*, codifica otra proteína de secreción que se produce en el ectodermo neurógeno y que actúa como antagonista de Dpp. La difusión opuesta de gradientes de estas dos proteínas causa un cambio súbito en la actividad de Dpp. Los niveles más altos de actividad de Dpp, combinados con otros factores, inducen el desarrollo de la mayor parte del tejido dorsal, es decir, de la membrana extraembrionaria; los niveles intermedios causan el desarrollo del ectodermo dorsal, y los niveles muy bajos, el desarrollo del ectodermo neurógeno (Figura 22–34B).

El eje dorsoventral de los insectos corresponde al eje ventrodorsal de los vertebrados

Dpp es un miembro de la superfamilia de moléculas señal llamada TGFβ, de gran importancia en los vertebrados. Sog es un homólogo de la proteína cordina de los vertebrados. Es sorprendente que, en vertebrados, un homólogo de Dpp (BMP4) actúe en compañía de cordina del mismo modo que lo hacen Dpp y Sog en *Drosophila*. Estas dos proteínas controlan el patrón dorsoventral del ectodermo, mediante niveles altos de cordina definiendo la región neurógena y niveles altos de BMP4 definiendo lo que no lo es. Esta acción, combinada con otras moléculas que también actúan en paralelo, sugiere que esta parte del esquema corporal se ha conservado en insectos y en vertebrados. No obstante, el eje está girado, de forma que el dorsal de la mosca corresponde al ventral de los vertebrados (**Figura 22–36**). Este hallazgo podría hacer suponer que, en algún momento de la historia evolutiva, el antecesor de una de estas clases de animales empezó a vivir boca abajo.

Tres clases de genes de segmentación perfeccionan el modelo materno anteroposterior y subdividen el embrión

Después de los gradientes iniciales de Bicoid y Nanos, los **genes de segmentación** perfeccionan el patrón. Mutaciones en algunos de estos genes de segmentación alteran el número de segmentos o su organización básica interna, sin afectar la polaridad global del embrión. Los genes de segmentación se expresan en subgrupos de células del embrión, de manera que sus productos son los primeros componentes del genoma propio del embrión, y no del genoma materno, que contribuyen al desarrollo. Por eso, se denominan *genes de efecto cigótico*, para distinguirlos de los genes de efecto materno.

Los genes de segmentación se clasifican en tres grupos según sus fenotipos mutantes (**Figura 22–37**). Aunque las funciones de estos tres grupos se solapan en el tiempo, es conveniente explicarlas suponiendo que actuasen secuencialmente uno tras otro. En primer lugar, los productos de seis o más **genes gap** marcan grandes subdivisiones en el embrión. Las mutaciones en un gen gap eliminan uno o más grupos de segmentos adyacentes y las mutaciones en distintos genes gap producen defectos diferentes aunque parcialmente solapados. Por ejemplo, en el mutante *Krüppel* la larva carece de ocho segmentos, desde el T1 hasta el A5 ambos inclusive.

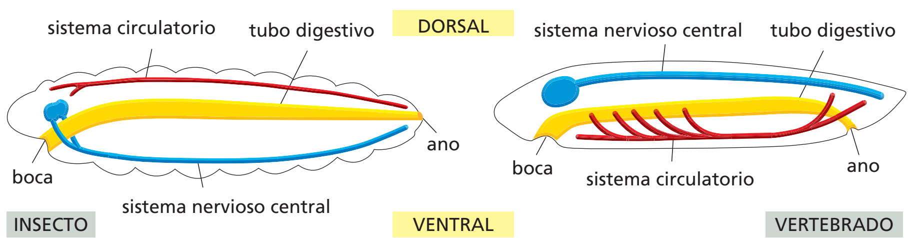


Figura 22–36 El plan corporal de un vertebrado como inversión dorsoventral del plan corporal de un insecto. El mecanismo de la formación del patrón dorsoventral en un vertebrado se describirá más adelante con más detalle en este capítulo. Nótese la correspondencia detallada del sistema circulatorio, el tubo digestivo y el sistema nervioso. En los insectos, el sistema circulatorio está representado por un corazón tubular y un vaso sanguíneo principal dorsal que bombea la sangre de ida a los espacios de los tejidos a través de un grupo de aberturas y recibe la sangre de retorno a través de otro grupo de aberturas. En contraste con los vertebrados, no existe ningún sistema de vasos capilares para retener la sangre cuando se extiende por los tejidos. Sin embargo, en vertebrados y en insectos el desarrollo del corazón depende de genes homólogos, reforzándose así las relaciones entre los dos planes corporales. (Según E.L. Ferguson, *Curr. Op. Genet. Dev*. 6:424-431, 1996. Con autorización de Elsevier.)

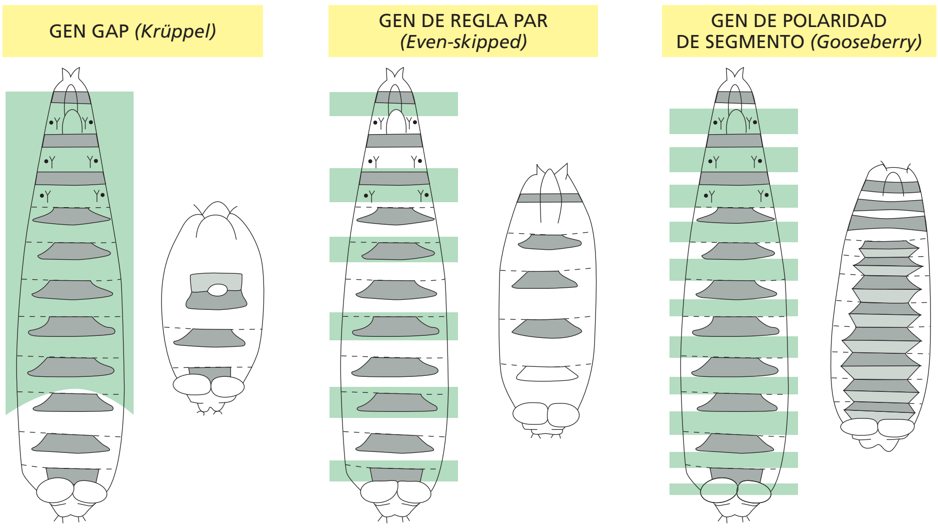


Figura 22–37 Ejemplos de fenotipos mutantes que afectan a los tres tipos de genes de segmentación. En cada caso, las áreas sombreadas en *verde* en la larva normal (*izquierda*) se han eliminado en el mutante o han sido reemplazadas por un duplicado especular de regiones no afectadas. (Modificado de C. Nüsslein-Volhard y E. Wieschaus, *Nature* 287:795-801, 1980. Con autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

La categoría siguiente en la génesis de la segmentación la forma un conjunto de ocho **genes de regla par**. Las mutaciones en estos genes causan una serie de deleciones que afectan a segmentos alternos, quedando el embrión con sólo la mitad de los segmentos que debería tener. Aunque todos los mutantes de regla par presentan esta periodicidad de dos segmentos, difieren en la localización precisa de las deleciones, relativa a los límites de los segmentos o parasegmentos. Por ejemplo, el mutante de regla par *Even-skipped (Eve)*, descrito en el Capítulo 7, carece de todos los parasegmentos impares, mientras que el mutante *Fushi tarazu (Ftz)* carece de los parasegmentos pares; el mutante *Hairy* carece de una serie de regiones de anchura similar a las unidades de parasegmentos que están fuera del registro.

Finalmente, existen por lo menos diez **genes de polaridad de segmento**. Las mutaciones en estos genes producen larvas con un número normal de segmentos, en los que una parte de cada uno ellos ha sido eliminada y reemplazada por un duplicado especular de todo o de parte del segmento restante. Por ejemplo, en mutantes *Gooseberry* la mitad posterior de cada segmento (es decir, la mitad anterior de cada parasegmento) se sustituye por un duplicado simétrico de la mitad del segmento adyacente anterior (véase la Figura 22–37).

Más adelante veremos que, paralelamente al proceso de segmentación, otro grupo de genes llamados *genes selectores homeóticos* definen y conservan las diferencias entre un segmento y el siguiente.

Los fenotipos de los diversos mutantes de segmentación sugieren que los genes de segmentación forman un sistema coordinado que, a lo largo del eje anteroposterior, subdivide el embrión en dominios progresivamente más pequeños, que se distinguen por sus diferentes patrones de expresión génica. La genética molecular ha contribuido a revelar cómo funciona este sistema.

La expresión localizada de los genes de segmentación se regula por la jerarquía de las señales posicionales

Unas tres cuartas partes de los genes de segmentación, incluyendo todos los genes gap y los de regla par, codifican proteínas reguladoras. Las interacciones entre ellas y con otros genes se observan comparando la expresión génica en embriones normales y mutantes. En efecto, mediante sondas apropiadas para detectar los transcritos o sus productos proteicos podemos tomar una instantánea de cada momento en que los genes se activan y se desactivan cambiando los patrones. Repitiendo el proceso con mutantes que carecen de un gen de segmentación determinado, es posible empezar a analizar cómo funciona el sistema completo de control genético.

Los productos de los genes de polaridad del huevo proporcionan las señales de localización global en el embrión temprano. Éstas hacen que determinados genes gap se expresen en regiones concretas. Los productos de los genes gap proporcionan una segunda tanda de señales posicionales que actúan más localmente regulando el perfeccionamiento de los deta-

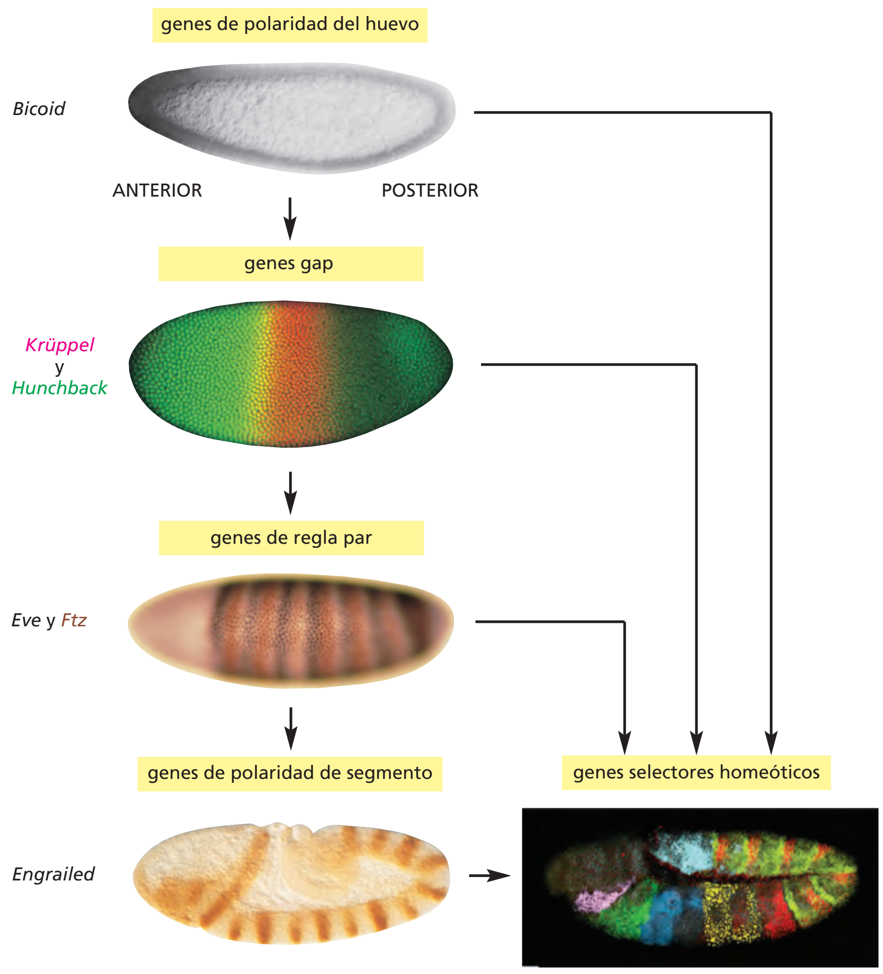


Figura 22–38 Regulación jerarquizada de los genes de polaridad del huevo, gap, de segmentación y selector homeótico. Las fotografías muestran los patrones de expresión de ejemplos representativos de genes de cada categoría, revelados por tinción con un anticuerpo contra sus productos. Los genes selectores homeóticos, descritos más adelante, definen tardíamente las diferencias entre un segmento y el siguiente. (Fotografías (i) de W. Driever y C. Nüsslein-Volhard, *Cell* 54:83-104, 1988. Con autorización de Elsevier; (ii) cortesía de Jim Langeland, Steve Paddock, Sean Carroll y el Instituto Médico Howard Hughes; (iii) de P.A. Lawrence, The Making of a Fly. Oxford, UK: Blackwell, 1992; (iv) de C. Hama, Z. Ali y T.B. Kornberg, *Genes Dev.* 4: 1079-1093, 1990. Con permiso de Cold Spring Harbor Laboratory Press; (v) cortesía de William McGinnis, adaptado de D. Kosman et al. *Science* 305:846, 2004. Con autorización de AAAS.)

lles del patrón, proceso en el que también intervienen otros genes, incluyendo los de regla par (**Figura 22–38**). Los genes de regla par, a su vez, colaboran unos con otros y con los genes gap estableciendo un patrón regular de expresión de los genes de polaridad de segmento y éstos también colaboran unos con otros definiendo el patrón interno de cada segmento. Por lo tanto, se trata de una estrategia de inducción secuencial (véase la Figura 22–16). Hacia el final del proceso, los gradientes globales producidos por los genes de polaridad inducen la formación de un modelo muy detallado gracias a la jerarquía de controles posicionales secuenciales, que son progresivamente más localizados. Debido a que las señales posicionales globales que inician el proceso no tienen que especificar de forma precisa los detalles, no es necesario que los núcleos sean gobernados con extrema precisión mediante pequeñas diferencias en la concentración de estas señales. En lugar de ello, entran en juego nuevas señales en cada momento de la secuencia que proporcionan diferencias localizadas significativas de concentración y definen nuevos detalles. Por lo tanto, la inducción secuencial es una estrategia efectiva. Actúa de una forma muy fiable produciendo embriones de mosca con el mismo patrón, a pesar de la impresión intrínseca de los sistemas de control biológico, y a pesar de las variaciones en condiciones tales como la temperatura a la que se desarrolla la mosca.

La naturaleza modular del DNA regulador permite que los genes tengan funciones múltiples controladas independientemente

El elaborado proceso de formación del patrón descrito depende de largas secuencias de DNA no codificante, que controlan cada uno de los genes que intervienen. Estas regiones enlazan múltiples copias de proteínas reguladoras producidas por los genes modeladores del patrón que se han expresado de antemano. Como un mecanismo de lógica binaria, un gen individual se activa y se desactiva en cada estadio del desarrollo, según sea la combinación de proteínas unidas a sus regiones reguladoras. En el Capítulo 7 se ha descrito un gen de

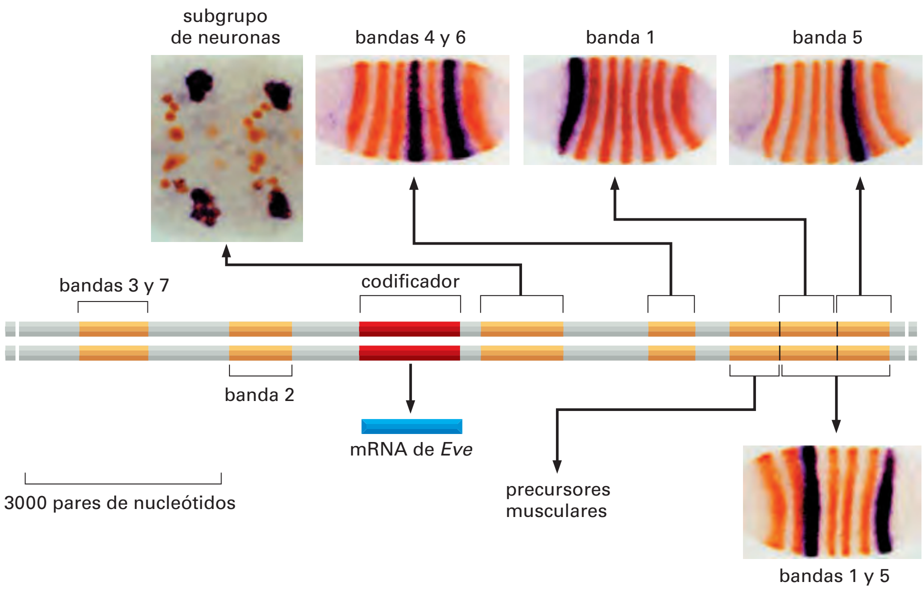


Figura 22–39 Organización modular del DNA regulador del gen *Eve*. En el experimento, se han unido fragmentos clonados de DNA regulador a un reportero *LacZ* (un gen bacteriano). Unos embriones transgénicos con estas construcciones se han teñido mediante hibridación *in situ,* para revelar el patrón de expresión de *LacZ* (*azul/oscuro*), y se han contrastado con un anticuerpo anti-Eve (*naranja*) para mostrar las posiciones de las bandas de expresión normal de *Eve*. Por lo tanto, se han encontrado diferentes segmentos de DNA regulador de *Eve* (*ocre*) que controlan su expresión en regiones correspondientes a las diferentes partes del patrón normal de expresión de *Eve*. Dos segmentos en tándem dirigen la expresión siguiendo un patrón que es la adición de los patrones generados por cada uno de ellos de forma individual. Módulos reguladores diferentes son responsables de la expresión de genes en diferentes momentos y en diferentes localizaciones: el panel situado más a la izquierda muestra la acción de un módulo que entra en juego más tarde que los demás y controla la expresión en un subgrupo de neuronas. (De M. Fujioka et al. *Development* 126:2527-538, 1999. Con autorización de The Company of Biologists.)

segmentación determinado: el gen de regla par *Even-skipped (Eve)*, y se ha explicado cómo se realiza la toma de decisión de transcribirse o no en base a todas esas combinaciones de entrada (véase la Figura 7–55). Se podría extrapolar este ejemplo para ilustrar algunos de los principios fundamentales en la formación del patrón de desarrollo.

La expresión de cada una de las bandas de *Eve* depende de módulos reguladores separados en el DNA regulador de *Eve*. Así, un módulo regulador es el responsable de que *Eve* exprese las bandas 1 + 5, otro para la banda 2, un tercero para las bandas 3 + 7 y un cuarto módulo para las bandas 4 + 6 (**Figura 22–39**). Según la concentración de productos de los genes de polaridad del huevo y de los genes *gap*, cada módulo regulador define un conjunto de premisas para la expresión génica. De esta forma, el DNA regulador de *Eve* participa en la traducción del complejo modelo no repetitivo de las proteínas de polaridad del huevo y *gap* en el patrón de expresión periódico de un gen de regla par.

La organización modular del DNA regulador de *Eve* que acabamos de describir es típica de la regulación génica en los animales pluricelulares y en las plantas, y tiene profundas implicaciones. Se puede generar casi cualquier patrón de expresión génica basado en cualquier otro mediante la unión consecutiva de los módulos correspondientes a diferentes combinaciones de proteínas reguladoras. La modularidad permite además que el DNA regulador defina patrones de expresión génica que no son sólo complejos sino que sus partes son ajustables de forma independiente. Un cambio en uno de los módulos puede alterar parte del patrón de expresión sin afectar el resto y sin necesidad de proteínas reguladoras que repercutirían en la expresión de otros genes. Como se ha descrito en el Capítulo 7, este DNA regulador es la clave de la compleja organización de las plantas y de los animales pluricelulares y sus propiedades hacen posible la adaptabilidad independiente de cada parte de la estructura corporal de un organismo a lo largo de la evolución.

La mayoría de los genes de segmentación también tienen funciones importantes en otros momentos y lugares durante el desarrollo de *Drosophila*. El gen *Eve*, por ejemplo, se expresa en subgrupos de neuronas, en las células precursoras del músculo y en varios otros lugares, bajo el control de activadores adicionales (véase la Figura 22–39). Mediante la adición de nuevos módulos al DNA regulador, cualquier gen puede ser incorporado durante la evolución para nuevos fines en nuevos lugares del cuerpo, sin detrimento de sus otras funciones.

Los genes de polaridad del huevo, los *gap* y los de regla par crean un patrón temporal que es recordado por otros genes

Los genes *gap* y los de regla par se activan durante las primeras horas después de la fecundación. Los productos del mRNA aparecen primero en patrones que sólo se aproximan a la imagen final; entonces, en un corto espacio de tiempo y mediante una distribución difuminada inicial de los productos génicos, se resuelve en un sistema regular de bandas defi-

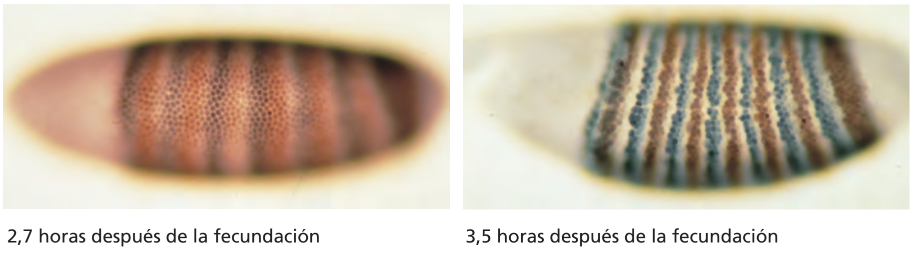


Figura 22–40 Formación de las bandas *Ftz* y *Eve* en el blastodermo de *Drosophila*. *Ftz* y *Eve* son genes de regla par. Su patrón de expresión (mostrado en *marrón* para *Ftz* y en *gris* para *Eve*) es borroso al principio pero rápidamente se resuelve en bandas definidas nítidamente. (De P.A. Lawrence, The Making of a Fly. Oxford, UK: Blackwell, 1992.)

nido débilmente (**Figura 22–40**). Pero este sistema es inestable y temporal. A medida que el embrión va avanzando en la gastrulación y las fases siguientes, el patrón segmentado de los productos de los genes *gap* y de regla par se desintegra. No obstante, sus acciones han dejado un conjunto de marcas permanentes que resultan en la persistente activación de determinados genes de polaridad de segmento y de genes selectores homeóticos cuya función es mantener la organización en segmentos de la larva y del adulto. El gen de polaridad de segmento llamado *Engrailed* constituye un buen ejemplo de ello. Los productos de su RNA se pueden observar en el blastodermo celular formando 14 franjas, cada una de ellas aproximadamente del grosor de una célula, y corresponden a las porciones más anteriores de los futuros parasegmentos (**Figura 22–41**).

Los genes de polaridad de segmento se expresan en patrones que se repiten de un parasegmento al siguiente y sus bandas de expresión muestran una relación definida con las bandas de expresión de los genes de regla par que intervienen en su inducción. Sin embargo, la generación de este patrón en cada parasegmento depende de las interacciones entre los genes de polaridad de segmento. Estas interacciones tienen lugar en los estadios siguientes a la partición del blastodermo en células individuales, cuando las señales célula-célula de tipo normal ya han entrado en juego. Un gran subconjunto de los genes de polaridad de segmento codifican componentes de dos vías de transducción de señales, la vía Wnt y la Hedgehog, incluyendo las proteínas señal Wingless (un miembro de la familia Wnt) y Hedgehog. Éstas se expresan en diferentes bandas de células que actúan de centros de señales en cada parasegmento, manteniendo y perfeccionando la expresión de otros genes de polaridad de segmento. Aunque su expresión inicial está determinada por los genes de regla par, las dos proteínas señal regulan una la expresión de la otra a modo de refuerzo mutuo y ayudan a activar la expresión de genes como *Engrailed* en los lugares exactos donde deben hacerlo.

El modelo de expresión de *Engrailed* permanece durante toda la vida, mucho tiempo después de que las señales hayan organizado su producción y hayan desaparecido (véase la Figura 22–41). Este ejemplo ilustra no sólo la progresiva subdivisión del embrión, por medio de señales cada vez más estrechamente localizadas, sino también la transición entre los sucesos de señalización temporal del desarrollo temprano y el mantenimiento estable de la información del desarrollo en fases más avanzadas.

Además de regular los genes de polaridad de segmento, los productos de los genes de regla par colaboran con los de los genes *gap* causando la activación perfectamente localizada

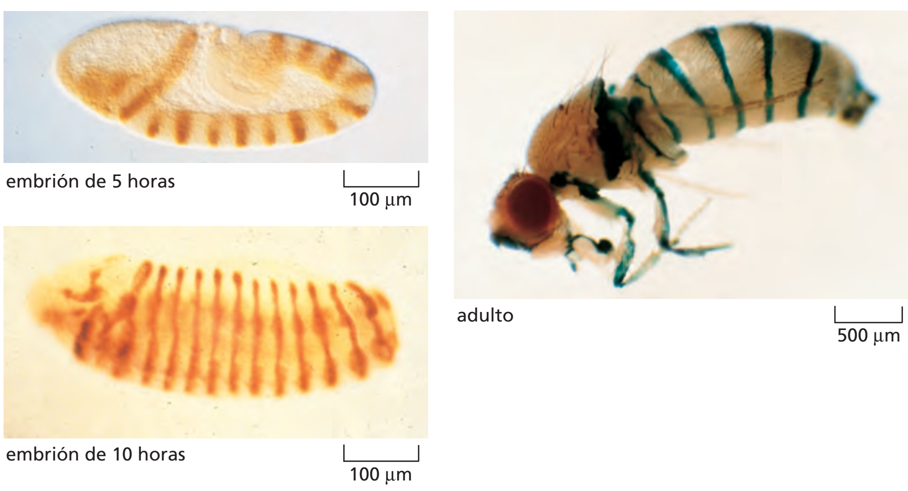


Figura 22–41 El patrón de expresión de *Engrailed*, un gen de polaridad de segmento. El patrón de *Engrailed* se muestra en un embrión de 5 horas (en el estadio de banda germinal extendida), en un embrión de 10 horas y en un adulto (cuyas alas se han arrancado en esta preparación). El patrón se revela mediante un anticuerpo (*marrón*) contra la proteína Engrailed (para los embriones de 5 y de 10 horas) o (para el adulto) mediante la confección de una cepa de *Drosophila* que contenga secuencias control del gen *Engrailed* acopladas a secuencias codificantes del gen marcador *LacZ*, cuya proteína se detecta histoquímicamente de color *azul* por el producto de la reacción que cataliza. Nótese que el patrón de *Engrailed*, una vez establecido, se preserva durante la vida del animal. (De C. Hama, Z. Ali y T.B. Kornberg, *Genes Dev*. 4:1079-1093, 1990. Con autorización de Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

de otro conjunto de marcas espaciales: los genes selectores homeóticos. Estos genes son los que distinguen permanentemente un parasegmento de otro. En el próximo apartado se examinarán estos genes selectores con detalle y consideraremos su papel en la memoria celular.

Resumen

La mosca Drosophila *ha sido el organismo modelo más utilizado en el estudio de la genética del desarrollo animal. Al igual que en otros insectos, su desarrollo empieza con una serie de divisiones nucleares que dan lugar a un sincitio y una gran parte del desarrollo temprano tiene lugar en el interior de esta célula plurinucleada. El patrón se origina mediante la asimetría del huevo, que se organiza gracias a las reservas de mRNA de su interior y a las señales que proceden de las células foliculares que lo rodean. La información posicional en el embrión plurinucleado se suministra mediante cuatro gradientes intracelulares establecidos por los productos de cuatro grupos de genes de efecto materno llamados genes de polaridad del huevo. Estos productos génicos controlan cuatro diferencias fundamentales del esquema corporal de los animales: la parte dorsal en contraposición a la parte ventral, el endodermo frente el mesodermo y el ectodermo, las células germinales frente a las células somáticas y el extremo anterior frente el posterior.*

Los genes de polaridad del huevo actúan estableciendo distribuciones graduales de proteínas reguladoras en el huevo y en el embrión. Los gradientes a lo largo del eje anteroposterior inician la expresión ordenada de los genes gap, de los genes de regla par, de los genes de polaridad del huevo y de los genes selectores homeóticos. Todos ellos, mediante una jerarquía de interacciones, se expresan en unas regiones del embrión y no en otras, subdividiendo progresivamente el blastodermo en series regulares de unidades modulares repetidas llamadas segmentos. Los complejos patrones de expresión génica reflejan la organización modular del DNA regulador, con activadores específicos de un gen determinado responsable de partes concretas de su patrón de expresión.

Los genes de polaridad de segmento entran en juego al final del proceso de la segmentación, después de que el sincitio se haya dividido en células separadas, y controlan la formación del patrón de cada segmento mediante la señalización célula-célula a través de las vías Wnt (Wingless) y Hedgehog. Este proceso conduce a una activación localizada persistente de genes como Engrailed *y proporciona a las células un recuerdo de su dirección anteroposterior dentro del segmento. Al mismo tiempo, se establece otro gradiente de señalización célula-célula a lo largo del eje dorsoventral en el que actúan como morfógenos un miembro de la familia* TGFβ *denominado Decapentapléjico (Dpp) y su antagonista llamado Short gastrulation. Este gradiente ayuda a perfeccionar la asignación de caracteres diferentes a las células situadas a diferentes niveles dorsoventrales. En vertebrados existen proteínas homólogas que controlan la formación del patrón dorsoventral.*

LOS GENES SELECTORES HOMEÓTICOS Y SU PAPEL EN LA FORMACIÓN DEL PATRÓN DEL EJE ANTEROPOSTERIOR

A medida que se va desarrollando, el cuerpo es cada vez más complejo. No obstante, en toda esta complejidad creciente existe una característica simplificadora que hace comprender todo el proceso del desarrollo. Una y otra vez, en cada especie y en cada nivel de organización, encontramos que las estructuras complejas están formadas por la repetición de unos cuantos temas básicos con variantes. Por lo tanto, hay un número limitado de tipos celulares diferenciados básicos como son las células musculares o los fibroblastos, que se repiten con sutiles variaciones individuales en diferentes lugares. Estos tipos celulares se organizan en una variedad limitada de tipos de tejidos, como el músculo o el tendón, los cuales se repiten a su vez con variaciones sutiles en regiones diferentes del cuerpo. A partir de los diversos tejidos se forman los órganos como los dientes o los dedos (los molares y los incisivos, los dedos de la mano y del pie, los dedos pulgares); en definitiva, unos cuantos tipos estructurales repetidos con variaciones.

Siempre que encontramos este fenómeno de *repetición modular*, podemos resumir el problema del biólogo del desarrollo en dos tipos de preguntas: ¿cuál es el mecanismo de construcción básico que es común a todos los objetos de una clase determinada? y ¿cómo se modifica este mecanismo para dar lugar a las variaciones observadas? El embrión se sirve de una estrategia combinatoria para generar su complejidad y el investigador puede utilizar a su vez, una estrategia combinatoria para comprenderlo.

Los segmentos del insecto constituyen un ejemplo muy claro de ello. Hemos explicado sucintamente de qué forma se construye el rudimento de un segmento típico. Ahora se considerará de qué forma un segmento se hace distinto de otro.



Figura 22–42 Mutación homeótica. La mosca que se muestra es un mutante *Antennapedia*. Sus antenas se han convertido en patas debido a una mutación en una región reguladora del gen *Antennapedia* que hace que este gen se exprese en la cabeza. Compárese con una mosca normal mostrada en la Figura 22–24. (Cortesía de Matthew Scott.)

El código Hox determina las diferencias entre el sector anterior y el posterior

Hace más de 80 años que se empezó a vislumbrar la respuesta genética a la pregunta de cómo cada segmento adquiere su identidad individual y fue gracias al descubrimiento de un primer conjunto de mutaciones de *Drosophila* que causan alteraciones caprichosas en la organización de la mosca adulta. Por ejemplo, en el mutante *Antennapedia* las patas salen de la cabeza donde debería haber antenas (**Figura 22–42**), mientras que en el mutante *Bithorax* aparece un par extra de pseudoalas donde normalmente debería haber unos apéndices mucho más pequeños denominados balancines. Estas mutaciones que transforman partes del cuerpo en estructuras que serían las apropiadas en otras localizaciones, se llaman *homeóticas*. Un grupo de **genes selectores homeóticos** determinan el carácter anteroposterior de los segmentos de la mosca.

Los genes de este grupo, que son ocho en la mosca, están relacionados entre sí como miembros de una gran familia multigénica y forman parte de uno de los dos conglomerados de genes conocidos como el **complejo Bithorax** y el **complejo Antennapedia**. Los genes del complejo Bithorax controlan las diferencias entre los segmentos abdominales y torácicos del cuerpo, mientras que los del complejo Antennapedia controlan las de los segmentos torácicos y de la cabeza. Las comparaciones con otras especies nos muestran que esencialmente los mismos genes están presentes en todos los animales, incluso en el hombre. Estas comparaciones también revelan que los complejos Antennapedia y Bithorax son las dos mitades de una sola entidad, llamada **complejo Hox**, el cual se ha dividido en el transcurso de la evolución de la mosca, y sus miembros actúan de modo coordinado ejerciendo su control sobre el patrón cabeza-cola del cuerpo.

Los genes selectores homeóticos codifican proteínas que se enlazan al DNA que interactúan con otras proteínas reguladoras

En una primera aproximación podríamos decir que, por lo general, un gen selector homeótico se expresa sólo en aquellas regiones que se desarrollan de manera anormal cuando el gen ha mutado o está ausente. Los productos de estos genes se pueden considerar como marcas moleculares de dirección que poseen las células de cada parasegmento y que, por lo tanto, están físicamente incorporadas al valor de posición de la célula. Si las marcas de dirección cambian, el parasegmento se comporta como si estuviera colocado en algún otro lugar; la deleción de todo el complejo tiene como consecuencia una larva cuyos segmentos son todos iguales (**Figura 22–43**).

Por lo tanto, el primer problema consiste en comprender cómo actúan los productos del gen selector homeótico sobre la maquinaria básica que diseña el segmento proporcionando a cada parasegmento su individualidad. Los productos de los genes selectores homeóticos son proteínas reguladoras génicas, todas ellas relacionadas por poseer un *homeodominio* altamente conservado de 60 aminoácidos de largo que se enlaza al DNA tal como se ha descrito en el Capítulo 7. El correspondiente fragmento de DNA se denomina *homeobox*, del cual toma nombre el complejo Hox, que es la abreviatura de homeobox.

Si los productos de los genes selectores homeóticos tienen regiones de unión al DNA similares, ¿cómo pueden ejercer efectos diferentes para que un parasegmento difiera del siguiente? La respuesta parece encontrarse en gran medida en los dominios de la proteína que no se unen de forma directa al DNA sino que interaccionan con otros complejos proteicos que se unen al DNA. Los distintos integrantes de estos complejos actúan junto con las pro-

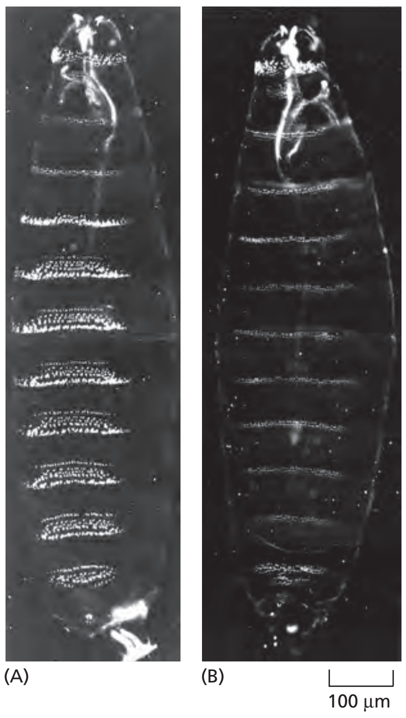


Figura 22–43 Efecto de la eliminación de la mayoría de los genes del complejo Bithorax. (A) Larva de *Drosophila* normal mostrada con iluminación de campo oscuro; (B) larva mutante de la que se ha eliminado la mayor parte del complejo Bithorax. En este mutante todos los parasegmentos posteriores al P5 se parecen a P5. (De G. Struhl, *Nature* 293:36-41, 1981. Con permiso de Macmillan Magazines Ltd.)

teínas selectoras homeóticas dictando qué sitios de unión al DNA se reconocerán y si el efecto sobre la transcripción será de activación o de represión. De esta forma, los productos de los genes selectores homeóticos se combinan con otras proteínas reguladoras y modulan sus acciones dando a cada parasegmento sus características propias.

Los genes selectores homeóticos se expresan secuencialmente según el orden que siguen en el complejo Hox

Para comprender de qué forma el complejo Hox proporciona valores posicionales a las células, hemos de tener en cuenta cómo se regula la expresión de los genes *Hox*. Las secuencias que codifican los ocho genes selectores homeóticos de los complejos Antennapedia y Bithorax están intercalados entre una gran cantidad de DNA regulador (cerca de un total de 650.000 pares de nucleótidos). Este DNA también presenta sitios de unión para los productos de los genes de polaridad del huevo y de polaridad de segmento. El DNA regulador del complejo Hox actúa como intérprete de las múltiples informaciones posicionales que proporcionan todas las proteínas reguladoras. Como respuesta, se transcribe un grupo determinado de genes selectores homeóticos, que son los apropiados para una localización concreta.

En el patrón de control se observa una notable regularidad. La secuencia en la que se ordenan los genes en el cromosoma, tanto en el caso del complejo Antennapedia como en el de Bithorax, corresponde casi con completa exactitud al orden en que se expresan a lo largo del eje corporal (**Figura 22–44**). Este hallazgo sugiere que los genes se activan en serie mediante algún proceso que es gradual (en duración o en intensidad) a lo largo del eje corporal y cuya acción se extiende gradualmente a lo largo del cromosoma. Por lo general el gen más “posterior” que se expresa en una célula es el más dominante: dirige la expresión de los genes “anteriores” previamente activados, dictando así el carácter que debe tener cada segmento. Los mecanismos reguladores subyacentes de estos fenómenos todavía no son bien conocidos, pero sus consecuencias son profundas. Más adelante se comprobará que la organización seriada de la expresión génica del complejo Hox es una característica fundamental que se ha conservado en el curso de la evolución.

En el genoma de la mosca, como en el de otras especies, existen centenares de otros genes que también contienen la secuencia homeobox pero la mayoría de ellos están dispersos y no agrupados en complejos como el Hox. Tienen muchas funciones reguladoras, pero una buena parte de ellos desempeña un papel similar al de los genes Hox: controlan las variaciones sobre un mismo tema básico del desarrollo. Por ejemplo, se pueden distinguir diferentes clases de neuronas unas de otras mediante la expresión de genes específicos pertenecientes a esta gran superfamilia.

El complejo Hox contiene un registro permanente de información posicional

El patrón espacial de expresión génica en el complejo Hox se establece mediante señales que actúan en las primeras fases del desarrollo, pero cuyas consecuencias son muy duraderas.

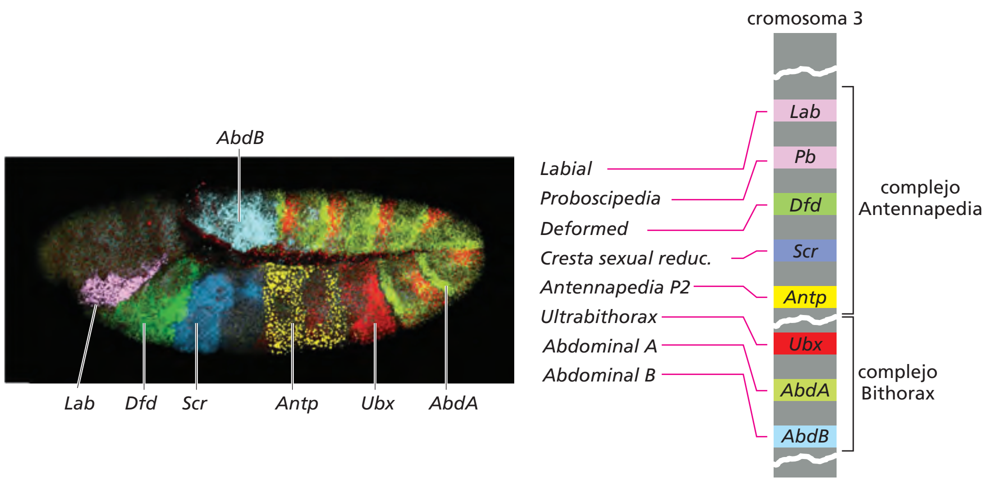


Figura 22–44 Patrones de expresión comparados con las localizaciones cromosómicas de los genes del complejo Hox. El diagrama muestra la secuencia de genes en cada una de las dos subdivisiones del complejo cromosómico. Esta secuencia se corresponde, con desviaciones mínimas, con la secuencia espacial en que se expresan los genes, mostrada en la fotografía de un embrión en la fase de banda terminal extendida, alrededor de 5 horas después de la fecundación. El embrión se ha teñido por hibridación *in situ* mediante diferentes sondas marcadas para detectar los mRNA producto de los diferentes genes Hox en diferentes colores. (Fotografía por cortesía de William McGinnis, adaptada de D. Kosman et al., *Science* 305:846, 2004. Con permiso de AAAS.)

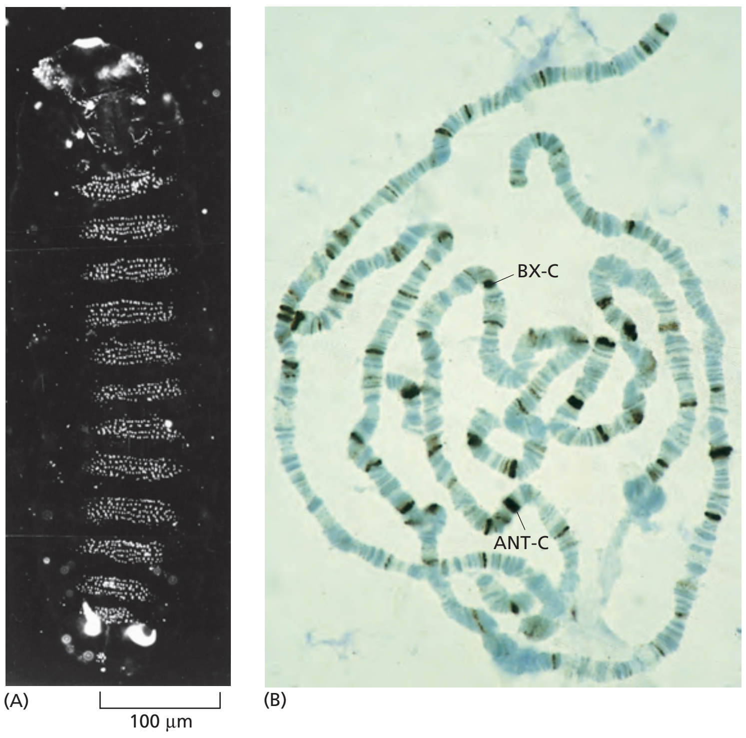


Figura 22–45 Actuación de los genes del grupo Polycomb. (A) Fotografía de un embrión mutante defectuoso para el gen *Extra sex combs* (*Esc*) y cuya madre también es defectuosa para este gen. El gen pertenece al grupo Polycomb. Prácticamente todos los segmentos se han transformado de forma que se parecen al segmento abdominal más posterior (compárese con la Figura 22–43). En el mutante, el patrón de expresión de los genes selectores homeóticos, que al principio es más o menos normal, es inestable de forma que enseguida todos estos genes se van activando a lo largo del eje corporal. (B) Distribución normal de los sitios de unión de la proteína Polycomb en los cromosomas gigantes de *Drosophila*, visualizados con un anticuerpo contra Polycomb. La proteína se une al complejo Antennapedia (ANT-C) y al complejo Bithorax (BX-C) y a 60 sitios más. (A, de G. Struhl, *Nature* 293:36-41, 1981. Con autorización de Macmillan Magazines Ltd; B, cortesía de B. Zink y R. Paro, *Trends Genet*. 6:416-421, 1990. Con autorización de Elsevier.)

Aunque el patrón de expresión sufra ajustes complejos en el transcurso del desarrollo, el complejo Hox se comporta en cada célula como si la posición anteroposterior que la célula ocupaba en el embrión temprano estuviera grabada de forma permanente. De esta forma, las células de cada segmento llevan consigo una memoria a largo plazo de su localización a lo largo del eje anteroposterior del cuerpo; en otras palabras, tienen un valor posicional anteroposterior. Como se indicará en la próxima sección, la traza de memoria grabada por el complejo Hox gobierna la identidad específica de cada uno de los segmentos, y no sólo de los larvarios sino también de las estructuras de la mosca adulta que se generan en un estadio muy posterior a partir de los discos imaginales larvarios y de otros reservorios de células precursoras imaginales de la larva.

El mecanismo molecular que memoriza la información posicional depende de dos tipos de entradas reguladoras. Una de ellas procede de los propios genes homeóticos, ya que muchas proteínas Hox activan la transcripción de sus propios genes. Otra entrada crucial es la que proviene de dos grandes grupos complementarios de proteínas que controlan la estructura de la cromatina, el *grupo Polycomb* y *el grupo Trithorax*. Si faltan estos reguladores, el patrón de expresión de los genes selectores homeóticos se establece de forma adecuada al principio pero no se mantiene correctamente cuando el embrión crece.

Los dos grupos de reguladores actúan de forma opuesta. Las proteínas del grupo Trithorax son necesarias para mantener la transcripción de los genes *Hox* en células donde ésta ya ha empezado. En cambio, las proteínas del grupo Polycomb forman complejos estables que se unen a la cromatina del complejo Hox y mantienen el estado de represión en las células donde los genes *Hox* no se han activado en el momento preciso (**Figura 22–45**). La memoria del desarrollo implica modificaciones covalentes específicas de las histonas de los nucleosomas cercanos a los genes *Hox*, hecho que conlleva cambios de estado de la cromatina que se perpetúan de una generación celular a la siguiente, como se ha explicado en los Capítulos 4 y 7.

También en vertebrados los genes selectores *Hox* controlan el eje anteroposterior

Se han encontrado homólogos de los genes selectores homeóticos de *Drosophila* en casi todas las especies estudiadas, desde los cnidarios (hidroideos) y los nematodos hasta los moluscos y los mamíferos. Es notable el hecho de que a menudo estos genes se agrupan en complejos similares al complejo Hox de los insectos. En el ratón encontramos cuatro de es-

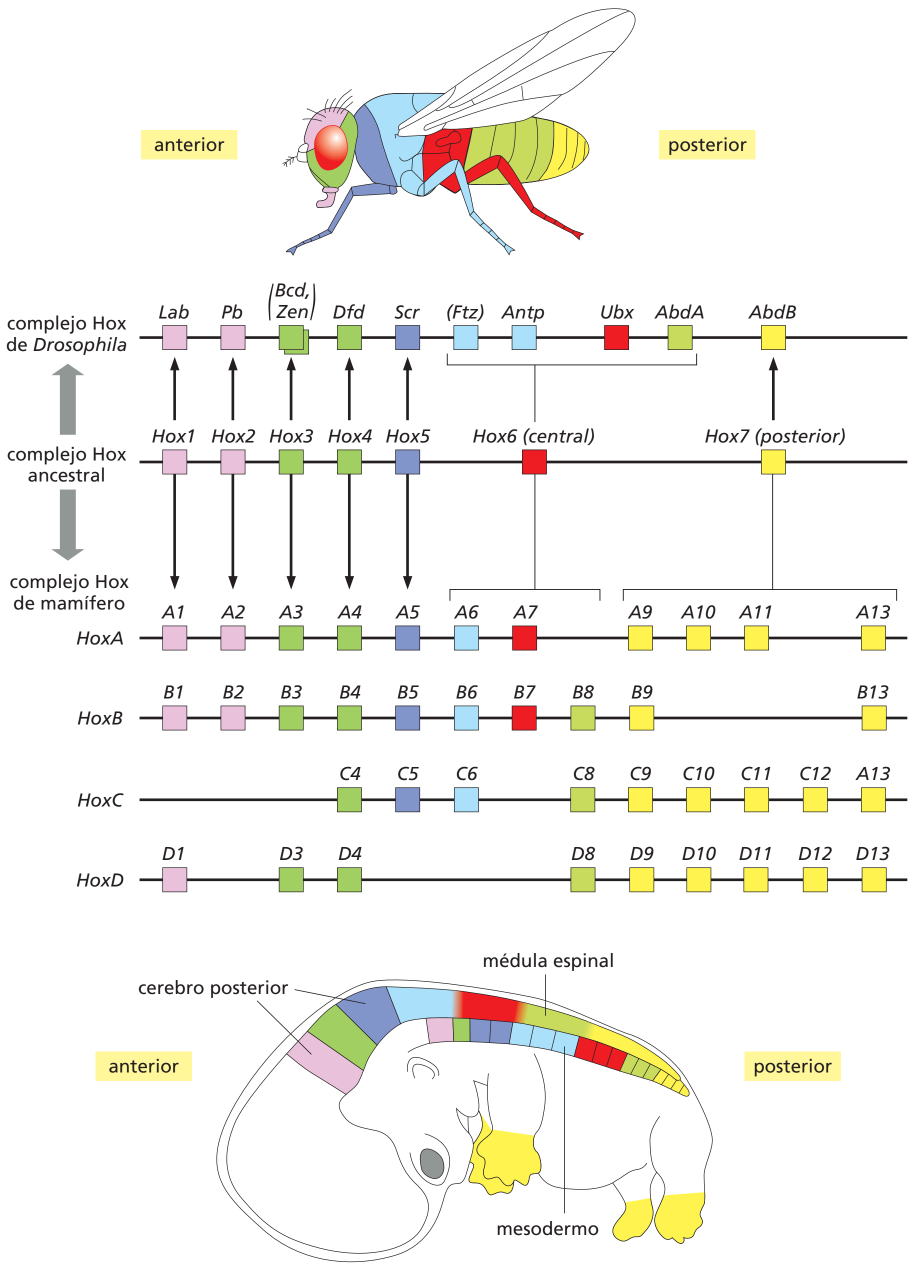


Figura 22–46 Comparación entre el complejo Hox de un insecto y los complejos Hox de un mamífero, y su relación con las regiones del cuerpo. Los genes de los complejos Antennapedia y Bithorax de *Drosophila* se muestran, en la línea superior, en el orden en que aparecen en el cromosoma; los genes correspondientes a los cuatro complejos Hox de mamífero se muestran debajo, también en el orden cromosómico. Los dominios de expresión génica en la mosca y en el mamífero se indican de forma simplificada en *colores* en los dibujos de arriba y de abajo. Sin embargo, los detalles de los patrones dependen de la fase de desarrollo y varían un poco de un complejo Hox de mamífero a otro. Además, en muchos casos, los genes mostrados como expresados en el dominio anterior también se expresan más posteriormente, solapando los dominios de los genes *Hox* más posteriores (véase, p. ej., Figura 22–47). Parece que los complejos han evolucionado de la forma siguiente: en algún ancestro común a gusanos, moscas y vertebrados, un solo gen primordial selector homeótico experimentó duplicaciones repetidas formando una serie de estos genes en tándem, el complejo Hox ancestral. En el sublinaje de *Drosophila* este complejo se escindió en dos complejos diferentes, Antennapedia y Bithorax. Mientras tanto, en el linaje que conduce a los mamíferos el complejo completo se duplicó varias veces dando lugar a los cuatro complejos Hox. El paralelismo no es perfecto puesto que, aparentemente, desde que los complejos divergieron algunos genes se duplicaron, otros desaparecieron y otros dieron lugar a propuestas diferentes (genes entre paréntesis en la línea superior). (Basado en un diagrama cedido amablemente por William McGinnis.)

tos complejos (los llamados *HoxA*, *HoxB*, *HoxC* y *HoxD*) cada uno de ellos en un cromosoma distinto. Los genes individuales de cada complejo se pueden reconocer según sus secuencias como copias de determinados miembros del conjunto de *Drosophila*. Como es obvio, los genes *Hox* de mamífero pueden funcionar en *Drosophila* como sustitutos parciales de los correspondientes genes *Hox* de *Drosophila*. Parece ser que cada uno de los cuatro complejos Hox de los mamíferos es, en general, equivalente a un complejo completo de insecto, es decir, un complejo Antennapedia más un complejo Bithorax (**Figura 22–46**).

En cada complejo Hox de vertebrado los genes están ordenados esencialmente de la misma forma como se hallan en el complejo Hox de insecto, hecho que sugiere que los cuatro complejos de los vertebrados se originaron mediante duplicaciones de un solo complejo inicial conservándose su organización básica. Más aún, cuando se examinan los patrones de expresión de los genes *Hox* en un embrión de vertebrado por hibridación *in situ*, resulta que los miembros de cada complejo se expresan en forma seriada desde la cabeza a la cola, a lo largo del eje del cuerpo, justo igual como lo hacen en *Drosophila* (**Figura 22–47**). El patrón se observa más claramente en el tubo neural, pero también es visible en otros tejidos, sobre todo en el mesodermo. Con raras excepciones, la ordenación anatómica se corresponde con la ordenación cromosómica de los genes en cada complejo; los genes correspondientes de los diferentes complejos Hox tienen dominios de expresión anteroposteriores casi idénticos.

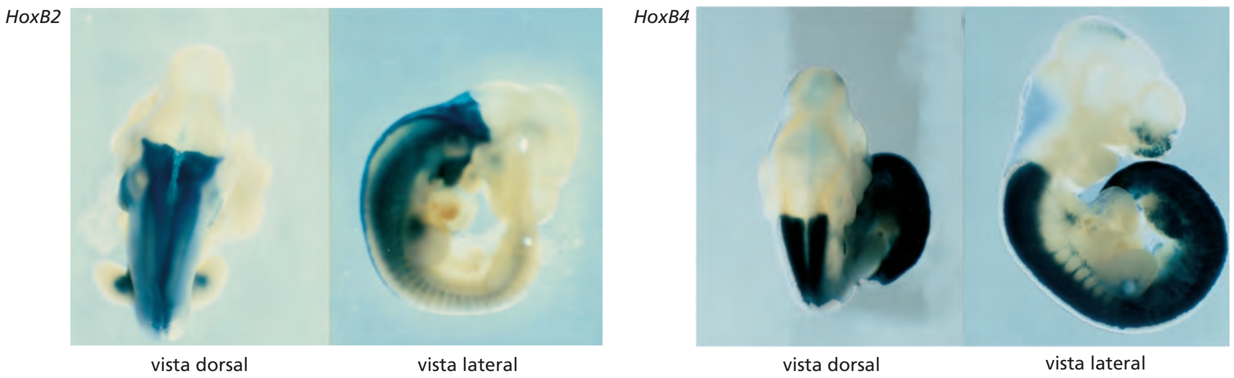


Figura 22–47 Dominios de expresión de los genes Hox en el ratón. Las fotografías muestran embriones enteros exponiendo los dominios de expresión de dos genes del complejo HoxB (*tinción azul*). Estos dominios pueden revelarse por hibridación *in situ* o, como en estos ejemplos, por confección de ratones transgénicos que contengan la secuencia control de un gen *Hox* acoplada a un gen marcador *LacZ*, cuyo producto se detecta histoquímicamente. Cada gen se expresa en una larga extensión de tejido con un límite anterior bien definido. Este límite se corresponde con la posición del gen en el complejo cromosómico. Así, con pocas excepciones, los dominios anatómicos de genes sucesivos forman un grupo ordenado de acuerdo con el orden de los genes en el complejo cromosómico. (Por cortesía de Robb Krumlauf.)

Los dominios de expresión génica definen un sistema de correspondencias entre las regiones corporales del insecto y las del vertebrado (véase la Figura 22–46). Los parasegmentos de la mosca corresponden a una serie de segmentos marcados en la parte anterior del embrión de vertebrado. Éstos están más claramente delimitados en el cerebro posterior (véanse las Figuras 22–46 y 22–47), donde reciben el nombre de *rombómeros*. En los tejidos laterales del cerebro posterior la segmentación se observa en las series de *arcos branquiales*, que son prominentes en todos los embriones de vertebrados y son los precursores del sistema branquial en los peces y de las mandíbulas y de las estructuras del cuello en los mamíferos; cada par de rombómeros del cerebro posterior corresponde a un arco branquial. Igual que en *Drosophila*, en el cerebro posterior las uniones de los dominios de expresión de muchos de los genes *Hox* están alineadas con las uniones de los segmentos anatómicos.

Los productos de los genes *Hox* de mamíferos especifican valores posicionales que controlan el patrón anteroposterior de parte del cerebro posterior, el cuello y el tronco, así como el de otras zonas. Como ocurre en *Drosophila*, cuando un gen *Hox* posterior se expresa de forma artificial en una región anterior puede hacer que el tejido anterior tenga un carácter posterior. Y a la inversa, la pérdida de los genes *Hox* posteriores hace que el tejido posterior donde por lo general se expresan adopte un carácter anterior (**Figura 22–48**). Las transformaciones observadas en ratones mutantes de Hox no siempre son tan directas y a menudo son incompletas a causa de una redundancia de genes de los cuatro grupos Hox. Pero parece claro que la mosca y el ratón se sirven de la misma maquinaria para dar caracteres individuales a sucesivas regiones, por lo menos en una parte del eje anteroposterior.

Resumen

La complejidad del cuerpo adulto de un animal se construye mediante la repetición modulada de unos cuantos tipos estructurales básicos. Es decir que, por encima del patrón de expresión génica que se repite en cada segmento, existe un patrón de expresión seriado de los genes selectores homeóticos que confiere a cada segmento una identidad propia. Los genes selectores homeóticos codifican proteínas que se enlazan al DNA y pertenecen a la familia del homeodominio. En el genoma de Drosophila *estos genes se clasifican en dos grupos, llamados complejos Antennapedia y Bithorax; parece que estos dos grupos constituyen las dos partes de un solo complejo Hox primordial que se dividió durante la evolución. En cada complejo, los genes se ordenan en una secuencia que corresponde a su secuencia de expresión a lo largo del eje corporal. La expresión del gen Hox se inicia en el embrión y se mantiene gracias a la acción de las proteínas de los grupos Polycomb y Trithorax, que marcan la cromatina del complejo Hox con un recuerdo hereditario de su estado embrionario. En todos los tipos de animales que se han estudiado, desde los cnidarios hasta los humanos, existen homólogos del complejo Hox de* Drosophila, *y en todos ellos ha conservado evolutivamente su papel en el diseño del eje anteroposterior. Los mamíferos poseen cuatro complejos Hox, con una relación similar entre la ordenación seriada en el cromosoma y su patrón de expresión seriado.*

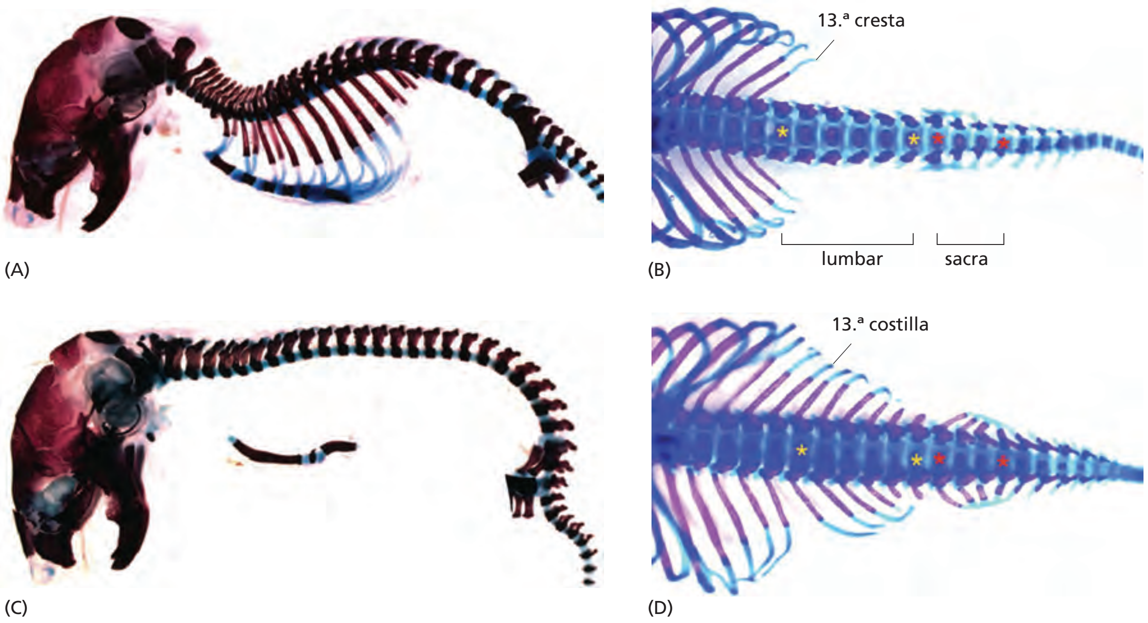


Figura 22–48 El control del patrón anteroposterior por los genes *Hox* en el ratón. (A, B) Un ratón normal tiene alrededor de 65 vértebras, cuyas estructuras se diferencian de acuerdo con su posición a lo largo del eje corporal: 7 cervicales (cuello), 13 torácicas (con crestas), 6 lumbares (marcadas con los asteriscos *amarillos* en (B)), 4 sacras (marcadas con los asteriscos *rojos* en (B)) y alrededor de 35 caudales (cola). (A) vista lateral; (B) vista dorsal; para mayor claridad, las extremidades se han suprimido en los dibujos. (C) El gen *HoxA10* por lo general se expresa en la región lumbar (junto con sus parálogos *HoxC10* y *HoxD10)*; en este caso, se expresan artificialmente en la totalidad del tejido vertebral a lo largo del eje corporal en desarrollo. Como resultado, todas las vértebras cervicales y torácicas han adquirido el carácter lumbar. (D) En cambio, cuando se anula *HoxA10* junto con *HoxC10* y *HoxD10,* las vértebras que por lo general tendrían un carácter lumbar o sacro, adquieren el carácter torácico. (A y C, de M. Carapuço et al., *Genes Dev*. 19:2116-2121, 2005. Con autorización de Cold Spring Harbor Laboratory Press; B y D, de D.M. Wellik y M.R. Capecchi, *Science* 301:363-367, 2003. Con autorización de AAAS.)

ORGANOGÉNESIS Y DISEÑO DE LOS APÉNDICES

Los segmentos de la larva de insecto son variaciones sobre un mismo tema básico, con los genes de segmentación que definen el módulo repetitivo básico y los genes selectores homeóticos que dan a cada segmento su carácter propio. Lo mismo puede aplicarse a los apéndices principales del cuerpo del insecto adulto: patas, alas, antenas, piezas bucales y genitales externos también son variaciones de un tema básico común. A otro nivel de detalle, encontramos la misma maravillosa simplificación: los apéndices y otras partes del cuerpo están formados por subestructuras que también son variaciones de unos cuantos temas básicos que se han conservado durante la evolución.

En esta sección seguiremos el curso del desarrollo de *Drosophila* hasta llegar a su etapa final y la atención se centrará en cada uno de los pasos, examinando un ejemplo de las muchas estructuras relacionadas que se desarrollan en paralelo. Al mismo tiempo, se señalarán paralelismos con estructuras de vertebrados que se desarrollan de modo similar y no sólo utilizan las mismas estrategias sino también muchos de los mismos mecanismos moleculares específicos.

Con el fin de evitar interrupciones en la exposición, explicaremos primero brevemente algunos de los experimentos clave en biología molecular que han sido necesarios para hacer frente al problema especial que surge cuando intentamos descubrir cómo los genes controlan las etapas avanzadas del desarrollo.

Las mutaciones somáticas condicionales e inducidas hacen posible el análisis de las funciones génicas en el desarrollo tardío

Como hemos destacado, un mismo gen puede ser utilizado repetidamente en muchas situaciones, en diferentes partes del cuerpo y en momentos diferentes. A menudo, las mutaciones de pérdida de función alteran de forma tan grave al embrión temprano que éste, o la larva, muere y no da la oportunidad de observar cómo afectaría la mutación en procesos posteriores.

Una de las maneras de tratar este problema es el estudio de las mutaciones condicionales. Si disponemos, por ejemplo, de una mutación sensible a la temperatura del gen que nos interesa, podemos mantener al animal a temperatura baja durante el desarrollo temprano, en el cual el producto del gen funciona correctamente, y luego inhabilitar el producto de este gen en cualquier momento sometiendo el embrión a temperatura alta y observando qué funciones tardías se alteran.

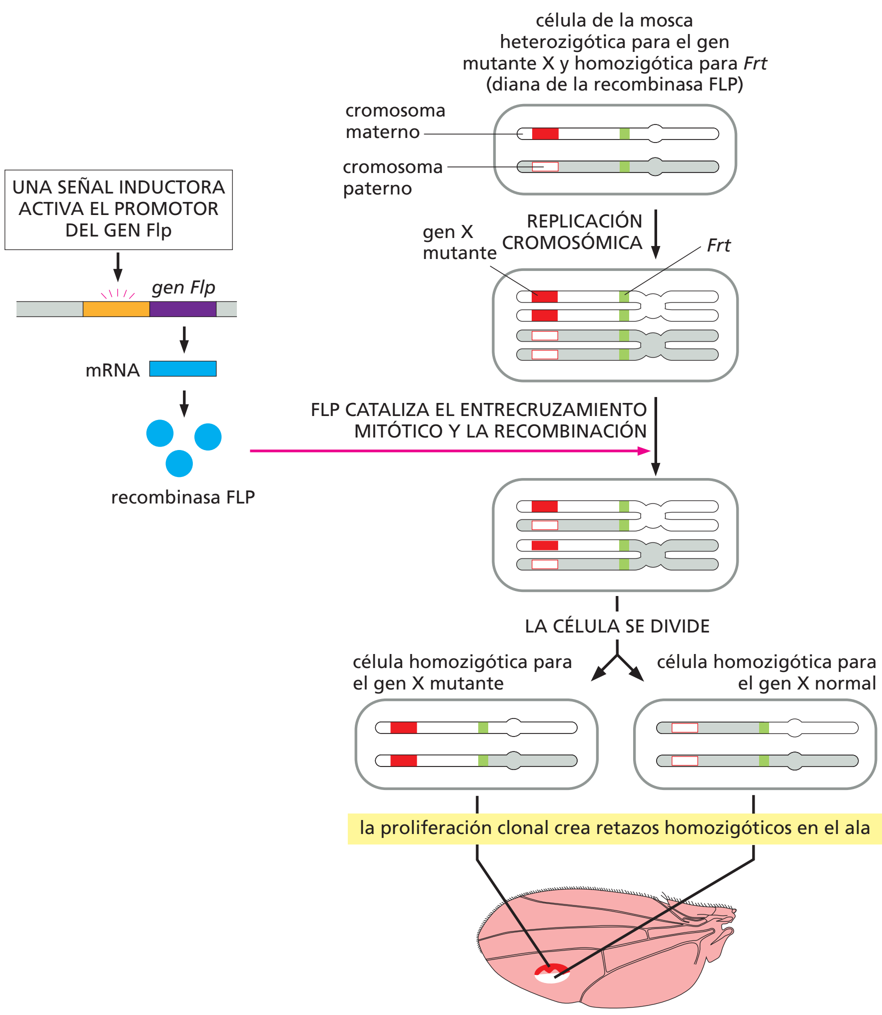


Figura 22–49 Generación de células mutantes mediante la inducción de recombinación somática. Los diagramas siguen los destinos de un solo par de cromosomas homólogos, uno de ellos procedente del padre (*sombreado*) y el otro procedente de la madre (*no sombreado*). Estos cromosomas tienen un elemento *Frt* (*verde*) insertado junto al centrómero y contienen un locus para un gen de interés, gen X, en el mismo brazo del cromosoma. El cromosoma paterno (en este ejemplo) lleva el alelo tipo salvaje del gen X (*rectángulo rojo vacío*) y el cromosoma materno lleva el alelo recesivo mutante (*rectángulo rojo lleno*). La recombinación mediante el intercambio de DNA entre los cromosomas materno y paterno, catalizada por la recombinasa FLP, da lugar a un par de células hijas, una de ellas con dos copias del tipo salvaje del gen X, y la otra con dos copias mutantes. Para ayudar a identificar a las células en las que ha tenido lugar la recombinación, se puede escoger que los cromosomas materno y paterno lleven, respectivamente, las versiones mutante y salvaje de un gen adicional provisto de una marca visible, por ejemplo un gen de pigmentación (no mostrado), y dispuesto en el cromosoma de tal manera que la recombinación implique el locus del marcador y altere de forma visible la apariencia de las células; de este modo, se utiliza como signo seguro de que el gen X también ha experimentado la recombinación.

Otros métodos implican una modificación directa del DNA en subgrupos de células que se hallan en etapas tardías del desarrollo; se trata de una especie de cirugía genética aplicada a células individuales que permite generar grupos de células mutantes con un genotipo determinado en cualquier momento del desarrollo celular. Este notable logro científico se consigue mediante *recombinación somática inducida*; el organismo resultante recibe el nombre de **mosaico genético**.

Gracias a los mosaicos genéticos, no sólo se evita el problema de la letalidad de la función génica alterada en el organismo completo sino que además permite explorar la función del gen en las interacciones célula-célula, mediante la yuxtaposición de células mutantes y no mutantes. Por ejemplo, podemos examinar si las células se sirven o no del producto génico para enviar una señal a sus vecinas o para recibir una señal de ellas. Induciendo el cambio genético en momentos diferentes podemos precisar cuándo actúa el gen para producir un efecto determinado.

Una técnica habitual de recombinación somática inducida utiliza moscas transgénicas que se han criado de manera que contengan dos elementos genéticos derivados de la levadura: el gen de la recombinasa FLP, que es específica de un sitio determinado, y la secuencia diana de la recombinasa FLP (FRT). De forma característica, el animal es homocigótico para la secuencia de FRT, la cual se inserta cerca del centrómero en el brazo del cromosoma adecuado, mientras que otra construcción consistente en el gen *Flp* se inserta en cualquier sitio del genoma bajo el control de un promotor de choque térmico. Si este embrión o larva transgénica se somete a un choque térmico, es decir, se expone a una temperatura elevada durante unos minutos, se induce la expresión de *Flp* y esta enzima cataliza el entrecruzamiento y la recombinación de los cromosomas materno y paterno en el sitio FRT. Si el choque térmico se ajusta de manera que sea lo bastante suave, sólo tendrá efecto en una o en algunas células esparcidas al azar. Como se explica en la **Figura 22–49**, si el animal es, al mismo tiempo, heterocigoto para el gen que nos interesa en la región cromosómica entrecruzada, el proceso

dará como resultado un par de células hijas que serán homocigotas y una de ellas recibirá dos copias del alelo materno del gen, mientras que la otra recibirá las dos copias del alelo paterno. Cada una de estas células hijas crecerá con normalidad y se dividirá dando lugar a retazos clónicos de progenie homocigótica.

El entrecruzamiento se puede detectar si el animal escogido también es heterocigoto para un marcador genético situado en el mismo brazo cromosómico que el gen de interés y, por tanto, también experimenta entrecruzamiento. De esta forma se pueden diseñar clones mutantes homocigotos a nuestra elección. Tanto la pareja de elementos de recombinación FLP y FRT como la pareja análoga Cre y Lox pueden utilizarse en otras configuraciones para activar o desactivar la expresión de un gen (véase la Figura 5–79). Mediante estas técnicas podemos descubrir qué ocurre, por ejemplo, cuando se induce a las células a sintetizar una molécula señal determinada en un sitio anormal o cuando se elimina un determinado receptor.

En vez de utilizar un promotor de choque térmico para inducir la expresión de la recombinasa FLP, se puede utilizar la secuencia reguladora de un gen del genoma normal de mosca que se exprese en un lugar y en un momento determinado de nuestro interés. La recombinación se activará y obtendremos células mutantes en los lugares precisos donde normalmente se expresaría el gen. Una variante de esta técnica utiliza la maquinaria de regulación transcripcional de la levadura en vez de la maquinaria de recombinación genética, de forma que se puede activar y desactivar de manera reversible la expresión de un determinado gen de mosca según sea el patrón normal de expresión de otro gen de mosca elegido (**Figura 22–50**).

Activando y desactivando funciones génicas en lugares y momentos específicos, los biólogos del desarrollo pueden empezar a descifrar el sistema de señales y respuestas especificadas genéticamente que controlan el diseño de cualquier órgano del cuerpo.

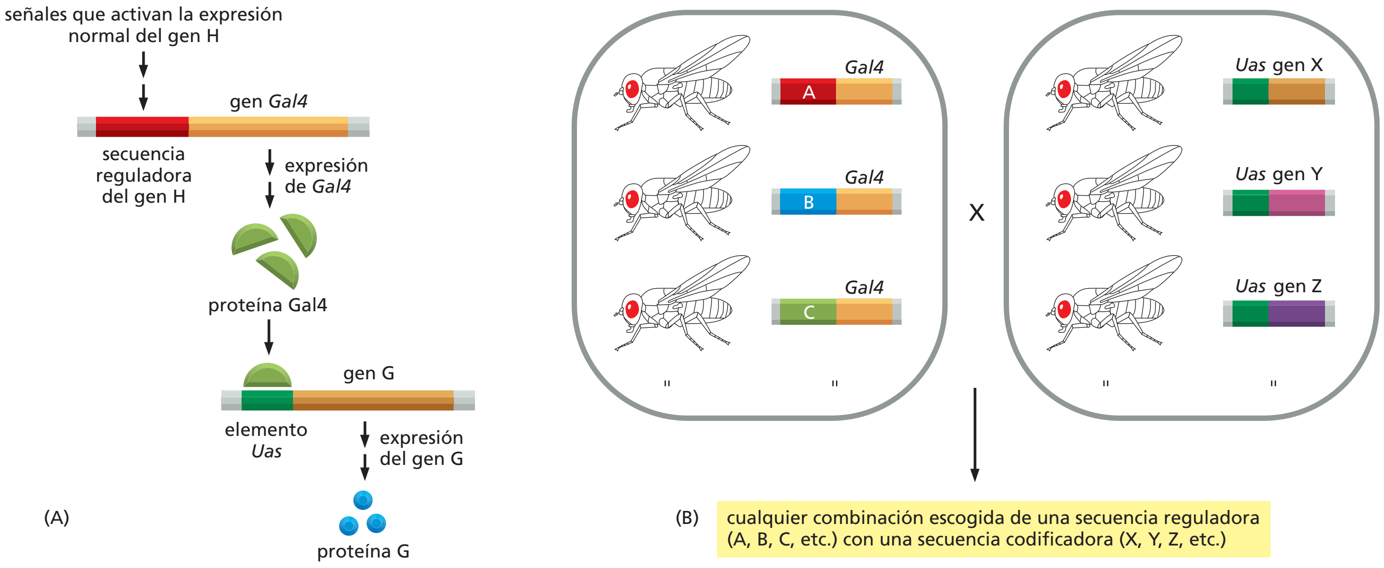


Figura 22–50 Técnica *Gal4/Uas* para controlar la expresión errónea de un gen en *Drosophila*. El método permite llevar a cabo la expresión de un gen G escogido en un lugar y en un momento en los que algún otro gen H de *Drosophila* se exprese normalmente. (A) Se confecciona un animal transgénico, con dos construcciones separadas insertas en su genoma. Uno de los insertos consiste en una secuencia reguladora específica procedente de levadura, llamada elemento *Uas* (***u**pstream **a**ctivating **s**equence*; secuencia activadora corriente arriba) acoplada a una copia de la secuencia codificadora del gen G. El otro inserto contiene la secuencia codificadora del gen de levadura *Gal4*, cuyo producto es una proteína reguladora génica específica de levadura que se une al elemento *Uas*; este inserto *Gal4* se coloca cerca de la región reguladora del gen H, quedando regulado por esta región reguladora. Dondequiera que el gen H se exprese normalmente, también se fabricará la proteína Gal4 lo cual conlleva la transcripción del gen G. (B) Aunque se puede llegar al mismo resultado ligando de forma directa una copia de la secuencia reguladora de H con la secuencia codificadora de G, la técnica *Gal4/Uas* permite una estrategia más eficiente a largo plazo. Se confeccionan dos "bibliotecas" de moscas transgénicas, una que contenga insertos *Gal4* cuya expresión está dirigida por secuencias reguladoras de genes diferentes A, B, C etc., y la otra con insertos *Uas* que dirigen diferentes regiones codificadoras X, Y, Z etc. Por cruzamiento de una mosca de una biblioteca con una mosca de la otra, cualquier secuencia codificadora que se desee puede estar acoplada en términos funcionales a cualquier secuencia reguladora. Para generar una biblioteca de moscas con inserciones *Gal4* en sitios convenientes, primero se confeccionan las moscas con inserciones *Gal4* en sitios al azar en su genoma. Entonces se cruzan con moscas que contengan el elemento *Uas* ligado a un gen marcador con un producto fácilmente detectable. La expresión del marcador revela si *Gal4* ha sido insertado en el sitio en el que se induce su expresión bajo el control de un activador de interés; se han criado y estudiado moscas con un patrón interesante de marcadores. Esta técnica recibe el nombre de caza del activador, puesto que facilita una vía para rastrear y caracterizar secuencias reguladoras de interés en el genoma.

Las partes del cuerpo de la mosca adulta se desarrollan a partir de los discos imaginales

Las estructuras externas de la mosca adulta se forman principalmente a partir de unos rudimentos llamados **discos imaginales** que son agrupaciones de células aparentemente indiferenciadas que se mantienen aparte en cada segmento de la larva. Los discos son bolsas de epitelio en forma de vesículas arrugadas y aplanadas que forman un continuo con la epidermis (la capa superficial) de la larva. Existen un total de 19 discos, colocados en 9 pares a cada lado de la larva y uno en la línea media (**Figura 22–51**). Estos discos crecen y desarrollan su patrón interno mientras la larva va creciendo, hasta que en la metamorfosis finalmente revierten (se dan la vuelta de dentro a fuera), se extienden y se diferencian abiertamente formando la epidermis del adulto. Los ojos y las antenas se desarrollan a partir de un par de discos, las alas y parte del tórax de otro, el primer par de patas de otro y así sucesivamente.

Los genes selectores homeóticos son esenciales en la memoria de la información posicional en las células de los discos imaginales

Las células de un disco imaginal parecen iguales a las de otros discos, pero los experimentos con injertos muestran que ya están regionalmente determinadas y no son equivalentes. Si, en la larva, se trasplanta un disco imaginal a la posición de otro y se deja que transcurra la metamorfosis, el disco injertado se diferencia de forma autónoma en la estructura correspondiente a su origen; es decir, un disco de ala dará estructuras de ala, un disco de balancín dará balancines, sea cual sea su nueva localización. Este hecho evidencia que los discos imaginales están gobernados por el recuerdo de la posición que ocupaban originalmente. Mediante un procedimiento más complejo de injertos en serie, que permite que las células de los discos imaginales proliferen durante un periodo largo antes de diferenciarse, se puede mostrar que este recuerdo se hereda de forma estable (con pocas excepciones) durante un gran número de generaciones celulares.

Los genes selectores homeóticos son componentes esenciales del mecanismo de memoria. Si en algún estadio durante el largo periodo que lleva a la diferenciación en la metamorfosis, se eliminan, por recombinación somática inducida, las dos copias de un gen selector homeótico de un clon de células de disco imaginal que por lo general expresaría este gen, estas células se diferenciarán en estructuras incorrectas, como si pertenecieran a otro segmento del cuerpo. Ésta y otras observaciones indican que la memoria de información posicional de cada célula depende de la actividad continuada de los genes selectores homeóticos. Esta memoria, además, se expresa con autonomía celular; es decir, cada célula mantiene su estado individual, según su propia historia y su genoma.

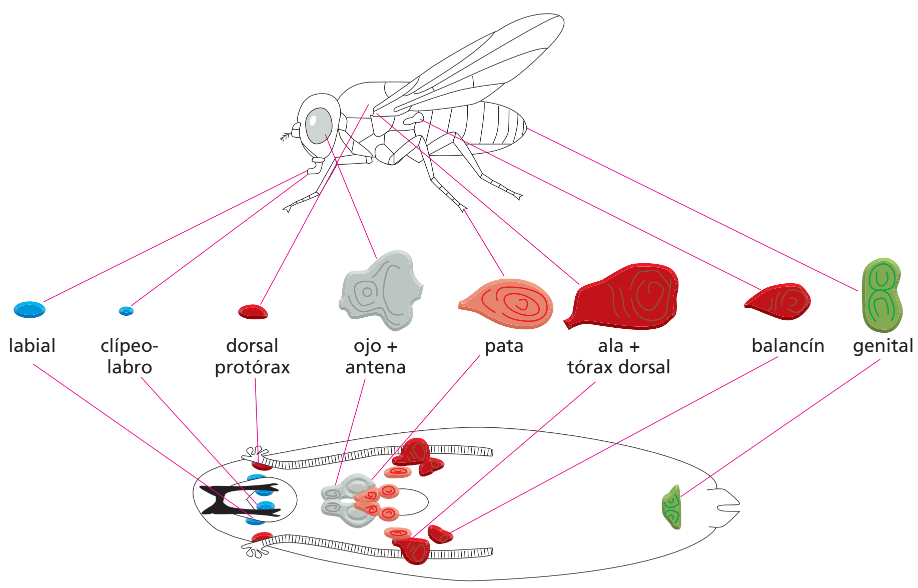


Figura 22–51 Los discos imaginales en la larva de *Drosophila* y las estructuras a que dan lugar en el adulto. (Según J.W. Fristrom et al, en Problems in Biology: RNA in Development [E.W. Hanley, ed.], p. 382. Salt Lake City: University of Utah Press, 1969.)



Figura 22–52 Expresión de *Distal-less* en el desarrollo de las patas y de los apéndices relacionados en varias especies. (A) Larva de erizo de mar. (B) Larva de polilla. (A, de G. Panganiban et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:5162-5166, 1997. National Academy of Sciences; B, de G. Panganiban, L. Nagy y S.B. Carroll, *Curr. Biol.* 4:671-675, 1994. Con autorización de Elsevier.)

Los genes reguladores específicos definen las células que formarán un apéndice

Ahora vamos a examinar cómo un apéndice desarrolla su patrón interno a partir del ejemplo del ala de un insecto.

El proceso empieza con los mecanismos de diseño temprano explicados. En el embrión temprano, los sistemas de señales anteroposterior y dorsoventral delimitan una rejilla octogonal en el blastodermo en forma de líneas limítrofes de expresión génica dorsoventrales, anteroposteriores y de segmento, regularmente esparcidas. En ciertos puntos de intersección de estas líneas, la combinación de los genes que se expresan es tal que inducen a un agregado celular a seguir la vía de disco imaginal.

En términos moleculares esto corresponde a activar la expresión de los genes reguladores que definen los discos imaginales. En la mayor parte de los discos se activa el gen *Distal-less*. Este gen codifica una proteína reguladora que es esencial para el crecimiento sostenido y también para la formación de un apéndice alargado como es el caso de una pata o de una antena con un eje próximo-distal. En su ausencia, no se forman estos apéndices y cuando se expresa de forma artificial en lugares anormales, se pueden producir apéndices fuera de lugar. *Distal-less* se expresa de forma similar en el desarrollo de extremidades y de otros apéndices en la mayoría de especies de invertebrados y vertebrados estudiados (**Figura 22–52**). En el caso del disco del ojo, otro gen, llamado *Eyeless*, junto con otros dos genes estrechamente relacionados, llevan a cabo la función correspondiente; este gen también tiene homólogos, con funciones homólogas (p. ej., los genes *Pax6*, que dirigen el desarrollo del ojo en otras especies, como se ha explicado en el Capítulo 7).

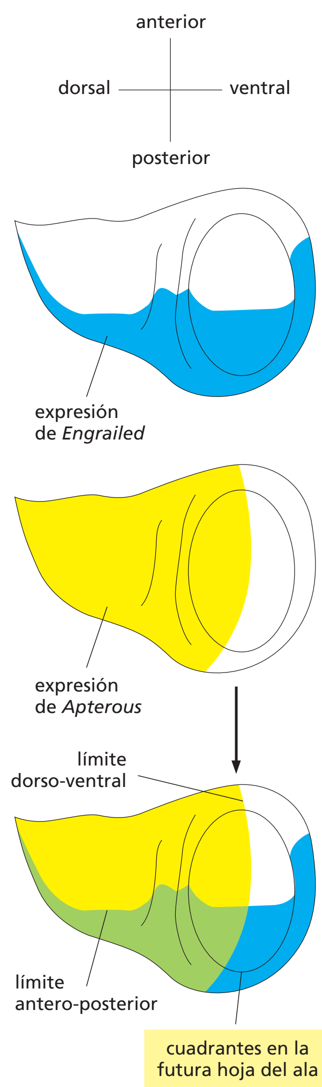


Figura 22–53 Dominios de expresión génica en el disco imaginal del ala, que definen los cuadrantes de la futura ala. La hoja del ala propiamente dicha deriva del dominio de forma oval situado a la derecha; se divide en cuatro cuadrantes por la expresión de *Apterous* y *Engrailed*, tal como se muestra.

El disco del ala del insecto se divide en compartimientos

Desde el principio, el agregado celular que forma el disco imaginal tiene los rudimentos de un patrón interno, heredado del proceso temprano de formación del patrón. Por ejemplo, las células de la mitad posterior del rudimento del disco del ala (y de la mayoría de los otros rudimentos de discos imaginales) expresa el gen de polaridad de segmento *Engrailed*, mientras que las de la mitad anterior no lo hacen. Las asimetrías iniciales son el fundamento del diseño posterior de un patrón más detallado, como ocurre en el huevo y en el embrión temprano.

Los sectores del disco del ala definidos por estas diferencias tempranas de expresión génica corresponden a partes determinadas de la futura ala. La región posterior, que expresa *Engrailed*, formará la mitad posterior del ala, mientras que la región que no expresa *Engrailed* formará la mitad anterior. A su vez, la parte dorsal del disco del ala expresa un gen denominado *Apterous*, mientras que la mitad ventral no lo hace. En la metamorfosis, el disco se pliega a lo largo de la línea que separa estos dominios y da paso a un ala cuya capa dorsal deriva de la región que expresa *Apterous* y la capa ventral de la región que no expresa este gen. El margen del ala, donde se unen estas dos capas epiteliales, corresponde a la línea limítrofe del dominio de expresión de *Apterous* en el disco (**Figura 22–53**).

Las células del disco, una vez ya han activado la expresión de los genes que las determinan como anterior o posterior, dorsal o ventral, retienen esta especificación mientras el disco crece y se desarrolla. Debido a que las células son sensibles a estas diferencias y son selectivas en la elección de sus vecinas, se forman líneas limítrofes claramente definidas entre los

cuatro grupos de células resultantes, sin que se produzca ningún intercambio de células en las interfases. Los cuatro cuadrantes correspondientes en el disco se llaman **compartimientos**, porque no hay intercambio de células entre ellos (**Figura 22–54**).

Cuatro vías de señalización conocidas se combinan entre sí formando el patrón del disco del ala: Wingless, Hedgehog, Dpp y Notch

A lo largo de las líneas que separan los compartimientos (la línea anteroposterior definida por *Engrailed* y la dorsoventral por *Apterous*), se enfrentan células en diferentes estados e interaccionan generando bandas estrechas de células especializadas. Estas células producen nuevas señales que organizan el crecimiento subsiguiente y la formación del patrón más detallado del apéndice.

Las células del compartimiento posterior del ala expresan la proteína señal Hedgehog, pero no pueden responder a ella. Las células del compartimiento anterior sí que responden a Hedgehog. Debido a que esta señal sólo actúa a distancias cortas, la vía de recepción se activa sólo en una estrecha banda de células anterior a la línea fronteriza del compartimiento, donde se yuxtaponen las células anteriores y las posteriores. Estas células limítrofes responden activando la expresión de otra molécula señal, Dpp (la misma proteína que hemos encontrado en el diseño del patrón dorsoventral en el embrión temprano) (**Figura 22–55**). En este nuevo contexto, Dpp actúa más o menos de la misma forma que antes: extiende sus efectos hacia afuera, más allá de las células limítrofes (por difusión, por citonemas o mediante transferencia de célula a célula por exocitosis o endocitosis), estableciendo un gradiente morfogénico que controla la subsiguiente formación del patrón detallado de crecimiento y de expresión génica.

En la línea limítrofe del compartimiento dorsoventral ocurren sucesos análogos (véase la Figura 22–55). En el futuro margen del ala, la comunicación de corto alcance mediada por la vía Notch genera una banda de células limítrofes que produce otro morfógeno, la proteína Wingless, que es el mismo factor de señalización, de la familia Wnt, que ha actuado en el diseño anteroposterior de cada segmento del embrión. Los gradientes de Dpp y Wingless, junto con otras señales y con las asimetrías de expresión génica descritas antes, se combinan entre sí dirigiendo la expresión de otros genes en localizaciones precisas dentro de cada compartimiento.

El tamaño de cada compartimiento se regula por interacciones entre sus células

Uno de los aspectos más oscuros y mal comprendidos del desarrollo animal es el control del crecimiento: ¿cómo crece cada parte del cuerpo hasta llegar a un tamaño definido? Este problema se ejemplifica magníficamente en los discos imaginales de *Drosophila*. Por recombinación somática inducida podemos obtener, por ejemplo, un clon de células que prolifere con más rapidez que el resto de las células del órgano en desarrollo. El clon crecerá hasta ocupar casi todo el compartimiento y no sobrepasará sus límites. Sorprendentemente, su rapidez de crecimiento casi no tiene efecto sobre el tamaño final del compartimiento ni sobre su forma, ni tan sólo sobre los detalles de su patrón interno (véase la Figura 22–54). De alguna forma, las células del interior del compartimiento interactúan determinando cuándo deben parar su crecimiento y cada compartimiento se comporta como una unidad reguladora en este aspecto.

Una primera cuestión es si el tamaño del compartimiento se regula de forma que contenga un número determinado de células. Podemos servirnos de mutaciones en los componentes de la maquinaria de control del ciclo celular para acelerar o frenar el ritmo de las divisiones celulares sin alterar el ritmo de crecimiento celular ni tisular. Este proceso da lugar a un número anormalmente grande de células de menor tamaño, o bien todo lo contrario, pero el tamaño, es decir, el área del compartimiento, casi no cambia. Por lo tanto, el mecanismo regulador parece que depende de señales que indican la distancia física entre una y otra parte del compartimiento, y depende también de las respuestas celulares que de alguna forma leen estas señales, de manera que el crecimiento sólo se detenga cuando el espacio entre las partes haya llegado a un valor adecuado.

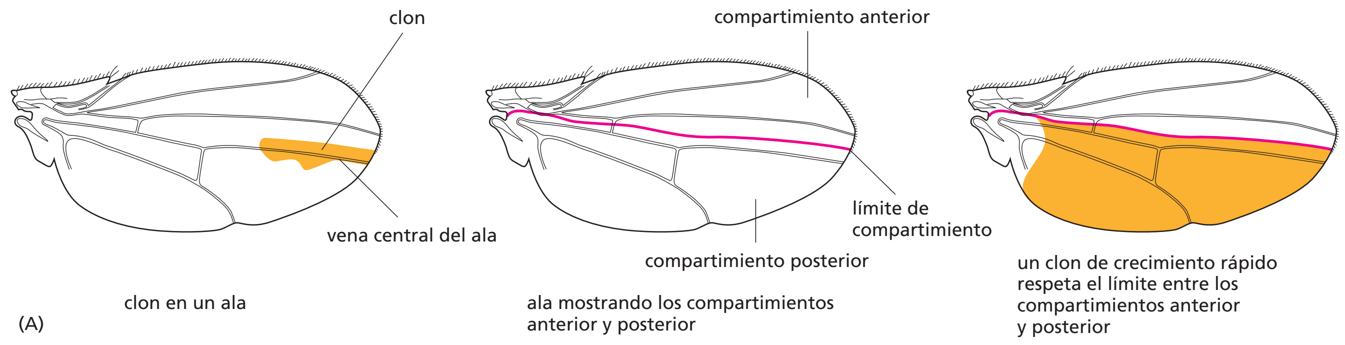
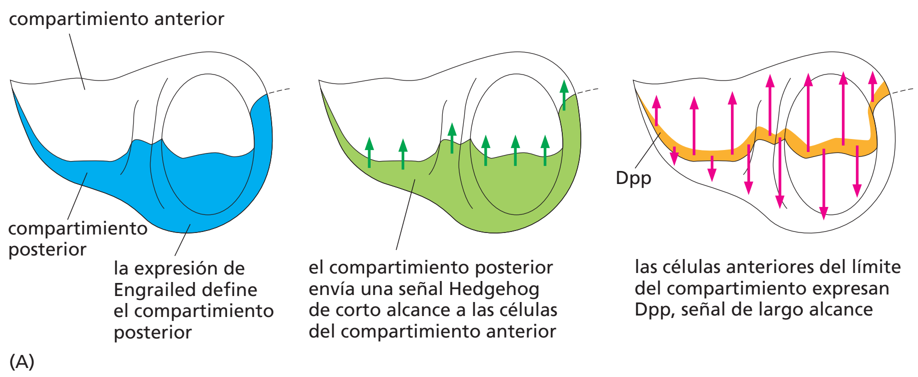




Figura 22–54 Compartimientos del ala adulta. (A) Las formas de los clones marcados en el ala de *Drosophila* revelan la existencia de un límite de compartimiento. El borde de cada clon marcado tiene un límite nítido. Incluso cuando se ha alterado genéticamente un clon marcado de tal forma que crezca más rápido que el resto del ala y, por lo tanto, es muy grande, sigue respetando el límite (dibujo de la derecha). Nótese que el límite del compartimiento no coincide con la vena central del ala. (B) Patrón de expresión del gen *Engrailed* en el ala, revelado por la misma técnica que para la mosca adulta mostrada en la Figura 22–41. El límite del compartimiento coincide con el límite de la expresión del gen *Engrailed*. (A, según F.H.C. Crick y P.A. Lawrence, *Science* 189:340-347, 1975. Con autorización de AAAS; B, cortesía de Chihiro Hama y Tom Kornberg.)



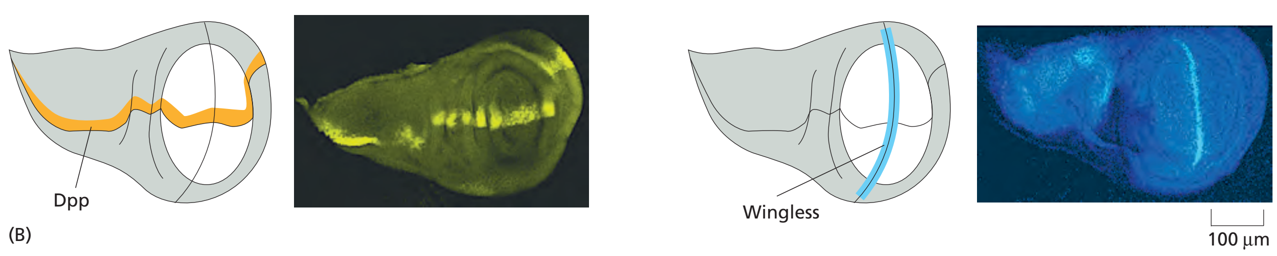


Figura 22–55 Señales morfogénicas que se generan en los límites del compartimiento en el disco imaginal del ala. (A) Formación de una región señalizadora de Dpp en el límite anteroposterior del compartimiento a través de una interacción mediada por Hedgehog entre las células anteriores y posteriores. De manera análoga, una interacción mediada por Notch entre las células dorsales y ventrales forma una región señalizadora de Wingless (Wnt) a lo largo del límite dorsoventral. (B) Patrones de expresión que se observan de Dpp y de Wingless. Aunque parece claro que Dpp y Wingless actúan como morfógenos, aún no está claro si se extienden desde su fuente por simple difusión a través del medio extracelular o de otra forma. Además, se ha visto que las células del disco imaginal envían largas protrusiones, llamadas citonemas, que permiten detectar señales a distancia. Así, la célula receptora puede enviar sus sensores a la fuente de la señal en lugar de desplazarse la señal hacia la célula receptora. (B, fotografías cedidas por cortesía de Sean Carroll y Scott Weatherbee, de S.J. Day y P.A. Lawrence, *Development*, 127:2977-2987, 2000. Con autorización de The Company of Biologists.)

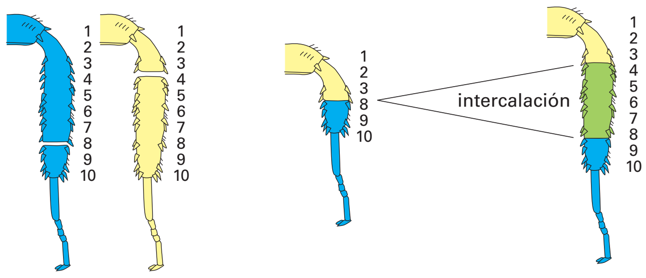


Figura 22–56 Regeneración intercalar. Cuando dos porciones de una pata de cucaracha, que normalmente se hallan separadas, se injertan juntas, entre ambas se intercala un nuevo tejido (*verde*) (por proliferación celular) que llena el intervalo correspondiente en el patrón de estructuras de la pata, restituyéndose un segmento de pata de tamaño y patrón normales.

Este tipo de regulación del crecimiento se observa claramente en la **regeneración intercalar** que tiene lugar cuando fragmentos de un disco imaginal de *Drosophila* o distintas partes de una pata en crecimiento de cucaracha se injertan mediante cirugía. Después del injerto, las células cercanas al lugar de unión proliferan y rellenan la parte que normalmente estaría en medio de los dos trozos injertados, continuando el crecimiento hasta que se restablece la distancia normal entre las marcas limítrofes (**Figura 22–56**). El mecanismo por el que se obtiene este resultado constituye un misterio, pero parece probable que sea similar a los mecanismos que regulan el crecimiento durante el desarrollo normal.

¿Cuál es el mecanismo que podría asegurar que cada pequeña pieza del patrón de un compartimiento crezca hasta su tamaño apropiado, a pesar de los desajustes locales en el ritmo de crecimiento o en las condiciones iniciales? Los gradientes de morfógenos (p. ej., de Dpp y Wingless) generan un patrón por imposición de diferentes caracteres en células situadas en diferentes lugares. ¿Podría ser que las células de cada región fuesen capaces de detectar cuán cerca están las unidades repetitivas en el patrón, cuál es la pendiente del gradiente de cambio en el carácter celular y continuasen su crecimiento hasta que el tejido se haya extendido hasta el límite correcto?

Esta idea se ha verificado generando clones de células en el disco del ala en las cuales el flujo de componentes de la vía de señalización Dpp se expresan erróneamente con el fin de mantener un nivel de activación más alto o más bajo que el de las células vecinas. Desde el punto de vista de las células, las condiciones en la zona limítrofe del clon mutante son equivalentes a las que se producirían con un gradiente brusco de Dpp. El resultado de ello es que las células de los alrededores se estimulan dividiéndose a un ritmo creciente. Por el contrario, si el nivel de la señal Dpp es uniforme en la región media del disco del ala en desarrollo, donde tendría que ser creciente de forma gradual, la división celular se inhibe. Pero si es así, ¿cómo detectan las células la pendiente del gradiente?

Desconocemos la respuesta pero existen indicios consistentes de que el mecanismo depende de señales que se generan en las uniones célula-célula, donde confluyen diferentes niveles de activación. Como se ha expuesto en el Capítulo 19, mutaciones en los componentes que forman parte de las uniones celulares tales como la proteína estructural Dlg (Discs-large) o un miembro de la superfamilia de la cadherina llamado Fat, provocan un error fatal en el control del crecimiento que hace que el disco del ala crezca más allá de su tamaño normal. En el caso de Fat, se ha identificado un grupo de moléculas que incluye las proteínas quinasa llamadas Hippo y Warts, como componentes de una vía de señalización que desde Fat, en la membrana celular, controla la expresión génica en el núcleo. Los productos de los genes diana incluyen la ciclina E, que es un regulador del ciclo celular, un inhibidor de la apoptosis y también un micro-RNA llamado *Bantam*, que parece ser una parte esencial del mecanismo de control del crecimiento. A pesar de que estos hechos despiertan el afán de conseguir hallazgos que todavía están fuera de nuestro alcance, los mecanismos que controlan el tamaño de los órganos todavía constituyen un misterio. Si pudiéramos descubrir cómo actúan en *Drosophila*, podríamos empezar a vislumbrar cómo se resuelve en los vertebrados el problema del control del tamaño de los órganos, sobre el cual la perplejidad actual ante esta cuestión fundamental es aún más profunda. Dado que en otros aspectos del desarrollo de los órganos las moscas y los vertebrados son, a nivel molecular, más semejantes de lo que cabría esperar, los mecanismos de control del crecimiento también podrían ser similares.

Mecanismos similares modelan las extremidades de los vertebrados

Las extremidades de los vertebrados son muy diferentes de las de los insectos. Por ejemplo, el ala de un insecto consiste principalmente en dos capas de epitelio con muy poco tejido

entre ellas. Por el contrario, la extremidad de un vertebrado consta de un sistema elaborado de músculos, huesos y tejidos conjuntivos envueltos por una cubierta delgada de epidermis de estructura más sencilla. Además la evolución sugiere que el último ancestro común a vertebrados e insectos debía carecer de patas, brazos, alas y aletas, y que todos estos apéndices evolucionaron independientemente. No obstante, cuando se observan los mecanismos moleculares que controlan el desarrollo de las extremidades de los vertebrados, encontramos una cantidad sorprendente de similitudes con las de los insectos. Ya se han mencionado algunas de estas semejanzas, pero hay muchas otras: casi todas las moléculas que actúan en el caso del ala de mosca tienen sus homólogos en las extremidades de los vertebrados, aunque se expresen en relaciones espaciales diferentes.

Los paralelismos se han estudiado de forma más exhaustiva en el embrión de pollo. Como se ha señalado, cada una de las alas o patas de pollo se originan a partir de una yema en forma de lengua, que consiste en una masa de células de tejido conjuntivo embrionario, llamada mesénquima, englobada dentro de una cubierta epitelial. En esta estructura encontramos la expresión de homólogos de casi todos los genes mencionados en la exposición sobre el diseño del ala de *Drosophila*, incluyendo *Distal-less*, *Wingless*, *Notch*, *Engrailed*, *Dpp* y *Hedgehog*, todas ellas con funciones más o menos similares a las del disco del ala de *Drosophila* (**Figura 22–57**).

Asimismo, los genes *Hox* también aparecen tanto en las extremidades de *Drosophila* como en las de los vertebrados. En el apéndice del insecto, se distinguen los compartimientos anterior y posterior por la expresión de varios genes del complejo Hox, como resultado de una expresión en serie de estos genes a lo largo del eje de todo el cuerpo. En las extremidades de los vertebrados los complejos Hox (*HoxA* y *HoxD*) se expresan en un patrón regular, obedeciendo las reglas habituales de la expresión génica secuencial de estos complejos. Junto con otros factores como las proteínas Tx mencionadas anteriormente (véase la Figura 22–9), estos complejos intervienen en la regulación de las diferencias de comportamiento celular a lo largo del eje próximo-distal de la extremidad.

Se ha sugerido que estas semejanzas moleculares entre las extremidades en desarrollo de diferentes fílums reflejan que proceden de un ancestro común que, aunque no tenía extremidades, sí que poseía algún tipo de apéndices diseñados según los mismos principios (quizás eran antenas o piezas bucales que sobresalían para coger el alimento). Los apéndices actuales, en forma de extremidades, desde las alas y las patas de la mosca hasta los brazos y las piernas de un humano, habrían evolucionado mediante activación de los genes de formación de apéndices en nuevos lugares del cuerpo como resultado de cambios en la regulación génica.

La expresión localizada de clases específicas de genes de proteínas reguladoras prefigura la diferenciación celular

Retomemos el hilo del desarrollo en el disco imaginal de *Drosophila* y sigámoslo hasta el paso final en el cual las células se convierten definitivamente en diferenciadas. Una observación más atenta a los detalles tomará como ejemplo de diferenciación una pequeña estructura que surge del epitelio del disco imaginal: la **queta sensorial**.

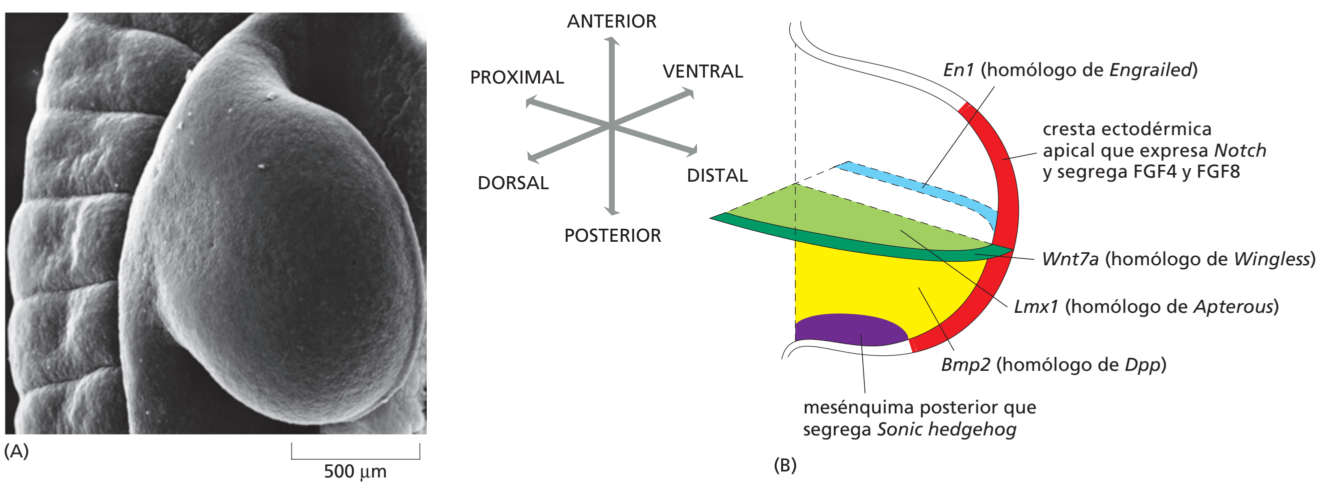


Figura 22–57 Moléculas que controlan la formación del patrón en la yema de una extremidad de vertebrado. (A) Yema de ala de un embrión de pollo de 4 días de incubación. La electromicrografía de barrido muestra una vista dorsal, con las somitas (los segmentos del tronco del embrión) visibles a la izquierda. Justamente en el margen distal de la yema se puede ver una cresta engrosada, la cresta ectodérmica apical. (B) Patrones de expresión de proteínas señalizadoras clave y factores reguladores génicos en la yema de la extremidad del pollo. Los patrones se representan de forma esquemática en dos planos imaginarios de cortes de la yema, uno (horizontal) para enseñar el sistema dorsoventral y el otro (vertical) para enseñar los sistemas anteroposterior y próximo-distal. *Sonic hedgehog*, *Bmp2* y *Lmx1* se expresan en el núcleo mesodérmico de la yema de la extremidad; las otras moléculas del diagrama se expresan en su cubierta epitelial. Casi todas las moléculas mostradas tienen homólogos implicados en la formación del patrón del disco del ala de *Drosophila*. (A, cortesía de Paul Martin.)

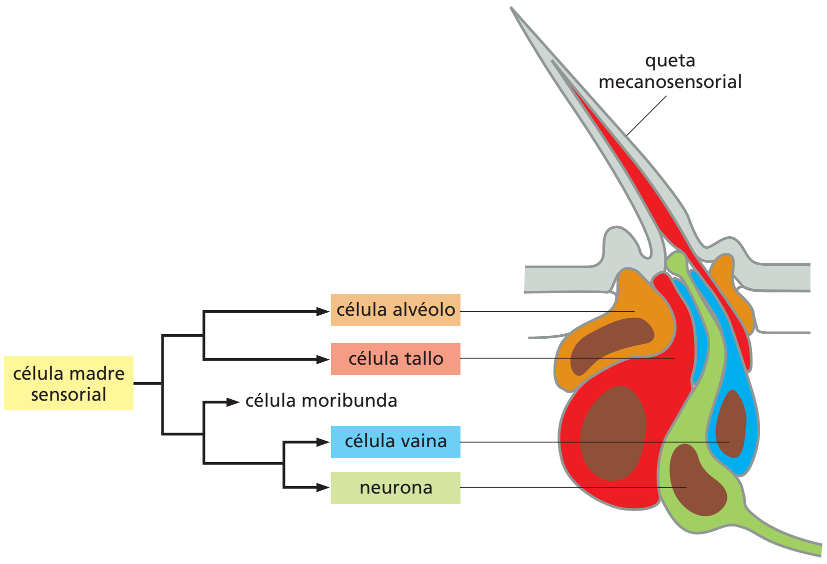


Figura 22–58 Estructura básica de una queta mecanosensorial. A la izquierda se muestra el linaje de las cuatro células de la queta, todas ellas descendientes de una célula madre sensorial.

Las quetas que cubren la superficie del cuerpo de un insecto son órganos sensoriales en miniatura. Algunas de ellas responden a estímulos químicos, otras a estímulos mecánicos pero todas están construidas de forma similar. De entre las quetas mecanosensoriales ésta es la de estructura más sencilla. Cada una de ellas se compone de cuatro células: una célula tallo, una célula alvéolo, una célula vaina y una neurona (**Figura 22–58**). El movimiento de la célula dardo de la queta excita la neurona, la cual manda la señal al sistema nervioso central.

Las células de la queta de una mosca adulta derivan del epitelio del disco imaginal y las cuatro son nietas o bisnietas de una sola *célula madre sensorial* (véase la Figura 22–58), que se diferencia de las futuras células epidérmicas de su alrededor durante el último estadio larvario (**Figura 22–59**). Una quinta célula descendiente muere, o en algunos tejidos se convierte en una célula glial. Para explicar el patrón de la diferenciación de la queta, primero tenemos que explicar cómo se controla la génesis de las células madre sensoriales y después cómo las cinco descendientes de cada una de ellas se vuelven diferentes de las demás.

Dos genes llamados *Achaete* y *Scute* son cruciales en el inicio de la formación de las quetas en el epitelio del disco imaginal. Estos genes tienen funciones similares que se solapan y codifican proteínas reguladoras íntimamente relacionadas, que son del tipo básico hélice-bucle-hélice (explicado en el Capítulo 7). Como resultado de los mecanismos de diseño del disco estudiados, *Achaete* y *Scute* se expresan en las regiones del disco imaginal donde se formarán las quetas. Las mutaciones que eliminan la expresión de estos genes en algunos de sus lugares habituales bloquean el desarrollo de las quetas precisamente en estos lugares y las mutaciones que causan la expresión adicional en lugares anormales hacen que las quetas se desarrollen allí. Pero la expresión de *Achaete* y de *Scute* es transitoria y sólo una minoría de las células que inicialmente expresan estos genes serán células madres sensoriales, mientras que las otras se convertirán en células epidérmicas normales. El estado que especifica la expresión de *Achaete* y *Scute* se llama *proneural*, y *Achaete* y *Scute* se denominan **genes proneurales**. Las células proneurales tienen instrucciones de tomar la vía de diferenciación neurosensorial, pero cuáles de ellas lo hacen finalmente, depende de interacciones competitivas entre ellas, como se describirá más adelante.



Figura 22–59 Células madre sensoriales en el disco imaginal del ala. Las células madre sensoriales (en *azul*) se revelan fácilmente con esta tinción especial de *Drosophila*, que contiene un gen marcador artificial *LacZ* que, por casualidad, se ha insertado cerca de la región control, responsable de su expresión selectiva en las células madre sensoriales. La tinción *púrpura* muestra el patrón de expresión del gen *Scute*; este gen prefigura la producción de células madre sensoriales y se desdibuja a medida que las células madre sensoriales se van desarrollando. (De P. Cubas et al., *Genes Dev*. 5:996-1008, 1991. Con autorización de Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

La inhibición lateral escoge las células madre sensoriales de los agregados proneurales

Las células que expresan los genes proneurales se agrupan en el epitelio del disco imaginal de forma que un pequeño agregado aislado de menos de 30 células formará una gran queta aislada, mientras que un agregado continuo de centenares o millares de células formarán un campo de quetas pequeñas. En el primer caso, sólo una célula del agregado se convierte en célula madre sensorial, mientras que en el segundo caso, lo harán muchas de las células que se encuentran esparcidas por toda la región proneural. En ambos casos, cada una de las células madre sensoriales queda rodeada de células que han desactivado la expresión

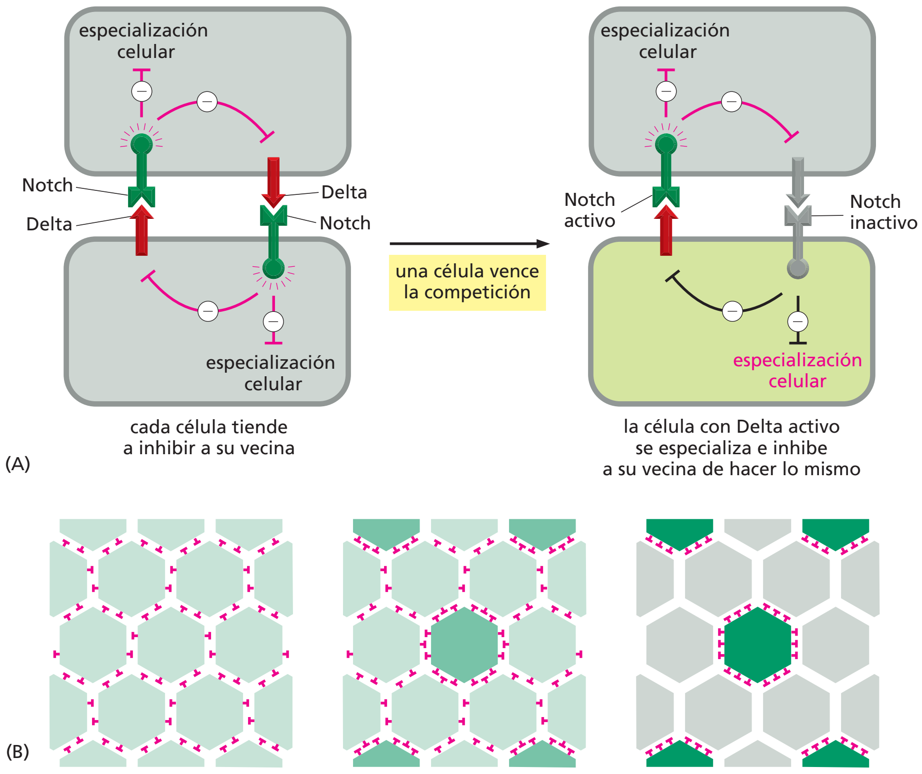


Figura 22–60 La inhibición lateral. (A) Mecanismo básico de inhibición lateral competitiva mediada por Notch, ilustrada para dos células que interactúan entre sí. En este diagrama la ausencia de color en las proteínas o en las líneas efectoras indica inactividad. (B) Resultado del mismo proceso que actúa en un grupo más grande de células. En un principio, todas las células del grupo son equivalentes, expresando tanto el receptor transmembrana Notch como su ligando transmembrana Delta. Cada célula tiende a especializarse (como célula madre sensorial), pero también cada una de ellas envía una señal inhibidora a sus vecinas que reprime tal especialización. Este proceso genera una situación competitiva. En cuanto una de las células gana alguna ventaja en esta competencia, esta ventaja se magnifica. La célula vencedora, a medida que va iniciando la diferenciación como célula madre sensorial, también va inhibiendo más fuertemente a sus vecinas. A la inversa, a medida que estas células vecinas van perdiendo su capacidad para diferenciarse como células madre sensoriales también van perdiendo su capacidad para inhibir a las otras células a que lo hagan. Por consiguiente, la inhibición lateral hace que las células adyacentes sigan destinos diferentes. Parece que normalmente la interacción depende de contactos célula-célula, pero la futura célula madre sensorial puede ser capaz de enviar una señal inhibidora hacia células que están a más de un diámetro celular de distancia, por ejemplo emitiendo largas protuberancias para contactar con ellas.

de los genes proneurales, quedando obligadas a diferenciarse como epidermis. Experimentos con mosaicos genéticos muestran que este fenómeno ocurre porque una célula comprometida a tomar la vía de diferenciación de célula madre sensorial envía una señal a sus vecinas para que ellas no hagan lo mismo, es decir, ejerce una *inhibición lateral*. Si una célula que normalmente sería célula madre sensorial se incapacita en términos genéticos para que lo sea, entonces una célula proneural vecina queda libre de la inhibición lateral y se convierte en célula madre sensorial.

La inhibición lateral se lleva a cabo por la vía de señalización Notch. En principios, todas las células del agregado expresan el receptor transmembrana Notch y también su ligando Delta. Dondequiera que Delta active Notch, se envía una señal inhibidora a la célula que expresa Notch; en consecuencia, inicialmente todas las células del agregado se inhiben unas a otras. No obstante, la recepción de la señal por una célula determinada parece que no sólo disminuye la tendencia a especializarse como célula madre sensorial, sino que también disminuye su capacidad para defenderse enviando la señal inhibidora Delta. Este hecho crea una situación competitiva en la cual una sola célula de cada pequeña región (la futura célula madre sensorial) sale ganadora y envía una potente señal inhibidora a sus compañeras más cercanas, sin recibir ninguna señal de este tipo como respuesta (**Figura 22–60**). Las consecuencias que puede tener un fallo en este mecanismo regulador se muestran en la **Figura 22–61**.



Figura 22–61 Resultado de la anulación de la inhibición lateral durante la singularización de las células madre sensoriales. La fotografía muestra una parte del tórax de una mosca que contiene un grupo de células mutantes en las cuales el gen neurogénico *Delta* ha sido parcialmente inactivado. La reducción de la inhibición lateral ha sido la causa de que casi todas las células del grupo mutante (en el centro de la figura) se desarrollen como células madre sensoriales, y se produzca un gran exceso de quetas sensoriales. Grupos mutantes de células portadoras de mutaciones más drásticas de la vía Notch, que dan lugar a una carencia total de inhibición lateral, no forman quetas visibles porque toda la progenie de las células madre sensoriales se desarrollan como neuronas o como células gliales en lugar de diversificarse formando neuronas y las partes externas de la estructura de la queta. (Cortesía de P. Heitzler y P. Simpson, *Cell* 64:1083-1093, 1991. Con autorización de Elsevier.)

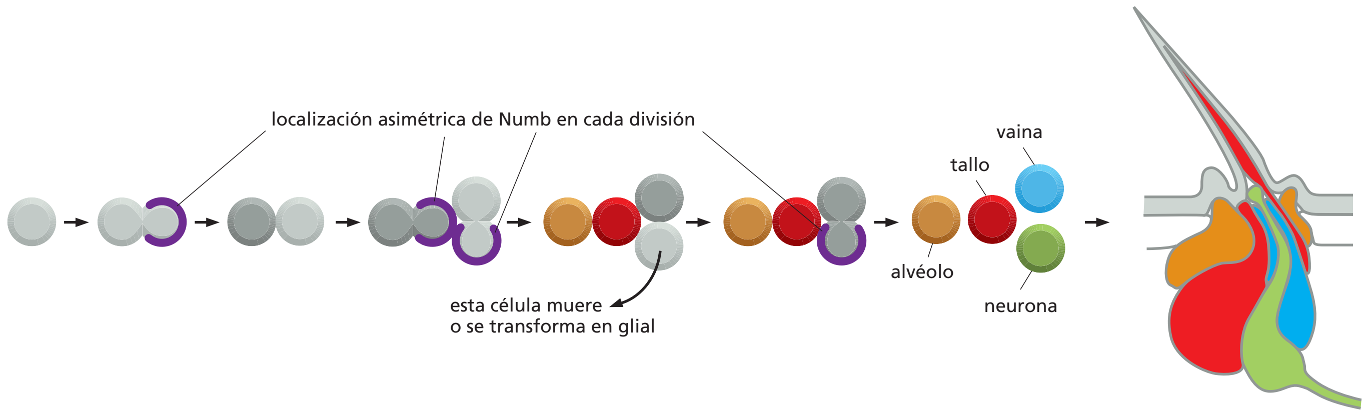


Figura 22–62 Numb sesga la inhibición lateral durante el desarrollo de la queta. En cada división de la descendencia de la célula madre sensorial, la proteína Numb se localiza de manera asimétrica y produce células hijas diferentes entre sí. Nótese que algunas de las divisiones se orientan con el huso mitótico en el plano del epitelio y otras perpendiculares a él; en estos diferentes tipos de división, la localización de Numb se controla por diferentes vías, pero en todas ellas tiene un papel crítico decidiendo los destinos celulares. (Basado en datos de M. Gho, Y. Bellaiche y F. Schweisguth, *Development* 126:3573-3584, 1999. Con autorización The Company of Biologist.)

La inhibición lateral conduce a la descendencia de la célula madre sensorial hacia destinos finales diferentes

El mismo mecanismo de inhibición lateral dependiente de Notch actúa repetidamente en la formación de las quetas, no sólo para obligar a las células vecinas de las células madre sensoriales a seguir una vía diferente y convertirse en epidérmicas, sino también para hacer que más tarde las células nietas y bisnietas de la célula madre sensorial expresen diferentes genes que dirijan la formación de los distintos componentes de la queta. En cada etapa, la inhibición lateral genera una interacción competitiva que obliga a las células adyacentes a comportarse de modo distinto. Mediante una mutación de Notch sensible a la temperatura, se puede desactivar la señalización Notch después de que la célula madre sensorial haya sido elegida, pero antes de que se divida. Entonces la prole se diferencia de la misma forma, produciendo un aglomerado de neuronas en lugar de los cuatro tipos de células de la queta.

Como en otras situaciones competitivas, las que se producen por inhibición lateral a menudo están amañadas: una célula empieza con una ventaja que le garantiza que será la ganadora. En el desarrollo de los distintos tipos de células de la queta sensorial existe un sesgo inicial potente, producido por la asimetría de todas las divisiones de la célula madre sensorial y de su prole. En un extremo de la célula en división se encuentra una proteína llamada Numb (junto con otras proteínas) que hereda una de las células hijas y la otra en cambio no (**Figura 22–62**). Numb bloquea la actividad de Notch. En consecuencia, la célula que contiene Numb no detecta la señal inhibidora de sus vecinas, mientras que la otra sigue siendo sensible. Dado que las dos células expresan inicialmente el ligando Delta de Notch, la célula que ha heredado Numb será neural mientras que su hermana será conducida hacia un destino no neuronal.

La polaridad planar de las divisiones asimétricas está controlada por la señalización mediada por el receptor Frizzled

Para que actúe el mecanismo Numb, en la célula en división tiene que existir la maquinaria que segregue el determinante a un lado de la célula antes de que se produzca la división. Además cuando la célula entra en mitosis, el huso mitótico tiene que alinearse con esta asimetría, de forma que el determinante sólo se localice en una célula hija y no sea compartido por las dos células hijas durante la división. En el caso analizado, la célula madre sensorial, en su primera división, se divide de forma regular produciendo una célula anterior que hereda Numb y una célula posterior que no lo hace. Como se ha explicado en el Capítulo 19, este tipo de polaridad en el plano del epitelio se denomina *polaridad planar*, en contraposición

con la polaridad ápico-basal, en la que la asimetría celular es perpendicular al plano del epitelio. Esto se manifiesta en la orientación uniforme hacia atrás de las quetas, que da a la mosca un aspecto como si hubiera sido barrida por el viento (**Figura 22–63**).

La polaridad planar de la primera división de la célula madre sensorial se controla mediante una vía de señalización similar a la de las divisiones asimétricas del nematodo (véase la Figura 22–21), que dependen del receptor Frizzled. En el Capítulo 15 se han descrito las proteínas Frizzled como receptores de las proteínas Wnt, pero en el control de la polaridad planar, en moscas, y probablemente también en vertebrados, esta vía funciona de un modo especial, ya que el mecanismo intracelular de transmisión ejerce sus efectos sobre todo en el citoesqueleto de actina, más que en la expresión génica. La proteína intracelular Dishevelled, que se encuentra por debajo de Frizzled en la cascada de la vía de señalización, es común a las dos ramas de la vía: la reguladora génica y la reguladora de actina. Distintos dominios que presenta la molécula Dishevelled son los responsables de las dos funciones (**Figura 22–64**). Frizzled y Dishevelled toman nombre del aspecto despeinado que tiene la mosca cuando la polaridad de las quetas está desordenada (véase la Figura19–32).



Figura 22–63 La polaridad celular planar se manifiesta en la polaridad de la queta sobre el dorso de la mosca: todos los pelos apuntan hacia atrás. (Electromicrografía de barrido cedida por cortesía de S. Oldham y E. Hafen, de E. Spana y N. Perrimon, *Trends Genet*. 15:301-302, 1999. Con autorización de Elsevier.)

Las divisiones asimétricas de las células madre generan neuronas adicionales en el sistema nervioso central

Los mecanismos descritos, además de actuar en el control de la génesis de las neuronas de las quetas sensoriales, también intervienen, aunque con variaciones, en la génesis de casi todas las demás neuronas, no sólo en insectos, sino también en otros fílums. Por lo tanto, en el sistema nervioso central, tanto de moscas como de vertebrados, las neuronas surgen de regiones que expresan genes proneurales afines a *Achaete* y *Scute*. La neuronas nacientes expresan Delta e inhiben sus vecinas más próximas, que expresan Notch, para que no se comprometan también a tomar el camino de la diferenciación neuronal. Cuando se bloquea la señal Notch, falla la inhibición y entonces en las regiones proneurales se generan neuronas en exceso a expensas de las células no neuronales (**Figura 22–65**).

Sin embargo, en el sistema nervioso central entra en juego un mecanismo adicional que ayuda a generar el gran número de neuronas y células de la glía que se necesitan; una clase especial de células se compromete a ser precursor neuronal, pero en vez de diferenciarse de forma directa como neuronas o células de la glía, sufren una larga serie de divisiones celulares asimétricas por las cuales se añaden a la población muchas neuronas y células gliales adicionales. Este mecanismo se comprende mejor en *Drosophila*, aunque hay muchos indicios de que en la neurogénesis de vertebrados ocurre algo similar.

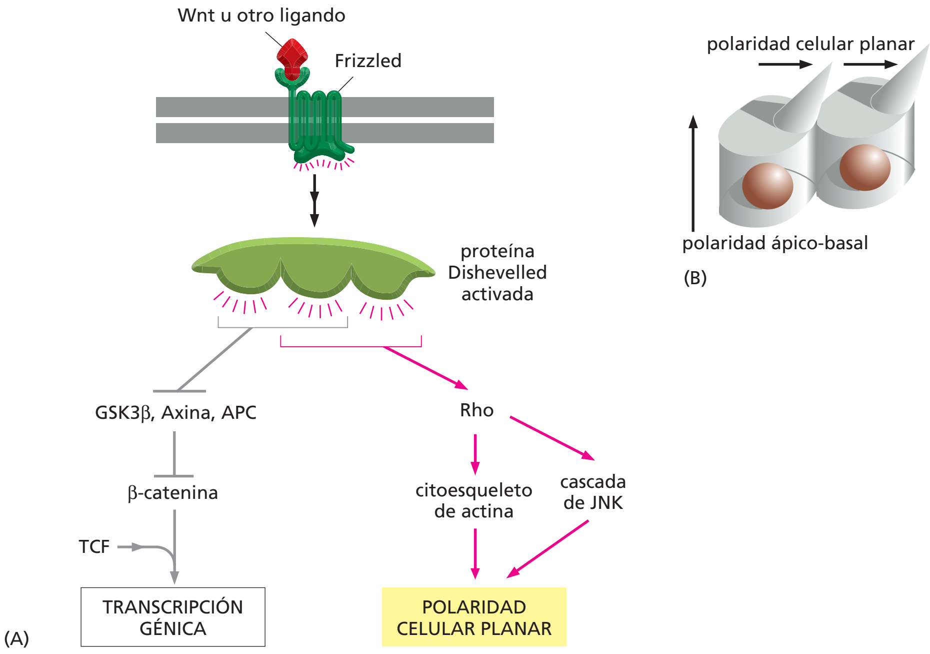


Figura 22–64 El control de la polaridad celular planar. (A) Dos ramas de la vía de señalización Wnt/Frizzled. La rama principal, descrita en el Capítulo 15, controla la expresión génica mediada por la β-catenina; la rama de la polaridad planar controla el citoesqueleto de actina mediante GTPasas Rho. Los responsables de ambos efectos son los dominios de la proteína Dishevelled. Aún no está claro cuál es el miembro de la familia de proteínas señalizadoras Wnt, si es que hay alguno, responsable de la activación de la función de la polaridad planar en *Drosophila*. (B) Esquema de células mostrando la polaridad planar. Al menos en algunos sistemas, la polaridad celular planar se asocia con la localización del propio receptor Frizzled a un lado de cada célula. (Véase también Capítulo 19, Figura 19–32.)

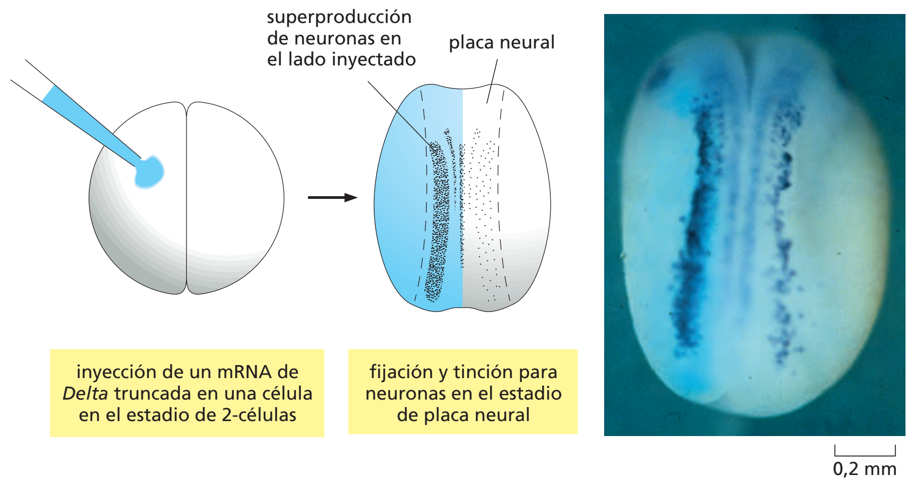


Figura 22–65 Los efectos del bloqueo de la señalización Notch en el embrión de *Xenopus*. En este experimento, a una célula de un embrión en el estadio de dos células se le microinyecta un mRNA que codifica una forma truncada del ligando *Delta* de Notch y como marcador otro mRNA de *LacZ*. La proteína Delta truncada producida a partir del mRNA bloquea la señalización de Notch en las células descendientes de la célula que ha recibido la microinyección. Estas células quedan al lado izquierdo del embrión y son identificables porque contienen la proteína LacZ (tinción *azul*) así como la proteína Delta truncada. El lado derecho del embrión no queda afectado por lo que sirve de control. El embrión se fija y se tiñe en una fase en la que el sistema nervioso central todavía no se ha enrollado formando el tubo neural, sino que es una placa más o menos plana de células, la placa neural, expuesta en la superficie del embrión. Las primeras neuronas (en la fotografía teñidas de *púrpura*) ya han empezado a diferenciarse en bandas alargadas (regiones proneurales) a cada lado de la línea mediana. En el lado control (a la derecha), hay un subgrupo disperso de población celular proneural. En el lado en el que Notch está bloqueado (a la izquierda), casi todas las células de las regiones proneurales se han diferenciado como neuronas, generando una banda densamente teñida de neuronas sin células intermedias. Las microinyecciones de un mRNA, que codifique un Delta normal y funcional, tienen un efecto opuesto, reduciendo el número de células que se diferencian en neuronas. (Fotografía de A. Chitnis et al., *Nature* 375:761-766, 1995. Con autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

En el sistema nervioso central de *Drosophila*, los precursores de las células nerviosas, o **neuroblastos**, se eligen inicialmente del ectodermo neurogénico mediante el típico mecanismo de la inhibición lateral que depende de Notch. Cada neuroblasto se divide de forma repetida de forma asimétrica (**Figura 22–66**A). En cada división una célula hija sigue siendo neuroblasto, mientras que la otra, que es mucho más pequeña, se especializa como *célula madre ganglionar* o GMC. Ésta se divide una sola vez, dando un par de neuronas, o una neurona y una célula de la glía o un par de células gliales. El neuroblasto se hace más pequeño en cada división, mientras suministra sus materiales a una célula madre ganglionar después de otra. Finalmente, después de unos 12 ciclos, el proceso se detiene, seguramente porque el neuroblasto ha quedado demasiado pequeño para sobrepasar el umbral del tamaño necesario para seguir un nuevo ciclo de división celular. Más tarde, en la larva, las divisiones continúan, acompañadas ahora de crecimiento celular, que permite que el proceso continúe indefinidamente y genere el gran número de neuronas que se necesitan en la mosca adulta.

Por lo tanto, los neuroblastos larvarios se consideran **células madre iniciales**, que son las que, sin ser definitivamente diferenciadas, se comportan como una fuente autorrenovable y en potencia inagotable de células que finalmente se diferenciarán. En el Capítulo 23

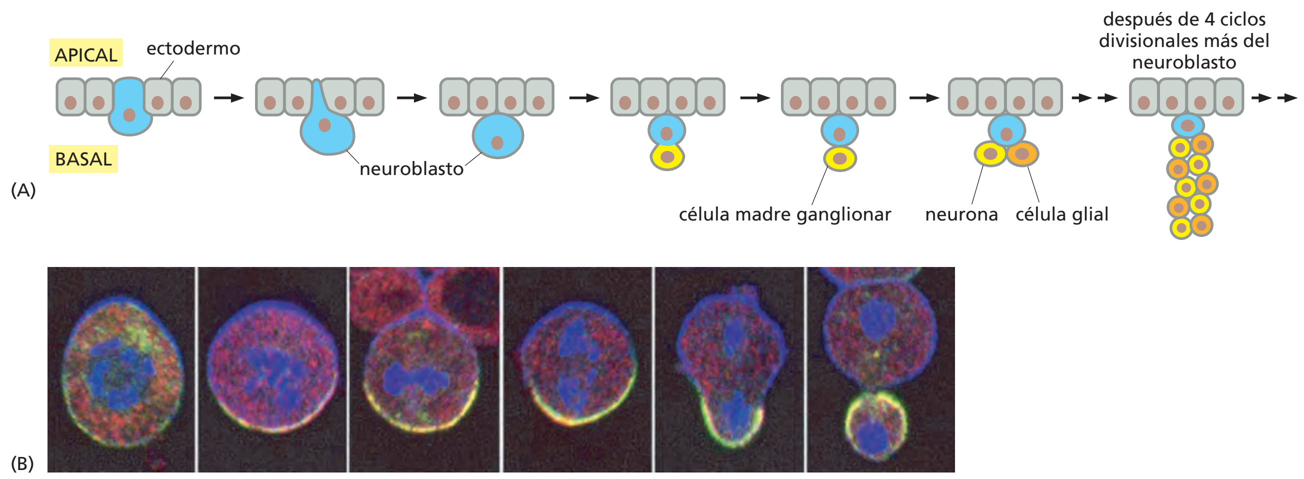


Figura 22–66 Neuroblastos y división celular asimétrica en el sistema nervioso central de un embrión de mosca. (A) El neuroblasto se origina como una célula ectodérmica especializada. Se singulariza por inhibición lateral y emerge de la cara basal (interna) del ectodermo. Luego pasa por una serie de ciclos de división repetidos, dividiéndose asimétricamente y generando una serie de células madre ganglionares. Cada célula madre ganglionar se divide una vez dando lugar a un par de células hijas diferentes (típicamente una neurona y una célula glial). (B) La distribución asimétrica de los determinantes del destino celular en un neuroblasto aislado a medida que va sufriendo la mitosis. Los cromosomas mitóticos se han teñido en *azul*. El complejo Par3/Par6/aPKC, mostrado de color *azul* por el inmunomarcaje de aPKC, se concentra en el córtex apical y provoca que Miranda (*verde*), Brat (*rojo*, o *amarillo* donde se solapa con Miranda) y Prospero (no marcado) se localice en el córtex basal. Cuando la célula se divide, estas tres últimas moléculas se segregan en la célula madre ganglionar, forzando a ésta a diferenciarse y dejando al neuroblasto libre para recobrar su asimetría y dividirse otra vez de la misma manera. (B, de C.Y. Lee et al. *Dev. Cell* 10:441-449, 2006. Con autorización de Elsevier.)

trataremos en detalle de las células madre y veremos que no tienen que dividirse necesariamente de forma asimétrica, sino que la división asimétrica es una estrategia posible, de lo cual los neuroblastos de la mosca constituyen un magnífico ejemplo.

Las divisiones asimétricas de los neuroblastos segregan un inhibidor de la división celular en una sola de las células hijas

Las divisiones del neuroblasto son asimétricas en tres aspectos: (1) físicamente, en el hecho de que una célula hija es más pequeña que la otra; (2) bioquímicamente, en factores que controlan la diferenciación, y (3) bioquímicamente, en factores que controlan la proliferación. Estas asimetrías tienen que estar coordinadas entre ellas y con la orientación del eje del huso mitótico de forma que el plano de la partición corte las células en las dos partes correctas. ¿Cómo se consigue esto?

El neuroblasto tiene una asimetría ápico-basal que refleja su origen ectodérmico, ya que el ectodermo, como otros epitelios, tiene una polaridad de este tipo bien definida. Como se describió en el Capítulo 19, la polaridad ápico-basal está gobernada por un complejo de tres proteínas: Par3 (también llamada Bazooka en *Drosophila*), Par6 y aPKC (la proteína quinasa C atípica); éstas se localizan en el córtex, hacia el extremo apical de la célula. Parece que este complejo localizado Par3/Par6/aPKC es la fuente primaria de la asimetría del neuroblasto. Además coordina todo el proceso de la división asimétrica, con la ayuda de otros componentes, algunos de los cuales ejercen un efecto de realimentación que mantiene la localización del complejo.

El complejo Par3/Par6/aPKC define la orientación del huso mitótico y la partición desigual de la célula en la citocinesis mediante la interacción con unas proteínas adaptadoras denominadas Inscuteable y Partner de Inscuteable (Pins). Éstas a su vez se ayudan de la subunidad α de la proteína trimérica G (cuestión descrita anteriormente en el Capítulo 15), que en este contexto actúa como un mensajero intracelular que guía la organización del citoesqueleto.

Al mismo tiempo, el complejo Par3/Par6/aPKC fosforila localmente un regulador de la arquitectura intracelular denominado Lgl (larva gigante letal), con lo cual dirige otra proteína adaptadora llamada Miranda a que se concentre en el córtex del extremo opuesto (basal) de la célula (Figura 22–66B). Miranda se une a proteínas que controlan la diferenciación y la proliferación, concentrándolas en un mismo lugar. Cuando el neuroblasto se divide, Miranda y su cargamento se segregan y quedan dentro de la célula madre ganglionar. Una de las moléculas que también van a la célula madre ganglionar es una proteína reguladora llamada Prospero, que dirige la diferenciación. Otra es un represor postranscripcional llamado Brat (**Bra**in **t**umor; tumor cerebral). Brat actúa como inhibidor de la proliferación celular, aparentemente impidiendo la producción de la proteína activadora del crecimiento Myc, famosa por su papel en el cáncer (tratado en el Capítulo 20). En mutantes que carecen de Brat o que no se localiza en el lugar adecuado, la célula hija más pequeña de la división asimétrica del neuroblasto normalmente no llega a diferenciarse como célula madre ganglionar, sino que crece y se divide como un neuroblasto. El resultado es un tumor cerebral: una masa de neuroblastos que crece de forma exponencial y sin límite, hasta que la mosca muere.

Especialmente en relación con el cáncer, es de gran interés la cuestión de si los tejidos de los vertebrados tienen células madre que se comporten como los neuroblastos de la mosca.

En muchos tejidos, la señalización Notch regula el patrón detallado de los tipos de células diferenciadas

Cada una de las células hijas de una célula madre ganglionar puede convertirse en una neurona o en una célula glial. Esta elección final está controlada por la señalización Notch y la inhibición lateral, igual que la elección del destino de la prole de una célula madre sensorial del sistema nervioso periférico. De hecho, la inhibición lateral mediada por Notch es crucial para la diversificación celular y el patrón detallado en una gran variedad de tejidos. En la mosca no sólo controla la producción de neuronas, sino también de otros muchos tipos de células diferenciadas, por ejemplo, en el músculo, el tubo digestivo, el sistema excretor, la tráquea y también en el ojo y otros órganos sensoriales. En los vertebrados, son homólogos

de Notch y sus ligandos los que se expresan en los correspondientes tejidos y tienen funciones similares; las mutaciones de la vía Notch desajustan el equilibrio, no sólo de neuronas y células no neuronales del sistema nervioso central, sino también de diferentes células especializadas del tubo digestivo, las células endocrinas y exocrinas del páncreas y también de las células sensoriales y las acompañantes en órganos como el oído, para citar sólo algunos ejemplos relevantes.

En estos tejidos se necesita una mezcla equilibrada de diferentes tipos celulares. La señalización Notch proporciona los medios para generar esta mezcla, habilitando células individuales que expresan un grupo de genes para hacer que las células vecinas más cercanas expresen otro grupo.

Algunos genes reguladores son clave para definir un tipo celular; otros pueden activar el programa de generación de un órgano completo

Como se mencionó al principio de este capítulo, existen algunos genes cuyos productos actúan como activadores del desarrollo de un órgano específico, iniciando y coordinando el complejo programa total de expresión génica que se requiere para ello. Así, por ejemplo, cuando el gen *Eyless* se expresa de forma artificial en un grupo de células del disco imaginal de la pata, se desarrollará en la pata un trozo de tejido de ojo, perfectamente organizado y con todos los tipos celulares bien ordenados (véase la Figura 22–2). De modo similar, cuando una célula hace su elección final de un modo particular de diferenciación, en el último juego de interacciones mediadas por Notch, tiene que seguir un programa complejo que incluye la expresión de todo un grupo de genes; este programa de diferenciación está iniciado y coordinado por un grupo más o menos pequeño de reguladores de alto nivel. Estos reguladores se llaman a veces "proteínas reguladoras maestras", aunque sólo pueden ejercer su efecto específico en combinación con los acompañantes adecuados, en una célula debidamente iniciada.

Un ejemplo de ello es la familia MyoD/miogenina de proteínas reguladoras. Éstas inducen las células a diferenciarse como músculo, expresando las actinas y miosinas específicas y todas las otras proteínas citoesqueléticas, metabólicas y de membrana que la célula muscular necesita (véase la Figura 7–75). Las proteínas reguladoras que definen tipos de células determinados a menudo pertenecen a la familia básica estructural de hélice-bucle-hélice (como es el caso de MyoD y de otras proteínas relacionadas), que son codificadas por genes homólogos a los proneurales (a veces aparentemente idénticos a ellos), que ya se han mencionado. Su expresión está casi siempre gobernada por la vía Notch, mediante complicados bucles de retroalimentación.

La diferenciación celular terminal nos ha llevado al final del esbozo de cómo los genes controlan la construcción de una mosca. La explicación ha sido necesariamente simplificada. En los procesos del desarrollo descritos intervienen muchos más genes de los mencionados. Bucles de retroalimentación, mecanismos alternativos que actúan en paralelo, redundancia génica y otros fenómenos complican en gran medida la imagen final. No obstante, el mensaje predominante de la genética del desarrollo es su inesperada sencillez. Un número limitado de genes, utilizados repetidamente en diferentes circunstancias y combinaciones, son los responsables del control de las características principales del desarrollo de todos los animales pluricelulares.

A continuación, la exposición girará en torno a un aspecto del desarrollo animal que hemos dejado relegado: los desplazamientos celulares.

Resumen

Las partes externas de una mosca adulta se desarrollan a partir de unas estructuras epiteliales llamadas discos imaginales. Inicialmente cada disco imaginal está dividido en un número de dominios que expresan distintas proteínas reguladoras, como resultado de los procesos embrionarios tempranos de formación del patrón. Estos dominios se llaman compartimientos porque las células no se mezclan. En las líneas fronterizas entre compartimientos, las células que expresan distintos genes se enfrentan unas con otras e interactúan, induciendo una producción localizada de morfógenos que gobiernan el crecimiento posterior y la formación del patrón de cada compartimiento. Así, en el disco del ala, las células dorsales y ventrales interactúan mediante el mecanismo de seña-

lización Notch y generan una fuente de la proteína Wingless (Wnt) a lo largo de la línea dorsoventral del compartimiento, mientras que las células anteriores y posteriores interactúan mediante la señalización Hedgehog, de corto alcance, y dan lugar a una fuente de proteína Dpp (un miembro de la familia TGFβ) a lo largo de la línea anteroposterior del compartimiento. Todas estas moléculas señal tienen homólogos que desempeñan papeles similares en la formación de las extremidades de los vertebrados.

Cada compartimiento de un disco imaginal y cada subestructura de su interior crecen hasta un tamaño predecible, incluso si sufren alteraciones drásticas, tales como mutaciones que alteran el ritmo de la división celular. Aunque los gradientes de morfógeno del disco están sin duda implicados, los mecanismos reguladores críticos que controlan el tamaño de los órganos todavía no son bien conocidos.

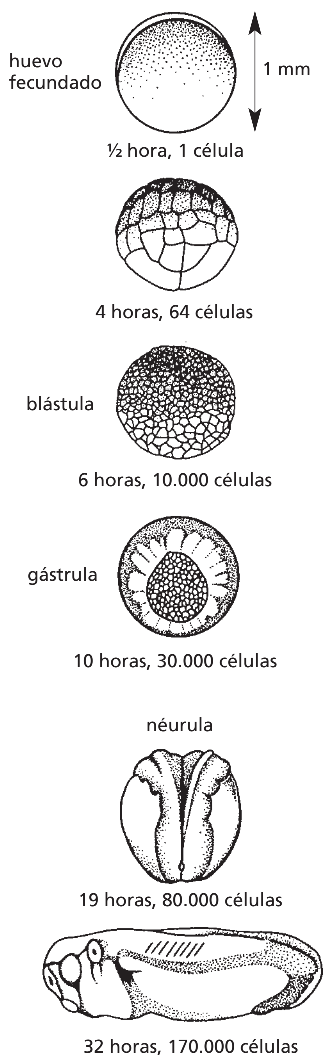
Dentro de cada compartimiento, los gradientes de morfógeno controlan los lugares de expresión de otros grupos de genes y definen agregados de células que interactúan de nuevo generando los detalles con más alta definición del patrón final de diferenciación celular. Así por ejemplo, la expresión de los genes proneurales define en qué lugares se formarán las quetas sensoriales y los mecanismos por los cuales las células toman diferentes vías de diferenciación terminal son las interacciones entre las células del agregado proneural, mediadas por Notch, junto con las divisiones asimétricas. En el sistema nervioso central, los neuroblastos se escogen del ectodermo por inhibición lateral de un modo similar, pero después sufren una larga serie de divisiones asimétricas como células madre, generando las neuronas y la glía. Los errores en la distribución asimétrica de las moléculas que controlan la diferenciación y la proliferación provocan la transformación de las células madre neuroblásticas en células tumorales.

Parece que muchos de estos mecanismos también actúan en los tejidos de vertebrados.

LOS DESPLAZAMIENTOS CELULARES Y LA FORMACIÓN DEL CUERPO DE LOS VERTEBRADOS

La mayoría de las células del cuerpo de un animal son móviles y en el embrión en desarrollo sus desplazamientos suelen ser extensos, intensos y sorprendentes. <GAGC> Cambios controlados en la expresión génica producen series ordenadas de células en diferentes estados; los desplazamientos celulares reordenan estas piezas de construcción y las colocan en sus lugares correspondientes. Los genes que expresan las células determinan cómo deben desplazarse; en este sentido, el control de la expresión génica es el fenómeno principal. Los desplazamientos son cruciales y, por lo tanto, es necesario encontrar una explicación para ellos si queremos comprender cómo se crea la arquitectura del cuerpo. En esta sección se examinará este tema en el contexto del desarrollo de los vertebrados. Tomaremos como ejemplo principal la rana *Xenopus laevis* (**Figura 22–67**), en la cual se han estudiado los desplazamientos celulares, pero también se prestará atención a lo que ocurre en el pollo, el pez cebra y el ratón.





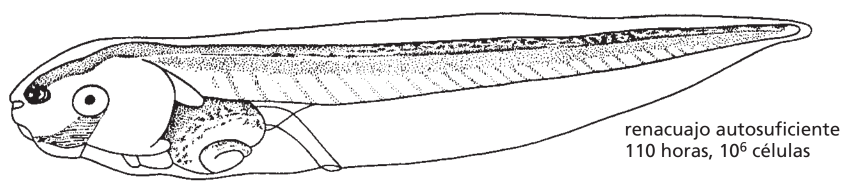


Figura 22–67 Sinopsis del desarrollo de *Xenopus laevis*, desde el huevo recién fecundado hasta el renacuajo autosuficiente. El sapo adulto se muestra en la fotografía de arriba. Los estadios de desarrollo se ven de lado, excepto los embriones de 10 y de 19 horas que se ven desde abajo y desde arriba, respectivamente. Todos los estadios excepto el adulto se muestran a la misma escala. (Fotografía cedida por cortesía de Jonathan Slack; dibujos según P.D. Nieuwkoop y J. Faber, Normal Table de *Xenopus laevis* [Daudin]. Amsterdam: North-Holland, 1956.)

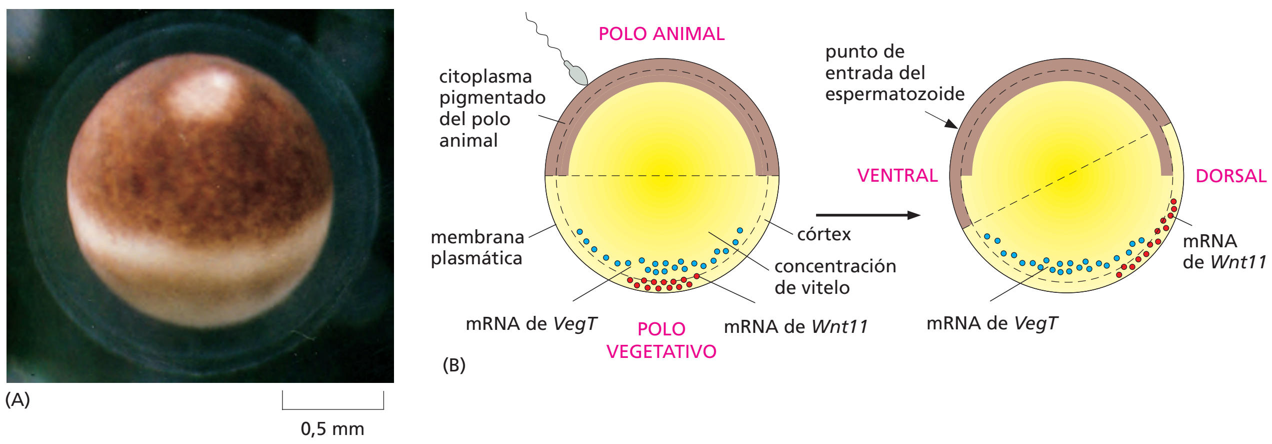


Figura 22–68 Huevo de *Xenopus* y sus asimetrías. (A) Vista lateral de un huevo de *Xenopus* justo antes de producirse la fecundación. (B) Distribución asimétrica de moléculas dentro del huevo y cómo estos cambios definen, una vez que ha tenido lugar la fecundación, la asimetría dorsoventral y animal-vegetal. Mediante la reorganización de los microtúbulos, la fecundación desencadena una rotación del córtex del huevo (un estrato de unos cuantos µm de profundidad) de alrededor de 30º con respecto al núcleo del huevo, en un sentido determinado por el punto de entrada del espermatozoide. Algunos componentes aún se transportan más hacia la futura zona dorsal mediante transporte activo mediado por microtúbulos. La concentración dorsal resultante de mRNA de *Wnt11* conduce a una producción dorsal de la proteína señal Wnt11 en esta zona y define la polaridad dorsoventral del futuro embrión.
(A, cortesía de Tony Mills.)

La polaridad de un embrión de anfibio depende de la polaridad del huevo

El huevo de *Xenopus* es una célula bastante grande, de poco más de 1 mm de diámetro (**Figura 22–68**A). La parte inferior, de color más claro, se denomina el polo vegetativo, y la parte superior, más oscura, el polo animal. Los dos hemisferios contienen diferentes selecciones de moléculas de mRNA y otros componentes celulares que se reparten entre cada una de las células resultantes de la división que tiene lugar después de la fecundación. Cerca del polo vegetativo encontramos un cúmulo de moléculas de mRNA que codifican la proteína reguladora VegT (una proteína que se une al DNA de la familia T–Box) y proteínas señal de la superfamilia TGFβ, así como algunos componentes proteicos específicos de la vía de señalización Wnt (Figura 22–68B). En consecuencia, las células que heredan el citoplasma vegetativo producirán señales que organizan el comportamiento de las células adyacentes, que se comprometerán a formar el tubo digestivo (el tejido más interno del cuerpo); las células que hereden el citoplasma animal formarán los otros tejidos. Así, en términos generales, el eje animal-vegetal del cuerpo corresponde a las dimensiones externa-interna (piel-tubo digestivo) del futuro organismo.

La fecundación inicia una serie de divisiones y desplazamientos que finalmente invaginarán las células vegetales y las de la región ecuatorial del eje animal-vegetal. En el transcurso de estos complejos desplazamientos, se establecen los tres ejes principales del cuerpo: el *anteroposterior*, de la cabeza a la cola; el *dorsoventral* de la espalda al vientre, y el *mediolateral* desde la línea media hacia afuera, a la derecha o a la izquierda. La orientación de estos ejes queda determinada por las asimetrías del embrión temprano. El huevo no fecundado tiene un solo eje de asimetría (el animal-vegetal), pero la fecundación desencadena los desplazamientos intracelulares que darán al huevo una asimetría adicional, definiendo un segundo eje perpendicular al primero. Después de la entrada del espermatozoide, el córtex del huevo, rico en actina, realiza una rotación con respecto al centro del huevo, de manera que el polo animal se desplaza un poco hacia un lado. Los tratamientos que bloquean la rotación no impiden que tenga lugar la segmentación con normalidad, pero generan un embrión con un tubo digestivo central y sin estructuras dorsales ni asimetrías. Por lo tanto, la rotación es necesaria para definir el eje dorsoventral del futuro organismo. Este eje de simetría que se crea en el huevo por rotación se llama el eje dorsoventral del huevo. Sin embargo hemos de destacar que los desplazamientos celulares posteriores indican que la relación entre los ejes del huevo y los del futuro organismo es más complicada de lo que la terminología podría sugerir. La dirección de la rotación cortical es sesgada y depende del punto de entrada del espermatozoide, que podría estar situado hacia el centrosoma y entonces el desplazamiento estaría asociado a una reorganización de los microtúbulos en el citoplasma del huevo. Este proceso llevaría a un transporte de varios componentes basado en los microtúbulos, incluyendo el mRNA que codifica Wnt11, un miembro de la familia de moléculas señal, hacia el futuro lado dorsal (véase la Figura 22–68B). Este mRNA se traduce pronto, produciendo la proteína en el lado dorsal de la región vegetal. La Wnt11 secretada en esta región es crucial para que desencadene la cascada de sucesos que organizarán el eje dorsoventral del cuerpo.

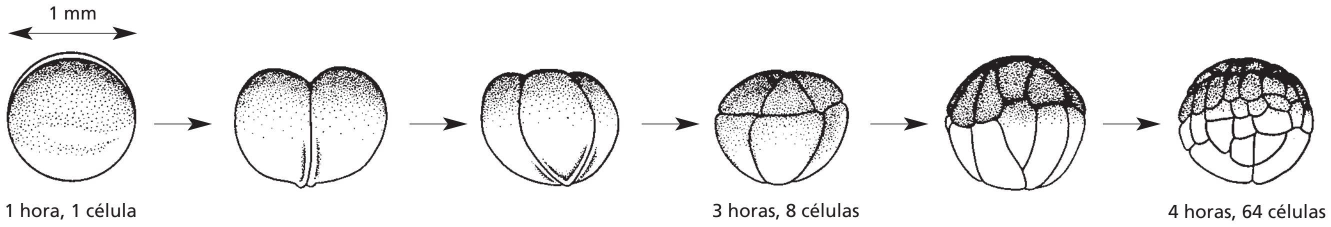


Figura 22–69 **Fases de la segmentación en *Xenopus*.** Las divisiones de la segmentación subdividen el huevo en muchas células más pequeñas. Todas las células se dividen sincrónicamente en las 12 primeras segmentaciones, pero las divisiones son asimétricas, de forma que las células inferiores vegetales, cargadas de vitelo, son más grandes y menos numerosas.

La segmentación genera muchas células a partir de una sola

La rotación cortical se completa aproximadamente al cabo de una hora después de la fecundación y va seguida de la segmentación, en la cual una célula huevo grande se subdivide mediante mitosis repetidas en muchas células más pequeñas llamadas *blastómeros*, sin cambio alguno en la masa total (**Figura 22–69**). <ATTT> De esta forma, los determinantes distribuidos asimétricamente en el huevo, se reparten entre dos células con destinos diferentes (**Figura 22–70**).

En *Xenopus* estas primeras divisiones celulares duran unos 30 minutos cada ciclo celular, con una alternancia directa de las fases S y M, tal como se ha descrito en el Capítulo 17. Parece que el ritmo trepidante de la replicación del DNA y de la mitosis impide casi toda la transcripción génica (aunque sí que existe síntesis de proteínas) y el embrión en segmentación depende casi en exclusiva de las reservas de RNA, proteínas, membranas y otros materiales almacenados en el huevo cuando se desarrollaba en la madre formando el oocito. Después de unos 12 ciclos de segmentación (7 horas), el ritmo de las divisiones se hace más lento y los ciclos celulares empiezan a seguir el patrón estándar con las fases G1 y G2 entre las fases S y M, y empieza la transcripción del genoma del embrión. Este suceso recibe el nombre de *transición a media blástula* y tiene lugar a un ritmo muy similar en muchas especies animales (aunque los mamíferos son una excepción). Los estudios con el pez cebra muestran que los transcritos acabados de sintetizar incluyen moléculas de micro-RNA que reconocen muchos de los transcritos almacenados en el huevo por la madre y dirigen su rápida degradación. La transición a media blástula marca el punto de partida en que el propio genoma del embrión toma el control del desarrollo.

La gastrulación transforma una esfera hueca en una estructura con tres capas y un tubo digestivo primitivo

Durante la segmentación, el embrión de rana que consistía en una esfera celular sólida se transforma en algo más que una esfera hueca, con una cavidad interna llena de fluido rodeada por células que se adhieren hasta formar una cubierta epitelial. Ahora, el embrión recibe el nombre de **blástula** (**Figura 22–71**).

Poco después, empiezan los desplazamientos coordinados de la gastrulación. <TCCC> Este proceso extraordinario transforma la esfera hueca en una estructura multicapa con un tubo digestivo central y simetría bilateral; se trata de una versión más elaborada del proceso esquematizado para el caso del erizo de mar (véase la Figura 22–3), en el cual un gran número de células del exterior del embrión se desplazan hacia dentro. El desarrollo posterior depende de las interacciones entre las capas interna, media y externa que se han formado: el

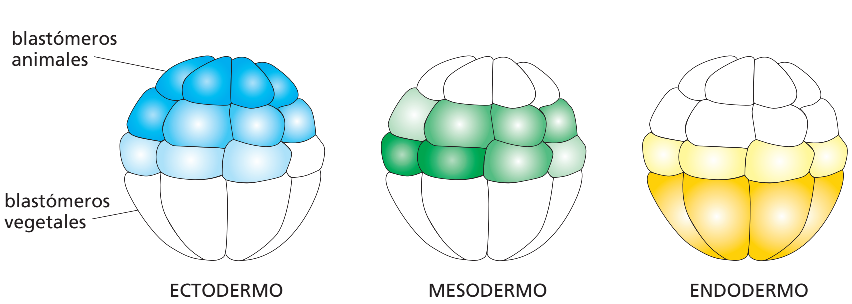


Figura 22–70 **El origen de las tres hojas germinales se remonta a los distintos blastómeros del embrión en sus estadios tempranos de la segmentación.** El endodermo deriva de los blastómeros vegetales, el ectodermo de los más animales y el mesodermo del grupo medio de blastómeros que también contribuye al endodermo y al ectodermo. La coloración intensa de los blastómeros es proporcional a la descendencia celular que contribuirá a la formación del estrato germinal. (Según L. Dale, *Curr. Biol.* 9: R812-R815, 1999. Con autorización de Elsevier.)

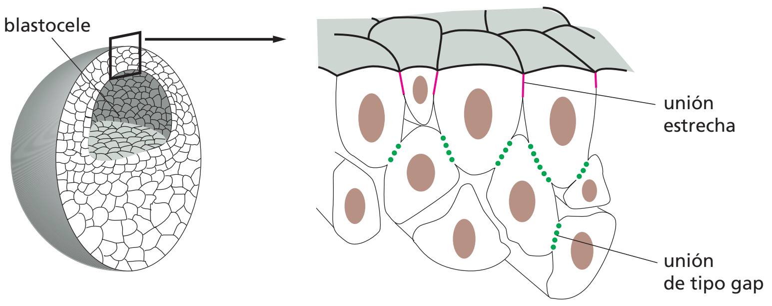


Figura 22–71 La blástula. En las regiones más externas del embrión, las uniones estrechas entre los blastómeros empiezan a formar una hoja epitelial que aísla el interior del embrión del medio externo. El ion Na^+ se bombea a través de esta hoja hacia los espacios del interior del embrión, generándose un gradiente de presión osmótica por el que el agua también entra en estos espacios. Como resultado de ello, los espacios intercelulares de dentro del embrión aumentan hasta formar una cavidad única, el blastocele. En *Xenopus*, la pared del blastocele tiene un grosor de varias células y sólo las células más externas están unidas con fuerza como en un epitelio.

endodermo en el interior, compuesto por las células que se han desplazado hacia el interior formando el tubo digestivo primitivo; el *ectodermo* en el exterior, formado por las células que han permanecido en la zona externa, y el *mesodermo* entre las dos, constituido por las células que se apartan del epitelio formando una organización más laxa del tejido conjuntivo embrionario (**Figura 22–72**). A partir de estas tres *hojas germinales* se formarán los tejidos característicos del vertebrado adulto, conservando la estructura corporal básica que se establece en la gastrulación.

Los desplazamientos de la gastrulación se pueden predecir con precisión

El patrón de desplazamientos de la gastrulación que da lugar a las capas germinales y establece los ejes del cuerpo se describe para *Xenopus* en la **Figura 22–73**. Los detalles son complejos, pero los principios son sencillos.

Las células del futuro endodermo se repliegan hacia el interior, o *involucionan*, sucesivamente una tras otra. El proceso empieza con un desplazamiento hacia abajo de las células del hemisferio animal hasta cubrir e incluir el hemisferio vegetal vitelino, que representa el suministro alimenticio del embrión. Las células que están en la vanguardia de este desplazamiento, en el margen vegetal de la capa de células que van avanzando, son las primeras en sufrir involución, girándose hacia dentro y luego desplazándose hacia arriba en dirección al polo animal hasta formar la parte más anterior del tubo digestivo. Cuando se acercan al polo animal, estas células endodérmicas señalarán al ectodermo que está por encima, definiendo el extremo anterior de la cabeza. Finalmente la boca se desarrollará como un orificio que se forma en una localización anterior donde el endodermo y el ectodermo entran en contacto directo. Mientras tanto, las futuras células mesodérmicas, destinadas a separarse de la capa epitelial para formar el relleno entre el endodermo y el ectodermo, se doblan hacia el interior junto con las células endodérmicas y también se desplazan hacia el polo animal. Las primeras células en involucionar son las que formarán parte de la cabeza y las últimas las que formarán parte de la cola. De esta forma, el eje anteroposterior del embrión final se va construyendo de forma secuencial.

Los desplazamientos anteroposteriores están estrechamente relacionados con los que organizan el eje dorsoventral. La gastrulación empieza en el lado de la blástula que se ha

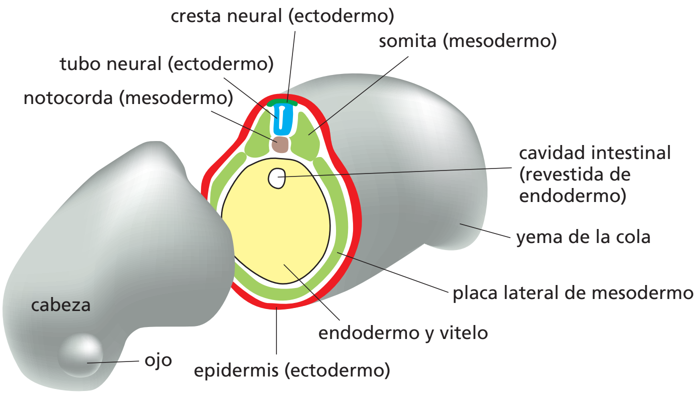


Figura 22–72 Sección transversal del tronco de un embrión de anfibio después del final de la gastrulación, que muestra la distribución de los tejidos endodérmicos, mesodérmicos y ectodérmicos. El endodermo formará el revestimiento epitelial del tubo digestivo, desde la boca hasta el ano. Da lugar no sólo a la faringe, esófago, estómago e intestinos, sino también a muchas glándulas asociadas. Por ejemplo, las glándulas salivares, el hígado, el páncreas, la tráquea y los pulmones se desarrollan a partir de extensiones de la pared del tracto digestivo original y crecen hasta convertirse en sistemas de tubos ramificados que se abren al intestino o a la faringe. El endodermo solamente forma los componentes epiteliales de estas estructuras, como el revestimiento interno del intestino o las células glandulares del páncreas. El soporte muscular y los elementos fibrosos proceden del mesodermo. El mesodermo da lugar a los tejidos conjuntivos, al principio una red tridimensional de células embrionarias que llenan de forma laxa un espacio y que se denomina mesénquima, y al final el cartílago, el hueso y el tejido fibroso como la dermis (el estrato más interno de la piel). El mesodermo también forma los músculos, el sistema vascular en su totalidad –incluyendo el corazón, los vasos sanguíneos y las células de la sangre– y los túbulos, conductos y tejidos de soporte de los riñones y de las gónadas. El ectodermo formará la epidermis (el estrato externo de la piel) y los apéndices epidérmicos como los pelos, las glándulas sudoríparas y las glándulas mamarias. También dará lugar a la totalidad del sistema nervioso, central y periférico, incluyendo no sólo las neuronas y la glía, sino también las células sensitivas de la nariz, el oído, el ojo y otros órganos de los sentidos. (Según T. Mohun et al., *Cell* 22:9-15, 1980. Con la autorización de Elsevier.)

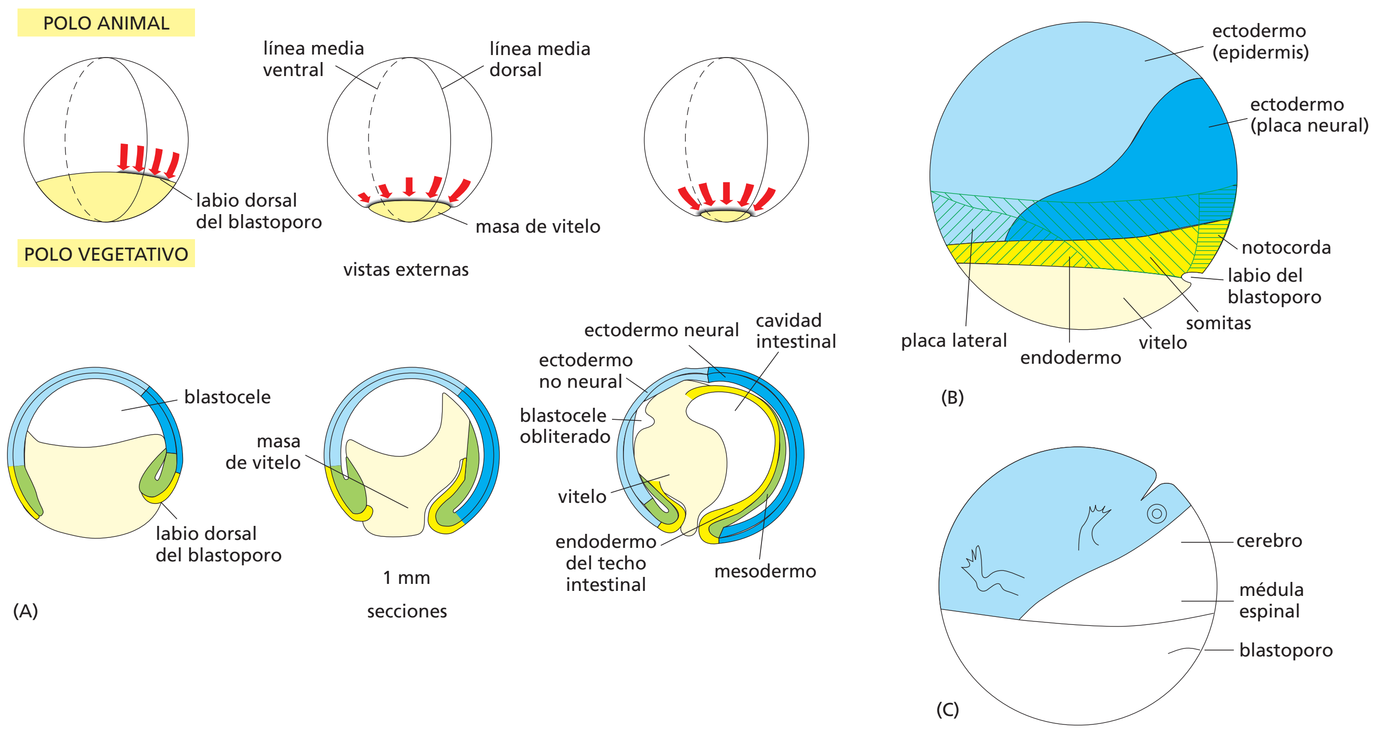


Figura 22–73 Gastrulación en *Xenopus*. <TCCC> (A) Por su aspecto externo (*arriba*), el embrión aparece como un objeto semitransparente, en este caso visto lateralmente; la dirección de los desplazamientos celulares se indican con *flechas rojas*; las secciones (*abajo*) se han efectuado según el plano mediano (el plano de las líneas medias dorsal y ventral). La gastrulación empieza cuando una pequeña muesca, el blastoporo incipiente, aparece visible en el exterior de la blástula. Esta muesca se extiende gradualmente, curvándose hasta formar un círculo completo y rodeando a una masa de células muy ricas en vitelo (destinadas a quedar encerradas dentro del intestino y ser digeridas). Mientras tanto, diferentes capas de células se introducen por el labio del blastoporo y penetran en profundidad hacia el interior del embrión. Al mismo tiempo, el epitelio externo de la región del polo animal se extiende activamente ocupando el lugar de las capas de células que se han introducido hacia adentro. Por último, el epitelio del hemisferio animal se extiende hasta cubrir todo el exterior del embrión y cuando finaliza la gastrulación, el círculo del blastoporo se ha reducido casi hasta hacerse un punto. (B) Mapa de destinos celulares para un embrión temprano de *Xenopus* (visto de lado) al inicio de la gastrulación, que muestran los orígenes de las células que formarán los tres estratos germinales como resultado de los desplazamientos de la gastrulación. Las diferentes partes del mesodermo (placa lateral, somitas y notocorda) derivan de células situadas profundamente, derivadas del epitelio de la región rayada. Las otras células, incluyendo las más superficiales de la región rayada, darán lugar al ectodermo (*azul, arriba*) o endodermo (*amarillo, abajo*). En general, las primeras células que se introducen, o se pliegan, se desplazarán hacia adentro del embrión formando las estructuras endodérmicas y mesodérmicas más anteriores, mientras que las últimas que se pliegan formarán las estructuras más posteriores. (C) Esquema que muestra cómo las diferentes regiones del ectodermo quedan representadas en la superficie corporal del animal adulto. (Según R.E. Keller, *J. Exp. Zool*. 216:81-101, 1981, con autorización de John Wiley & Sons, Inc. y *Dev. Biol*. 42:222-241, 1975, con autorización de Academic Press.)

marcado como dorsal por la rotación cortical. En esta zona, la involución de las células hacia el interior empieza con una pequeña indentación que rápidamente se extiende y forma el *blastoporo*: una línea de invaginación que se curva y rodea al polo vegetal. El lugar de inicio de la invaginación define el *labio dorsal del blastoporo*. Como veremos, este tejido desempeña un papel director en los sucesos siguientes y da lugar a las estructuras dorsales centrales del eje central del cuerpo.

Las señales químicas desencadenan los procesos mecánicos

VegT, *Wnt11* y otras moléculas de mRNA localizadas en el citoplasma vegetal del huevo producen distribuciones localizadas de sus productos proteicos. Éstos actúan en y sobre las células de la parte baja y media del embrión, les confiere caracteres especiales y las pone en marcha, ya sea por efectos directos o estimulando la producción de otras moléculas señal, en particular proteínas de la superfamilia TGFβ. Si se bloquean estas señales, no se generan los tipos celulares mesodérmicos y la gastrulación se interrumpe. La activación local de la vía Wnt en el lado dorsal del embrión, como resultado de la anterior rotación cortical (véase la Figura 22–68), modifica la acción de otras señales induciendo el desarrollo de células especiales que forman el labio dorsal del blastoporo (**Figura 22–74**).

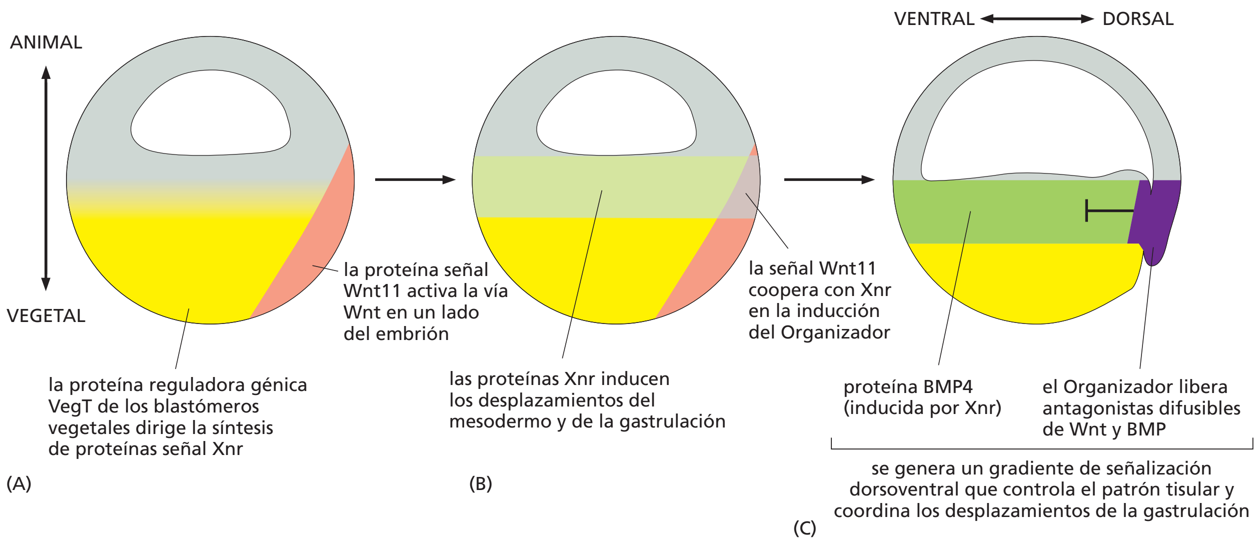


Figura 22–74 Vista actual de las principales señales inductivas que organizan los procesos de la gastrulación. (A) La distribución de las moléculas determinantes del eje en la blástula se produce a causa de la herencia de diferentes partes del citoplasma del huevo fecundado del sapo. La proteína reguladora génica VegT de los blastómeros vegetales se ha traducido a partir del mRNA de *VegT*, ya localizado en el polo vegetal antes de la fecundación. La proteína Wnt11en la futura cara dorsal se traduce del mRNA cuya localización viene dada por la rotación cortical que sigue a la fecundación. (B) VegT estimula la expresión de las proteínas Xnr (***X****enopus* ***n****odal-****r****elated*) y otros miembros de la superfamilia TGFβ que inducen la formación de una banda de mesodermo en la parte mediana del embrión, mientras que Wnt11 modifica la organización en el lado dorsal, cooperando con Xnr en la inducción de la formación del Organizador. (C) Un gradiente de morfógeno que define el eje dorsoventral surge de la combinación de señales como BMP4 (otro miembro de la superfamilia TGFβ), segregada por el mesodermo, y de antagonistas de las vías Wnt y de BMP segregados por las células del Organizador en el labio dorsal del blastoporo.

El labio dorsal del blastoporo desempeña un papel central en la gastrulación, no en el sentido geométrico, sino como una nueva fuente de control potente. Si el labio dorsal del blastoporo se extirpa al principio de la gastrulación y se injerta en otro embrión, pero en otra posición, el embrión huésped inicia la gastrulación en las dos posiciones: en su labio dorsal y en el lugar del injerto. Los desplazamientos de la gastrulación en el segundo lugar llevan a la formación de un segundo conjunto completo de estructuras corporales, con el resultado de un doble embrión (gemelos siameses) (véase la Figura 22–6B).

Es evidente que el labio dorsal del blastoporo es la fuente de una señal (o señales) que coordina los desplazamientos de la gastrulación y el patrón de especialización de los tejidos de su alrededor. Debido a su papel crucial en la organización de la formación del eje central del cuerpo, el labio dorsal del blastoporo se conoce con el nombre de **Organizador** (o de organizador de Spemann, en honor a su descubridor). Se trata del ejemplo más antiguo y más famoso de un *centro de señales embrionario*.

Cambios activos en el empaquetamiento celular proporcionan la fuerza motriz de la gastrulación

El Organizador controla el patrón dorsoventral de la diferenciación celular a todo su alrededor y secreta por lo menos seis proteínas señal. Estas proteínas actúan como antagonistas de los dos tipos principales de señales mencionadas y que se originan en las células más vegetales: las señales Wnt y las del tipo TGFβ (en concreto las proteínas BMP). Es posible que estos inhibidores que se originan en el Organizador contribuyan a limitar su propio tamaño, ya que impiden que las células vecinas adopten el carácter de Organizador. Al mismo tiempo, generan un gradiente de morfógeno, cuyo valor en cada lugar refleja la distancia del Organizador (Figura 22–74C). Durante los desplazamientos de la gastrulación, las células experimentan distintas dosis de BMP y otras señales, que se transmiten en diferentes momentos e inducen las células a distintos comportamientos que les llevan a sus destinos finales. Pero ¿cómo se organiza el patrón de desplazamientos celulares en términos mecánicos? y ¿qué tipo de fuerzas los impulsan?

La gastrulación empieza con cambios en la forma de las células del blastoporo. En los anfibios, estas células se denominan células botella: tienen un cuerpo ancho y un cuello estrecho que las une a la superficie del epitelio (**Figura 22–75**); estas células tienen que contribuir a que el epitelio se vea obligado a curvarse e invaginarse, produciéndose la indentación inicial, según se ve desde fuera. Cuando se ha formado el primer pliegue, las células pueden continuar desplazándose hacia el interior formando el tubo digestivo y el mesodermo. El desplazamiento se produce sobre todo mediante el reempaquetamiento activo de las células, especialmente de aquellas que se sitúan en las regiones que involucionan alrededor del Organizador (véase Figura 22–75). Entonces sucede la denominada **extensión convergente**. Si de este tejido se extraen pequeños fragmentos de forma cúbica y se cultivan aislados, observaremos que de forma espontánea se encogen y se alargan por reorganizaciones de las

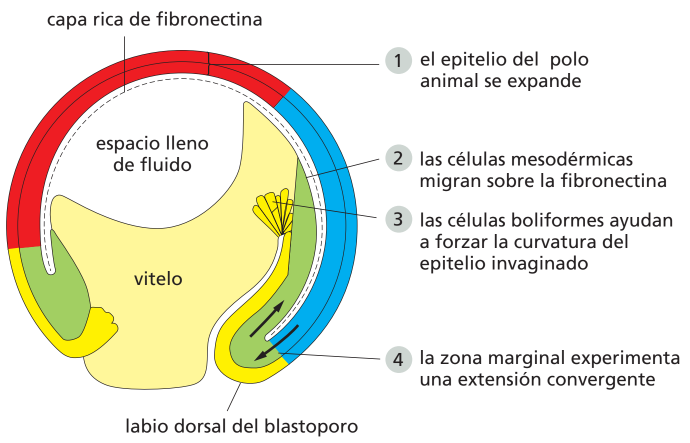


Figura 22–75 Desplazamientos celulares en la gastrulación. Sección de un embrión de *Xenopus* en gastrulación, obtenida en el mismo plano que en la Figura 22–73 indicándose los cuatro tipos principales de desplazamientos que participan en la gastrulación. El epitelio del polo animal se expande por reagrupamientos celulares y se vuelve más fino a medida que se va extendiendo. La migración de las células mesodérmicas sobre una matriz rica de fibronectina que tapiza el techo del blastocele puede ayudar a estirar los tejidos invaginados hacia adentro. Sin embargo, la fuerza conductora principal de la gastrulación en *Xenopus* es la extensión convergente en la zona marginal. (Según R.E. Keller, *J. Exp. Zool.* 216:81-101, 1981. Con la autorización de Wiley-Liss.)

células, igual que lo harían en el embrión durante el proceso de convergencia hacia la línea media dorsal, invaginándose alrededor del labio del blastoporo y luego alargándose hasta formar el eje central del cuerpo.

Para que se produzca esta transformación tan notable, las células individuales tienen que arrastrarse unas sobre otras de forma coordinada (**Figura 22–76**). La alineación de sus desplazamientos depende de la misma maquinaria mediante la que el gusano y la mosca controlan la polaridad planar: la vía de señalización de polaridad Frizzled/Dishevelled. Cuando se bloquea esta vía (p. ej., mediante una forma negativa dominante de Dishevelled), la extensión convergente no se produce.

Un cambio en los patrones de adhesión celular obliga a las células a reordenarse

Los patrones de expresión génica gobiernan los desplazamientos embrionarios de varias formas. Regulan la motilidad celular, la forma de las células y la producción de señales guía. Y lo que es más importante, también determinan los grupos de moléculas de adhesión que las células disponen en la superficie. Mediante cambios en estas moléculas de superficie, una célula puede romper antiguas adhesiones y establecer otras nuevas. Las células de una región determinada tienen que desarrollar propiedades de superficie que les permitan cohe-

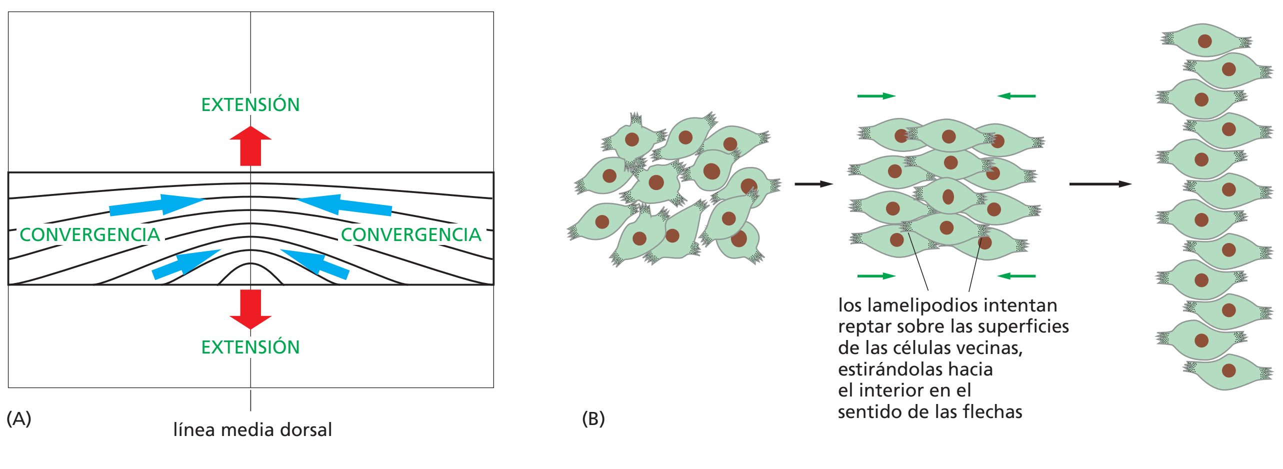


Figura 22–76 La extensión convergente y su base celular. (A) Patrón de extensión convergente en la zona marginal de la gástrula tal como se observa dorsalmente. Las *flechas azules* representan la convergencia hacia la línea media dorsal; las *flechas rojas* representan la extensión del eje anteroposterior. Este diagrama simplificado no muestra el desplazamiento que acompaña al plegamiento, por el que las células se someten hacia el interior del embrión. (B) Diagrama esquemático del comportamiento celular responsable de la extensión convergente. Las células forman lamelipodios, con los cuales intentan reptar una sobre otra. La extensión convergente se consigue por un alineamiento de los lamelipodios en un eje común. El proceso depende de la vía de señalización de polaridad Frizzled/Dishevelled y probablemente es cooperativo puesto que las células que ya están alineadas ejercen fuerzas que tienden a alinear a las vecinas de la misma manera. (B, según J. Shih y R. Keller, *Development* 116:901-914, 1992. Con autorización de The Company of Biologists.)

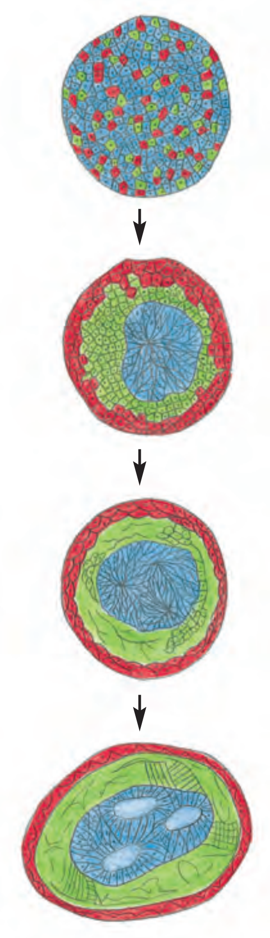


Figura 22–77 Clasificación. Células de diferentes partes de un embrión temprano de anfibio se clasifican de acuerdo con sus orígenes. En el experimento clásico mostrado, las células mesodérmicas (*verde*), las células de la placa neural (*azul*) y las células epidérmicas (*rojo*) se disgregan y reagregan posteriormente en una mezcla al azar. Se clasifican de acuerdo con una distribución reminiscente de un embrión normal, con un "tubo neural" interno, una epidermis externa y un mesodermo entre ambos. (Modificado de P.L. Townes y J. Holtfreter, *J. Exp. Zool*. 128:53-120, 1955. Con autorización de Wiley-Liss.)

sionarse con otras células y segregarse de un grupo de células vecinas cuya superficie es químicamente diferente.

Los experimentos llevados a cabo hace medio siglo en embriones de anfibios mostraron que los efectos de la adhesión selectiva célula-célula puede ser tan potente que se podría llevar a cabo una reconstrucción aproximada de la estructura normal de un embrión temprano en postgastrulación incluso después de haber disociado las células artificialmente. Cuando estas células se reagregan en una mezcla al azar, las células se distribuyen de forma espontánea según sus características originales (**Figura 22–77**). Como ya describimos en el Capítulo 19, las *cadherinas* (una familia extensa y variada de proteínas de adhesión dependientes de Ca^{2+}, evolutivamente relacionadas) desempeñan un papel central en estos fenómenos. Éstas y otras moléculas de adhesión célula-célula se expresan de modo diferente en varios tejidos del embrión temprano; los anticuerpos contra ellas interfieren en la adhesión selectiva normal entre células del mismo tipo.

Los cambios en los patrones de expresión de las distintas cadherinas se correlacionaron con los cambios en los patrones de asociación entre células durante la gastrulación, la neurulación y la formación de somitas (véase la Figura 19–25). Estas reordenaciones podrían estar reguladas en parte y dirigidas por el patrón de cadherinas. En concreto, las cadherinas tienen un papel importante en el control de la formación y disolución de capas epiteliales y agregados celulares. No sólo adhieren una célula a otra, sino que proporcionan el anclaje de los filamentos de actina en los lugares de adhesión célula-célula. De esta forma, el patrón de fuerzas y desplazamientos en el tejido en desarrollo se regula según el patrón de adhesiones.

La notocorda se alarga y la placa neural se abarquilla formando el tubo neural

La gastrulación es la primera maniobra, quizá la más extraordinaria, de una serie vertiginosa de desplazamientos que dan forma a las partes del cuerpo. Todo seguido se describirán algunos de ellos.

En el embrión inmediatamente posterior a la gastrulación, la capa del mesodermo está dividida en dos solapas separadas, una hacia el lado izquierdo y otra hacia el derecho. La especialización más temprana del mesodermo, que define el eje central del cuerpo y lo separa en dos mitades, es la llamada **notocorda**. Se trata de un fino cordón de células con ectodermo por encima, endodermo por debajo y mesodermo a cada lado (véase la Figura 22–72), que deriva del mismo Organizador. Las células de la notocorda se caracterizan por la expresión de una proteína reguladora llamada Brachyury (del griego: "cola corta", que corresponde al fenotipo mutante); pertenece a la misma familia T-box que la proteína VegT de los blastómeros vegetativos.

Cuando la notocorda da la vuelta al labio dorsal del blastoporo y se desplaza hacia el interior del embrión, se forma una columna de tejido que se alarga extraordinariamente por expansión convergente. Las células de la notocorda se llenan de vacuolas y el cordón se alarga todavía más y estira el embrión. La notocorda es la peculiaridad que define a los cordados (el fílum al cual pertenecen los vertebrados). Es una de las características principales de los vertebrados que no tiene ninguna contrapartida aparente en *Drosophila*. En los cordados más primitivos, que carecen de vértebras, la notocorda persiste como un sustituto primitivo de la columna vertebral. En los vertebrados actúa de núcleo alrededor del cual se reunirán finalmente otras células mesodérmicas formando las vértebras.

Mientras tanto en la capa superior tienen lugar otros desplazamientos, formando el ectodermo, que llevan a la formación de los rudimentos del tejido nervioso. Mediante un proceso llamado *neurulación* se engrosa una ancha región central del ectodermo llamada *placa neural*, se enrolla hacia arriba formando un tubo y se desengancha del resto de células de la

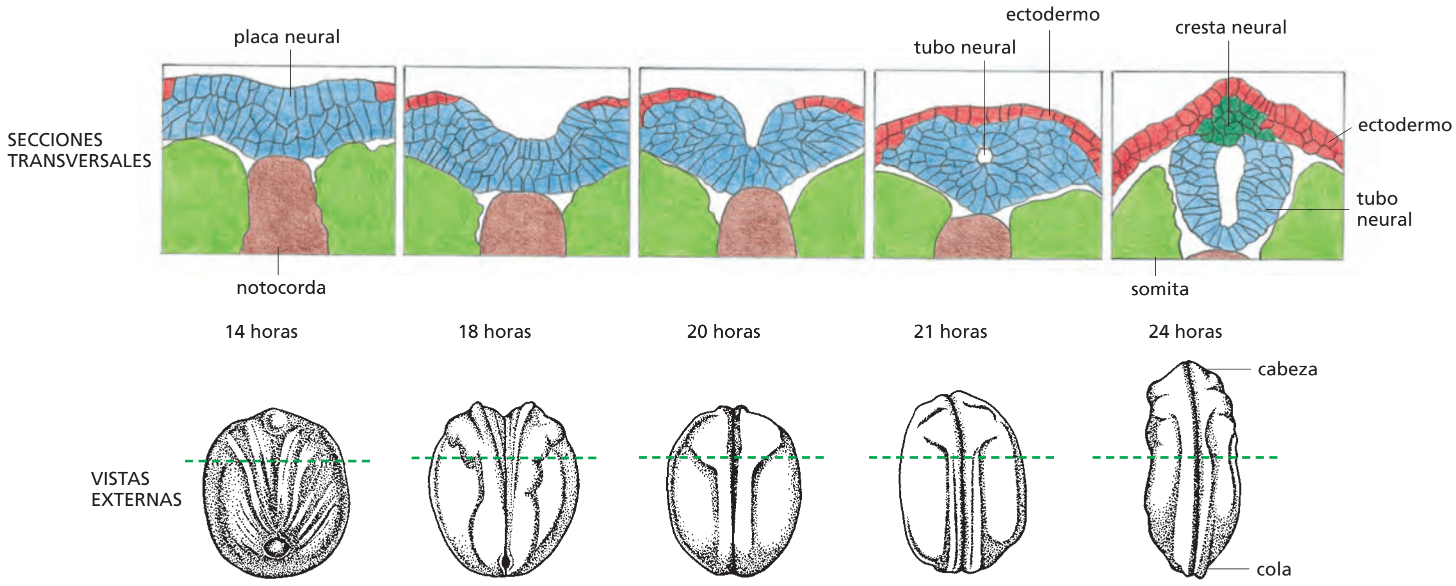


Figura 22–78 Formación del tubo neural en *Xenopus*. Las vistas externas son por la parte dorsal. Las secciones transversales se han cortado por el plano señalado por las líneas de trazos. (Según T.E. Schroeder, *J. Embryol. Exp. Morphol.* 23:427-462, 1970. The Company of Biologists.)

capa. Este tubo formado a partir de ectodermo se llama **tubo neural** y formará el cerebro y la médula espinal (**Figura 22–78**).

La mecánica de la neurulación depende de cambios en el empaquetamiento celular y en la forma de las células, que hacen posible que el epitelio se doble hacia arriba formando un tubo (**Figura 22–79**). Las señales que inicialmente proceden del Organizador y más tarde de la notocorda y del mesodermo, definen la extensión de la placa neural, inducen los desplazamientos que la hacen enrollar y también intervienen en la organización del patrón interno del tubo neural. Concretamente, la notocorda secreta la proteína Sonic hedgehog (un homólogo de la Hedgehog de *Drosophila*), que actúa como morfógeno en el control de la expresión génica de los tejidos circundantes (**Figura 22–80**).

Un oscilador de expresión génica controla la segmentación del mesodermo en somitas

Los cambios en la adhesión celular, regulados genéticamente, son el fundamento de uno de los procesos más sorprendentes y característicos del desarrollo de los vertebrados: la formación de los segmentos del eje corporal.

A cada lado del tubo neural recién formado encontramos una solapa de mesodermo (véase la Figura 22–72). Esta solapa se rompe en bloques separados o **somitas** (grupos de células cohesionadas y separadas por hendiduras), que formarán las series repetitivas de vértebras, costillas y músculos segmentarios. La **Figura 22–81**A muestra el proceso tal como tiene lugar en el embrión de pollo. Los somitas se forman uno tras de otro, empezando por la cabeza y terminando en la cola. Según las especies, el número de somitas varía entre menos de 50 (en ranas y aves) hasta más de 300 (en las serpientes). La parte posterior de la solapa mesodérmica, llamada *mesodermo presomítico*, es la zona más inmadura y es la que proporciona el tejido necesario: a medida que se va retrayendo hacia la cola, va alargando el embrión y depositando un rastro de somitas. El carácter especial del mesodermo presomítico se mantiene mediante la señal FGF: en el extremo posterior del embrión se sintetiza mRNA de *Fgf8* y las células se degradan poco a poco, alejándose de esta región. La traducción del mensaje genera un gradiente de proteína FGF8 que tiene su punto álgido en el extremo posterior.

Un patrón espacial alternante de expresión génica en el mesodermo presomítico prefigura la formación de la hendidura entre un somita y el siguiente; las células que formarán la parte posterior de cada nuevo somita inician la expresión de un grupo de genes, mientras que las que formarán la parte anterior del siguiente somita inician la expresión de otro grupo. La cohesión selectiva que resulta de la expresión génica diferencial parece ser la causa fundamental de la segmentación física que observamos.

El problema radica en comprender cómo se establece el patrón alternante repetitivo de expresión génica. Los estudios realizados originalmente con el embrión de pollo han pro-

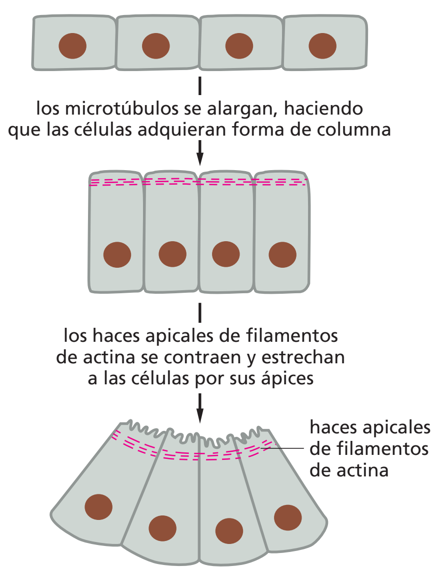


Figura 22–79 Flexión de un epitelio basada en cambios de forma celular mediados por microtúbulos y filamentos de actina. El esquema se basa en observaciones de neurulación en embriones de tritón y de salamandra, en los que el epitelio es monoestratificado. Mientras los extremos apicales de las células se estrechan, la membrana apical se pliega.

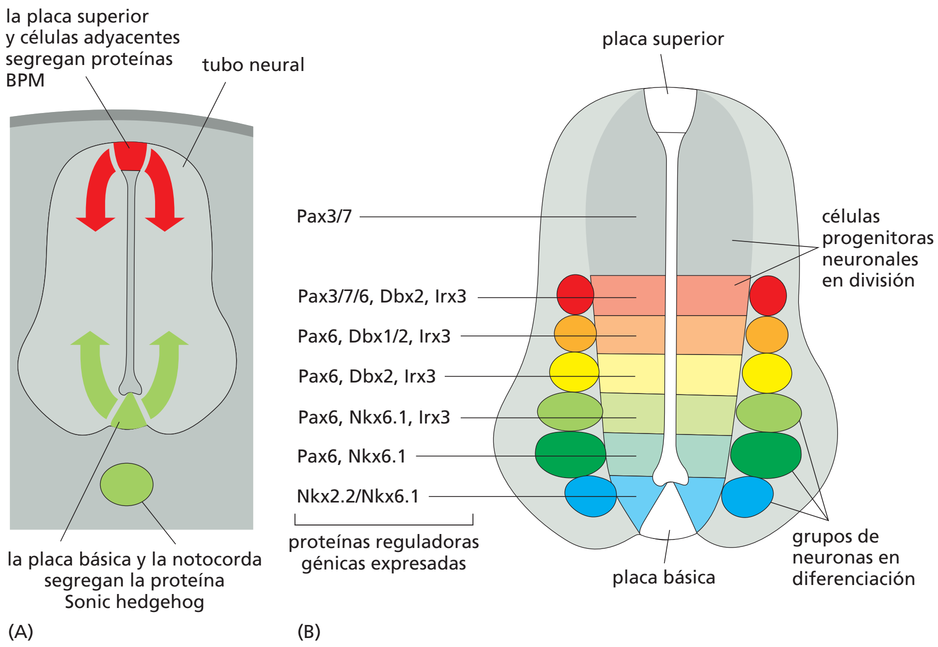


Figura 22–80 Esquema de una sección transversal de médula espinal de un embrión de pollo, mostrando de qué forma las células de diferentes niveles a lo largo del eje dorsoventral expresan diferentes proteínas reguladoras de genes. (A) Las señales que dirigen el patrón dorsoventral: la proteína Sonic hedgehog desde la notocorda y la placa base (la línea media ventral del tubo neural) y las proteínas BMP desde la placa superior (la línea media dorsal) actúan como morfógenos controlando la expresión génica. (B) Patrones resultantes de expresión génica en la parte ventral de la médula espinal en desarrollo. Diferentes grupos de células neuronales progenitoras en proliferación (en la zona ventricular, junto a la luz del tubo neural) y de neuronas en diferenciación (en la zona del manto, adicional externa) expresan diferentes combinaciones de proteínas reguladoras génicas. Casi todas las proteínas indicadas en este diagrama son miembro de la superfamilia homeodominio; otros genes de la misma superfamilia (como las proteínas Islet/Lim) se expresan en las neuronas en diferenciación. Expresando diferentes proteínas reguladoras génicas, las neuronas forman conexiones con diferentes compañeras y deberán formar diferentes combinaciones de neurotransmisores y de receptores.

porcionado los primeros indicios de la respuesta. En la parte posterior del mesodermo presomítico la expresión de determinados genes oscila en el tiempo. El primero de estos genes osciladores que se descubrió fue el *Hes1*, un homólogo del gen de regla par de *Drosophila* llamado *Hairy* y la de los genes *E(spl)* que median las respuestas a la señal Notch. La longitud total de un ciclo de oscilación completa de este reloj de segmentación (90 minutos en el pollo) es igual al tiempo que se necesita para producir un nuevo somita. A medida que las células emergen del mesodermo y forman los somitas (en otras palabras: a medida que pierden exposición a la señal FGF8), su oscilación se hace más lenta y finalmente se detiene. Algunas de estas células permanecen retenidas en un estado y otras en otro, según la fase de su ciclo de oscilación en el momento de salir del mesodermo presomítico. *Hes1* y otros genes osciladores codifican proteínas reguladoras; entonces, las células que se encuentran por debajo del nivel crítico de FGF8 cuando están en el máximo de su ciclo de oscilación, activan un

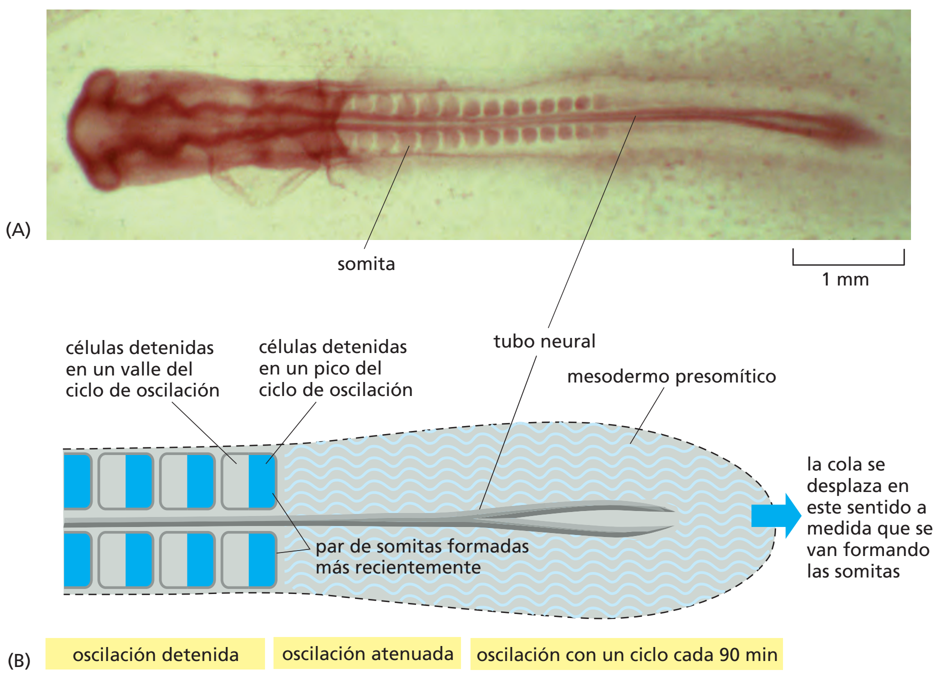


Figura 22–81 Formación de las somitas en el embrión de pollo. (A) Embrión de pollo a las 40 horas de incubación. (B) Cómo se traduce la oscilación temporal de la expresión génica en el mesodermo presomítico, en un patrón espacial alternante de la expresión génica en las somitas formadas. En la parte posterior del mesodermo presomítico, cada célula oscila con un periodo de 90 minutos. A medida que las células van madurando y emergen de la región presomítica, su oscilación se atenúa de forma gradual hasta pararse en cualquier fase del ciclo y en particular en un momento crítico. De este modo, una oscilación temporal de expresión génica dibuja un patrón espacial alternante. (A, de Y.J. Jiang, L. Smithers y J. Lewis, *Curr. Biol*. 8:868-871, 1998. Con autorización de Elsevier.)

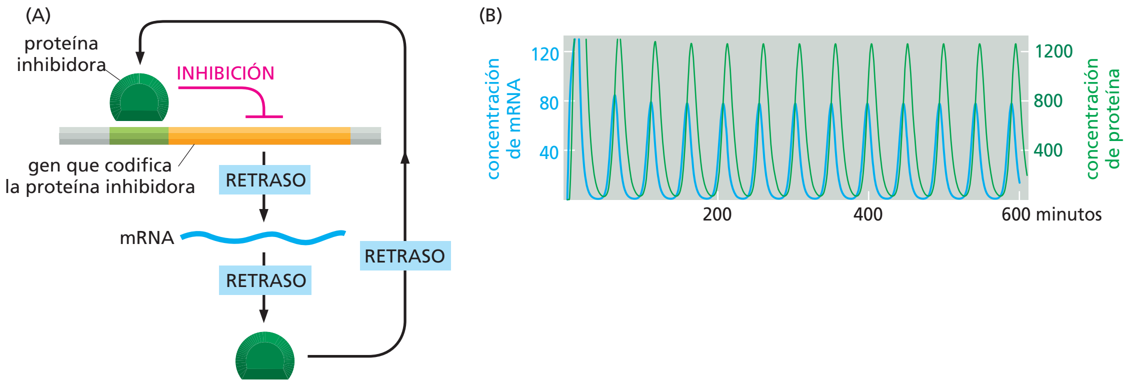


Figura 22–82 La retroalimentación negativa retardada da lugar a una expresión génica oscilatoria. (A) Un solo gen, que codifica una proteína reguladora génica que inhibe su propia expresión, puede comportarse como un oscilador. Para que la oscilación tenga lugar, tiene que haber un retardo (o varios retardos) en el circuito de retroalimentación y la semivida del mRNA y de la proteína tienen que ser cortas en comparación con el retraso total. El retraso determina el periodo de oscilación. Una teoría propone que un circuito de retroalimentación como éste, basado en un gen denominado *Her7* en el pez cebra, o *Hes7* en el ratón (parecido a *Hes 1*), es el marcapasos del reloj de segmentación que gobierna la formación de la somita. (B) Oscilación estimada del mRNA de *Her7* y su proteína, estudiada utilizando estimadores aproximados de parámetros del circuito de retroalimentación apropiados para este gen en el pez cebra. Las concentraciones se han medido como número de moléculas por célula. El periodo estimado es muy parecido al periodo observado, el cual es de 30 minutos por somita en el pez cebra.

grupo de genes reguladores, mientras que aquellas que pasan por el umbral cuando están en el mínimo del ciclo, activan otros genes (Figura 22–81B). En consecuencia, podemos afirmar que la oscilación temporal de la expresión génica en el mesodermo presomítico deja su rastro en un patrón de expresión especialmente periódico en el mesodermo en desarrollo y, a su vez, impone que el tejido se separe físicamente en bloques separados.

Las oscilaciones del reloj de segmentación pueden deberse a una retroalimentación negativa retardada

¿Cuál es el mecanismo que genera la oscilación temporal? ¿Cómo funciona el reloj de segmentación? En el mesodermo del ratón se han reconocido tres clases de genes que tienen expresión oscilante que codifican, respectivamente, componentes de las vías Notch, Wnt y Fgf. Pero la mayoría de las mutaciones que alteran el reloj y la segmentación de los somitas pertenecen a componentes de la vía Notch. Entre ellos, se encuentran genes como *Hes1* y sobre todo *Hes7*, que son regulados por Notch y codifican proteínas inhibidoras. Algunas de estas proteínas actúan de forma directa sobre el DNA regulador o sobre sus propios genes inhibiendo su expresión. Según una de las teorías, este sencillo bucle de realimentación podría ser el generador principal de las oscilaciones (**Figura 22–82**): cuando se transcribe el gen, la cantidad de proteína producida va en aumento hasta que la transcripción es inhibida y cesa la síntesis de proteínas; entonces la proteína disminuye y la transcripción tiene que volver a empezar, y así sucesivamente. Existe un retraso entre el inicio de una nueva transcripción y la aparición de las moléculas de proteína en el núcleo, porque la RNA polimerasa necesita un tiempo para examinar el gen y luego los transcritos de RNA tienen que madurar, salir del núcleo y dirigir la síntesis de la molécula proteica, que deberá controlar la transcripción una vez dentro del núcleo. Se supone que este retraso en el bucle de realimentación es el determinante principal del periodo de oscilación del reloj y, por lo tanto, del tamaño de cada somita.

La mayor parte de las células de cada nuevo somita se diferencian con rapidez y forman un fragmento de músculo que corresponde a un segmento muscular del eje principal del cuerpo. El embrión ya puede empezar a ondularse. Otros subgrupos de células formarán las vértebras y tejidos conjuntivos como la dermis. Y otro subgrupo se separará del somita y migrará hacia el mesodermo lateral no segmentado, arrastrándose por los espacios entre otras células; estas células migradoras son las que darán lugar a casi todas las células musculares esqueléticas del cuerpo, incluyendo las de las extremidades.

Las células migradoras invaden los tejidos embrionarios de forma estrictamente controlada

Los precursores de las células musculares o *mioblastos*, que emigran de los somitas, están determinados, pero no definitivamente diferenciados. En los tejidos que colonizan, se mezclan con otras clases de células, de las cuales apenas se distinguen; pero mantienen la expresión de las proteínas reguladoras específicas de mioblastos (como Pax3 y miembros de la familia MyoD); cuando llega la hora de diferenciarse, sólo ellos se convertirán en células musculares (**Figura 22–83**).

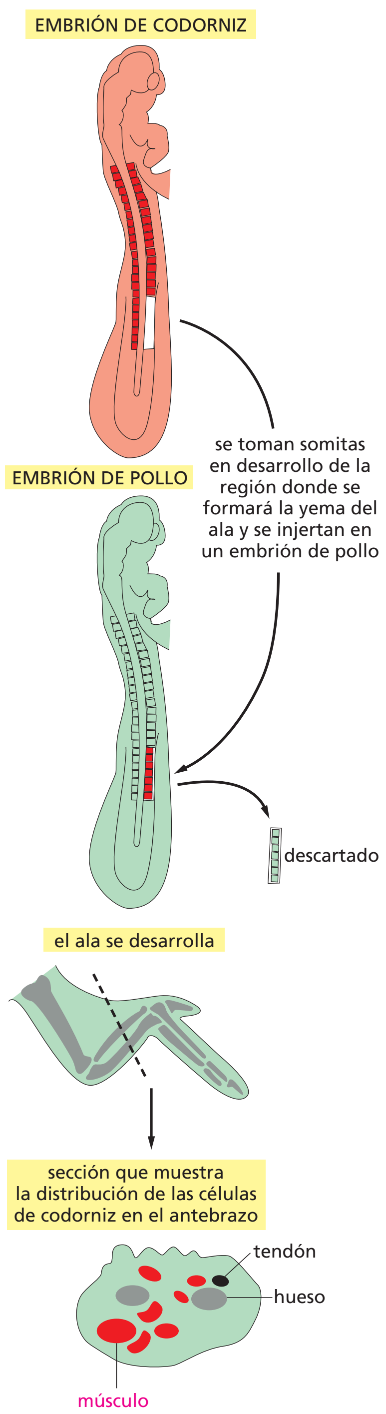


Figura 22–83 El origen migratorio de las células musculares de una extremidad. Las migraciones se pueden seguir injertando células procedentes de un embrión de codorniz en un embrión de pollo; las dos especies tienen un desarrollo muy similar, pero las células de codorniz son reconocibles por la forma característica de sus nucléolos. Si a los 2 días de la incubación de un embrión de pollo se sustituyen células de somita por células de somita de codorniz y una semana después se secciona el ala del pollo, se ve que las células musculares del ala de pollo derivan de las somitas de codorniz trasplantadas.

El patrón final de los músculos (p. ej., en las extremidades) queda determinado por las rutas que siguen las células migradoras y la selección de los lugares que colonizan. Los tejidos conjuntivos embrionarios forman el armazón a través del cual viajan los mioblastos y proporcionan las señales que guían su distribución. Sin importar de qué somita hayan partido, los mioblastos que migran hacia una yema de una extremidad anterior formarán el patrón de músculos apropiado para la extremidad anterior, y los que migran hacia una yema de una extremidad posterior formarán el patrón apropiado para ella.

Otras clases de células migradoras seleccionarán otras rutas para sus desplazamientos. A lo largo de la línea donde el tubo neural se desengancha de la futura epidermis, otro grupo de células epidérmicas se separan del epitelio y también migran, individualmente, a través del mesodermo (**Figura 22–84**). Se trata de las células de la **cresta neural**, que darán lugar a casi todas las neuronas y células de la glía del sistema nervioso periférico, así como a las células pigmentarias de la piel y también a muchos tejidos conjuntivos de la cabeza, incluyendo los huesos del cráneo y de las mandíbulas. Otras células migradoras importantes son las precursoras de las células sanguíneas, de las células germinales y de muchos grupos de neuronas del sistema nervioso central, así como de las *células endoteliales* que forman los vasos sanguíneos. Cada una de estas clases de células migradoras colonizará distintos lugares. Como resultado de estas invasiones, muchos tejidos del cuerpo de los vertebrados son mezclas de células de diferentes características derivadas de zonas muy separadas del embrión.

Mientras cada célula migratoria se desplaza por los tejidos embrionarios, extiende de forma repetida proyecciones, que examinan sus alrededores, en busca de indicios sutiles a los cuales sea en particular sensible, gracias a las proteínas receptoras de la superficie de su membrana. Dentro de la célula, estas proteínas están conectadas al citoesqueleto que permite el desplazamiento de la célula. Algunas sustancias de la matriz extracelular, como la

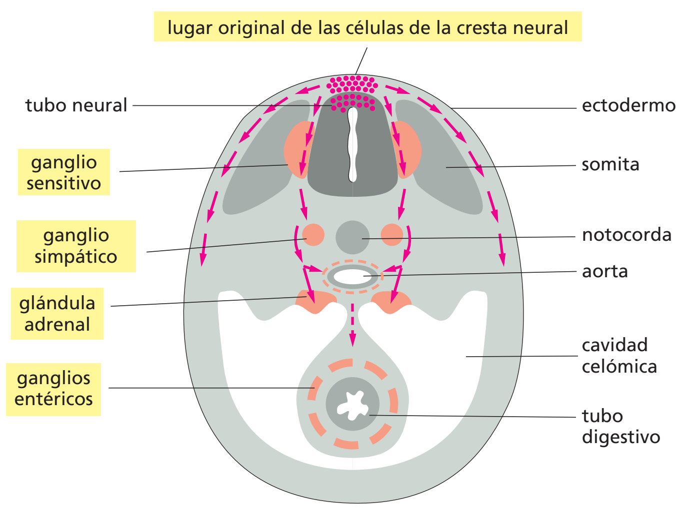


Figura 22–84 Principales vías de migración celular de la cresta neural. Se muestra la sección transversal esquemática de un embrión de pollo en la parte media del tronco. Los derivados de cresta neural situados más profundamente están indicados en rectángulos *amarillos*. Las células que emprenden la vía justo debajo del ectodermo formarán las células pigmentarias de la piel; las que viajan profundamente por entre las somitas formarán las neuronas y las células gliales de los ganglios sensitivo y simpático, y partes de la glándula adrenal. Las neuronas y las células gliales de los ganglios entéricos, en la pared del intestino, se forman a partir de células de la cresta neural que han migrado a lo largo de la longitud del cuerpo desde la región del cuello o la región sacra. En *Drosophila*, las neuronas de la pared del intestino se originan de forma similar, por migración desde el extremo cefálico del embrión. (Véase también Figura 19–23.)

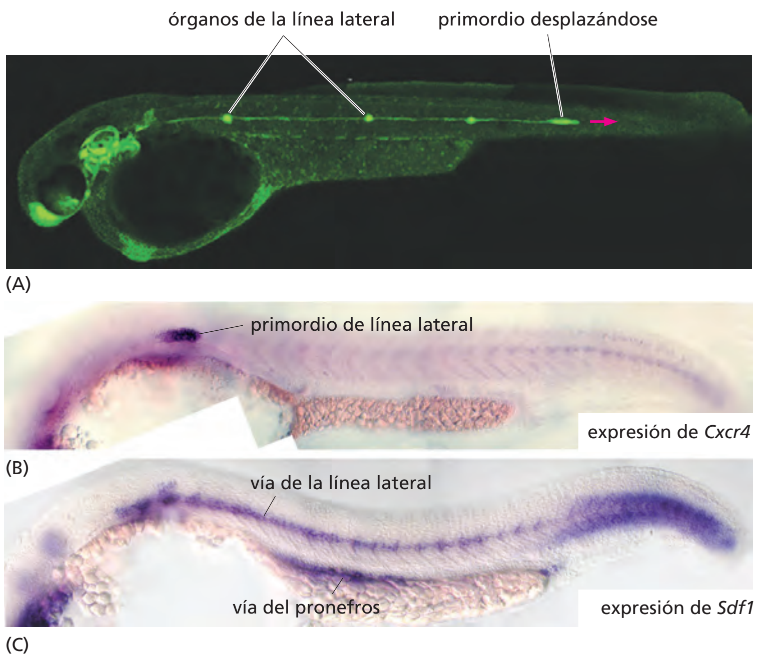


Figura 22–85 Migración del primordio de la línea lateral en la larva del pez cebra, conducido por SDF1 y CXCR4. La línea lateral es una fila de órganos mecanosensoriales, muy parecida a las manchas sensoriales del oído interno, que detectan el movimiento del agua sobre la superficie de un pez o un anfibio. (A) Se origina en grupos de células depositadas por un primordio que migra a lo largo del flanco de la larva, desde un punto en la cabeza hacia la cola, como se observa en esta larva de 2 días, en la cual las células de la línea lateral se han marcado por expresión de la proteína fluorescente verde. (B) Células del primordio que expresan el receptor quimiotáctico CXCR4, mostrado mediante hibridación *in situ* en una larva de 1 día. (C) El camino que seguirán se ha marcado por la expresión del ligando SDF1, que se muestra mediante hibridación *in situ* en otro espécimen de 1 día. Si falta el ligando a lo largo de la ruta normal (como resultado de una mutación), el primordio se aparta de su ruta adecuada y sigue un camino alternativo, más ventral, marcado por otro trazo de SDF1, que marca la ruta normal de otra estructura migratoria, el pronefros. (A, por cortesía de David Gilmour; B y C, de N.B. David et al *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 99:16297-16302, 2002. Con autorización de National Academy of Sciences.)

proteína fibronectina, proporcionan lugares de adhesión que ayudan a la célula a avanzar; otras, como el proteoglicano sulfato de condroitina, inhiben la locomoción y repelen la inmigración. Las células no migradoras que se encuentran a lo largo del camino también pueden tener superficies atractivas o repelentes, e incluso pueden extender filopodios que tocan las células migradoras y afectan a su comportamiento.

En medio de esta masa de influencias distintas, algunas son especialmente importantes. En particular, diferentes tipos de células son guiados por quimiotaxis, que depende de un receptor llamado CXCR4. Esta proteína de superficie pertenece a la familia de los receptores acoplados con la proteína G, y se activa mediante un ligando extracelular llamado SDF1. Las células que expresan CXCR4 pueden "olfatear" su camino por pistas marcadas para ellas, mediante la producción de SDF (**Figura 22–85**). La quimiotaxis hacia las fuentes de SDF1 tiene un papel importante en la guía de las migraciones de linfocitos y otros tipos de células sanguíneas, así como de neuronas del cerebro en desarrollo, de células musculares progenitoras que entran en las yemas de las extremidades, de células germinales primordiales que van hacia las gónadas y también de las células cancerosas en una metástasis.

La distribución de las células migradoras depende de factores de supervivencia así como de los indicios guía

La distribución final de las células migratorias no sólo depende de las rutas que toman, sino también de si sobreviven al viaje y si prosperan en el ambiente que encuentran al final de su viaje. Existen lugares específicos que proporcionan los factores de supervivencia necesarios para cada tipo de célula migradora. Por ejemplo, las células de la cresta neural que darán lugar a las células pigmentarias de la piel y las células nerviosas del intestino dependen de un factor péptico llamado *endotelina-3*, secretada por los tejidos de las vías de migración; ratones mutantes y humanos que carecen del gen de este factor o su receptor, muestran zonas no pigmentadas (albinas) y potencialmente malformaciones en el intestino, a causa de la falta de inervación de este órgano (una enfermedad llamada megacolon porque el colon se distiende de forma exagerada).

Las células germinales, las precursoras sanguíneas y las células pigmentarias derivadas de la cresta neural comparten por lo menos una necesidad común para su supervivencia que incluye un receptor transmembrana, llamado *proteína Kit*, que se encuentra en la membrana de las células migradoras, y un ligando llamado *factor Steel*, segregado por las células del tejido que atraviesan las células migradoras y/o las del lugar que colonizan. Los individuos mutantes en alguno de los genes de estas proteínas tienen pigmentación deficiente, así como falta de células sanguíneas y de células germinales (**Figura 22–86**).



Figura 22–86 Efecto de las mutaciones en el gen *Kit*. Tanto el bebé como el ratón son heterocigotos para la mutación carencia-de-función, por la que sólo se dispone de la mitad de la cantidad del producto del gen *Kit*. En ambos casos, la pigmentación es defectuosa porque las células pigmentarias dependen del producto de *Kit* como receptor para un factor de supervivencia. (Por cortesía de R.A. Fleischman, de *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 88:10885-10889, 1991. Con autorización de National Academy of Sciences.)

La simetría lateral de los vertebrados deriva de una asimetría molecular en el embrión temprano

Los vertebrados pueden parecer bilateralmente simétricos desde el exterior, pero muchos de sus órganos internos (el corazón, el estómago, el hígado y otros) son asimétricos. Esta asimetría tiene un nivel de reproducibilidad muy elevado: el 99,98% de las personas tienen el corazón a su izquierda. Hemos visto cómo se desarrollaban los tejidos internos y externos del embrión de vertebrado y también sus ejes anteroposterior y dorsoventral. Pero ¿cómo surge la asimetría bilateral?

Estudios genéticos en mamíferos sugieren que esta pregunta puede dividirse en dos: una relacionada con la generación de la asimetría y otra referida a su orientación. Tanto en humanos como en ratones se han encontrado varias mutaciones que causan una localización irregular del eje bilateral: el 50% de los individuos mutantes tienen sus órganos internos colocados de forma normal, mientras que el otro 50% tienen anatomía invertida, con el corazón a su derecha. En estos individuos parece que el mecanismo que hace que los dos lados sean diferentes ha funcionado correctamente, pero el mecanismo que decide entre las dos posibles orientaciones del eje derecha-izquierda es defectuoso.

El descubrimiento de las asimetrías moleculares que preceden a las primeras asimetrías anatómicas macroscópicas es la clave de la base de este fenómeno. Los primeros signos se observan en patrones de expresión génica alrededor del *nodo* (el homólogo en el ratón del Organizador de la rana). En concreto el gen *Nodal*, que codifica un miembro de la superfamilia TGFβ, se expresa asimétricamente en esta región (no sólo en el ratón, sino también en el pollo, la rana y el pez cebra) (**Figura 22–87**). La asimetría de la expresión de *Nodal* en las inmediaciones del nodo se transmite hacia afuera creando una franja ancha de expresión

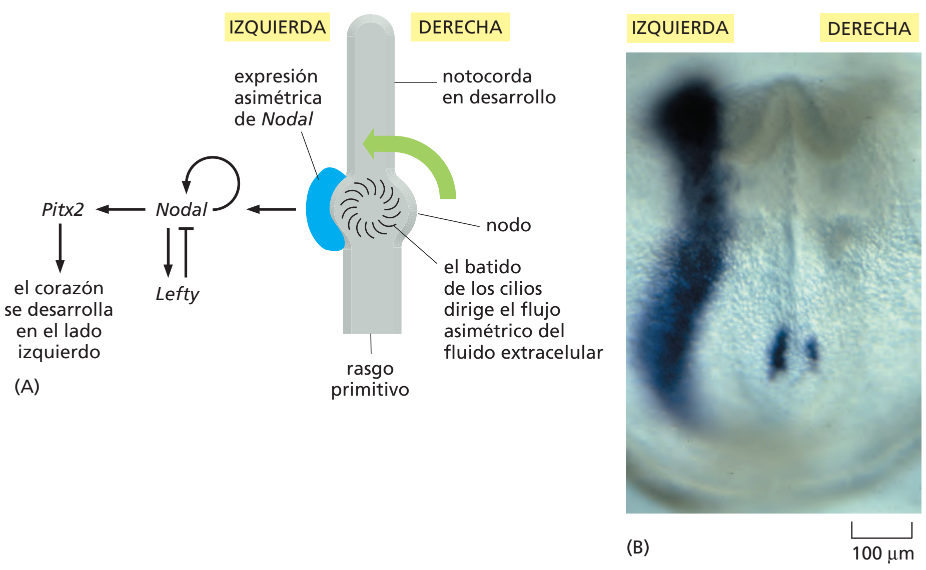


Figura 22–87 Batido helicoidal de los cilios en el nodo y los orígenes de la asimetría izquierda-derecha. (A) El batido de los cilios genera una corriente hacia un lado del nodo, lo cual implica una expresión génica asimétrica en las cercanías del nodo. Una teoría propone que la corriente barre hacia un lado y provoca la expresión asimétrica de diversos genes. Otra teoría supone que los cilios también pueden actuar como mecanosensores, y propone que un grupo de cilios del nodo responde a un impulso debido al flujo de líquido provocado por la apertura de canales de Ca^{2+}, generando así un incremento de concentración de Ca^{2+} en las células de un lado. (B) Patrón de expresión asimétrico resultante de *Nodal*, codificando para una proteína señal perteneciente a la superfamilia TGFβ en las cercanías del nodo (*dos manchas azules inferiores*) en un embrión de ratón a los 8 días de gestación, tal como se muestra por hibridación *in situ*. En este estadio, la asimetría ya ha sido relegada hacia las placas mesodérmicas laterales, donde el gen *Nodal* se expresa en el lado izquierdo (*gran mancha azul alargada*) pero no en el derecho. Nótese que el embrión se ve desde su lado ventral, de modo que su izquierda aparece en la derecha de la fotografía. (B, por cortesía de Elizabeth Robertson.)

de *Nodal* en el mesodermo, a lo largo del lado izquierdo (y sólo a este lado) del cuerpo del embrión. El mecanismo que transmite la asimetría desde el nodo y localiza la expresión de *Nodal* todavía no se conoce y puede variar de una clase de vertebrados a otra. No obstante, en todas las especies depende de bucles de retroalimentación en la que interviene *Nodal*, junto con otro grupo de genes, los llamados *Lefty*. Éstos, igual que *Nodal*, son regulados directamente por la vía de señalización Nodal y sus productos. Las proteínas Lefty están relacionadas con las proteínas Nodal; pero las Lefty difunden de forma más amplia y actúan de modo opuesto, como antagonistas de Nodal. Es frecuente que los ratones que presentan una mutación por inactivación génica dirigida (knockout) en el gen *Lefty1* tengan el lado derecho convertido en la imagen quiral del izquierdo, de manera que no existe simetría derecha-izquierda.

Otro gen que también se regula directamente por la vía Nodal es el *Pitx2*, que codifica una proteína reguladora y actúa relacionando el resultado de las interacciones Nodal/Lefty con el posterior desarrollo anatómico. Nodal guía la expresión de *Pitx2* en el lado izquierdo del cuerpo y de esta forma confiere asimetría al corazón y otros órganos internos.

Todos estos datos plantean el enigma de cómo se origina la asimetría inicial de la expresión de Nodal. Cualquiera que sea el mecanismo, el resultado de lo que ocurre en el nodo de un animal normal tiene que ser sesgado para que los genes específicos del lado izquierdo se expresen en este lado con normalidad: debe existir una relación entre el mecanismo que genera la asimetría y el que la orienta. Una pista sobre el mecanismo de orientación surgió en una clínica sueca para la infertilidad. Un pequeño grupo de hombres infértiles tenían los espermatozoides sin motilidad a causa de un defecto en las moléculas de dineína, que son necesarias para el movimiento de los cilios y flagelos. Estos hombres también sufrían bronquitis y sinusitis crónicas porque los cilios de su tracto respiratorio eran defectuosos. Y sorprendentemente, el 50% de ellos tenían los órganos internos con la lateralidad invertida (con el corazón a la derecha). Los hallazgos parecieron en un principio misteriosos, pero se han observado efectos parecidos en mamíferos con otras mutaciones que causan cilios defectuosos. Este hecho sugiere que el movimiento ciliar de alguna forma controla a qué lado está orientado el eje derecha-izquierda.

La videomicroscopía de intervalo aplicada a un ratón vivo revela que las células del nodo tienen cilios en su cara interna que baten de forma helicoidal en una dirección definida, al igual que la rosca de un tornillo; en el nodo estos cilios están alojados en un pequeño hueco con una forma que hace que su movimiento lleve una corriente de fluido hacia el lado izquierdo (véase la Figura 22–87A). De acuerdo con una de las teorías, las proteínas señal transportadas por esta corriente hacia el lado izquierdo, proporcionarían el sesgo que orienta el eje derecha-izquierda del cuerpo del ratón. Otra teoría propone que los cilios de este sistema, igual que en otros contextos, no sólo actuarían como conductores del flujo del fluido, sino que además harían las veces de sensores mecánicos, respondiendo a la flexión con la producción de una corriente asimétrica de iones Ca^{2+} a través del nodo y ejerciendo una influencia en el tejido adyacente.

La lateralidad del movimiento ciliar refleja la lateralidad (la asimetría derecha-izquierda) de las moléculas orgánicas que componen todos los seres vivos. Por lo tanto, este fenómeno es esencialmente lo que dirige la asimetría derecha-izquierda de nuestro cuerpo.

Resumen

En el desarrollo animal intervienen unos desplazamientos extraordinarios. En la gastrulación, las células de la parte exterior del embrión se invaginan hacia el interior formando la cavidad del tubo digestivo generándose tres hojas germinales (el ectodermo, el mesodermo y el endodermo), a partir de las cuales se forma el cuerpo de los animales superiores. En los vertebrados, los desplazamientos que tienen lugar en la gastrulación se organizan mediante señales del Organizador (el labio dorsal del blastoporo de los anfibios, que corresponde al nodo del embrión de pollo y de ratón). Estas señales especifican el eje dorsoventral del cuerpo y dirigen la extensión convergente, en la cual la capa de células que se desplaza hacia el interior del cuerpo se alarga en la dirección del eje cabeza-cola, a la vez que se estrecha en sentido perpendicular a este eje. Los movimientos de reempaquetamiento activo de las células individuales producen la extensión convergente y están coordinados por la vía de señalización de polaridad planar Frizzled/Dishevelled (una rama de la vía Wnt que regula el citoesqueleto de actina).

El desarrollo posterior incluye muchos más desplazamientos. Parte del ectodermo se engrosa, se enrolla y se separa, formando el tubo neural y la cresta neural. En la línea media observamos un

cordón de células especializadas llamado notocorda, que se alarga formando el eje central del embrión. A cada lado de la notocorda, unas largas solapas de mesodermo se segmentan formando los somitas. Una serie de células migradoras, como las de la cresta neural, se separan de sus vecinas y viajan a través del embrión para colonizar nuevos lugares. Las células germinales primordiales y muchas otras células migradoras son conducidas por quimiotaxis dependiente del receptor CXCR4 y su ligando SDF1. Las moléculas de adhesión celular, como las cadherinas y las integrinas, ayudan a conducir las migraciones y controlan la cohesión selectiva de las células en su nueva distribución.

Esencialmente, el patrón de los desplazamientos celulares está dirigido por el patrón de expresión génica, que determina las propiedades de la superficie celular y la motilidad. Así, la formación de los somitas depende de un patrón periódico de expresión génica, que constituye un oscilador bioquímico (el reloj de segmentación) del mesodermo, el cual especifica de qué forma se debe disociar la masa de células para formar bloques separados. De un modo similar, la asimetría anatómica derecha-izquierda del cuerpo de los vertebrados está prefigurada en la asimetría del patrón de expresión génica del embrión temprano. Por lo menos en mamíferos, esta asimetría está dirigida fundamentalmente por la lateralidad de los movimientos ciliares en los alrededores del nodo.

EL RATÓN

El embrión de ratón (pequeño e inaccesible en el interior del útero materno) constituye un gran reto para los biólogos del desarrollo. Presenta dos atractivos principales. En primer lugar, el ratón es un mamífero, y los mamíferos son los animales hacia los cuales nosotros, como humanos, sentimos más interés. En segundo lugar, es uno de los mamíferos más adecuados para los estudios genéticos, porque es pequeño y se reproduce con rapidez. Estos dos factores han estimulado enormemente la investigación, que ha dado como resultado el desarrollo de herramientas experimentales muy poderosas. Así, el ratón se ha convertido en el principal organismo modelo para la experimentación en genética de mamíferos y también nuestro sustituto más intensamente estudiado. Desde un punto de vista evolutivo, está separado de los humanos tan sólo por 100 millones de años. Su genoma es el mismo que el nuestro en cuanto a tamaño y existe una correspondencia casi total entre los genes humanos y los del ratón. Nuestras proteínas son idénticas en secuencia de aminoácidos en un 80-90%. Además, es evidente la similitud de las secuencias de nucleótidos entre grandes bloques afines y también cuando se comparan secuencias de DNA regulador.

Con muchas dosis de ingenio y de perseverancia, los biólogos del desarrollo han encontrado vías de acceso al embrión temprano sin matarlo y obtener ratones con características previamente especificadas mediante la mutación de un determinado gen. Casi todas las modificaciones genéticas que se pueden llevar a cabo en un gusano o en un pez cebra también pueden aplicarse al ratón, y en algunos casos, con realizaciones más perfectas. Los gastos en investigación con ratones son mucho mayores, pero también lo son los incentivos. En consecuencia, el ratón se ha convertido en una fuente importante de información sobre todos los aspectos de la genética molecular del desarrollo, un modelo clave no sólo para los mamíferos, sino también para otros animales. Por ejemplo, ha proporcionado gran parte de nuestros conocimientos sobre los genes *Hox*, la asimetría derecha-izquierda, el control de la muerte celular, el papel de la señal Notch y muchas otras cuestiones.

Nos hemos referido repetidamente a datos sobre el ratón. Se utilizarán todavía más en el próximo capítulo donde trataremos sobre los tejidos adultos y los procesos de desarrollo implicados. En la próxima sección, se examinarán las características especiales del desarrollo del ratón que han hecho posibles todas las manipulaciones genéticas. A modo de ejemplo, esquematizaremos cómo se ha utilizado el ratón para iluminar otro proceso importante del desarrollo: la generación de órganos como los pulmones y las glándulas mediante interacciones entre el tejido conjuntivo y el epitelio.

El desarrollo de los mamíferos empieza con un preámbulo especial

El embrión de mamífero empieza su desarrollo de un modo excepcional. Protegido dentro del útero, no tiene necesidad, como en otras especies, de completar con rapidez las primeras fases de su desarrollo. Además, la placenta pronto proporciona nutrición procedente de la madre, de forma que el huevo no necesita un gran almacén de materiales frescos como el vitelo. El huevo de ratón tiene un diámetro de tan sólo unos 80 μm y, por lo tanto, un volumen unas 2000 veces menor que el de un huevo de anfibio típico. Las divisiones de segmentación

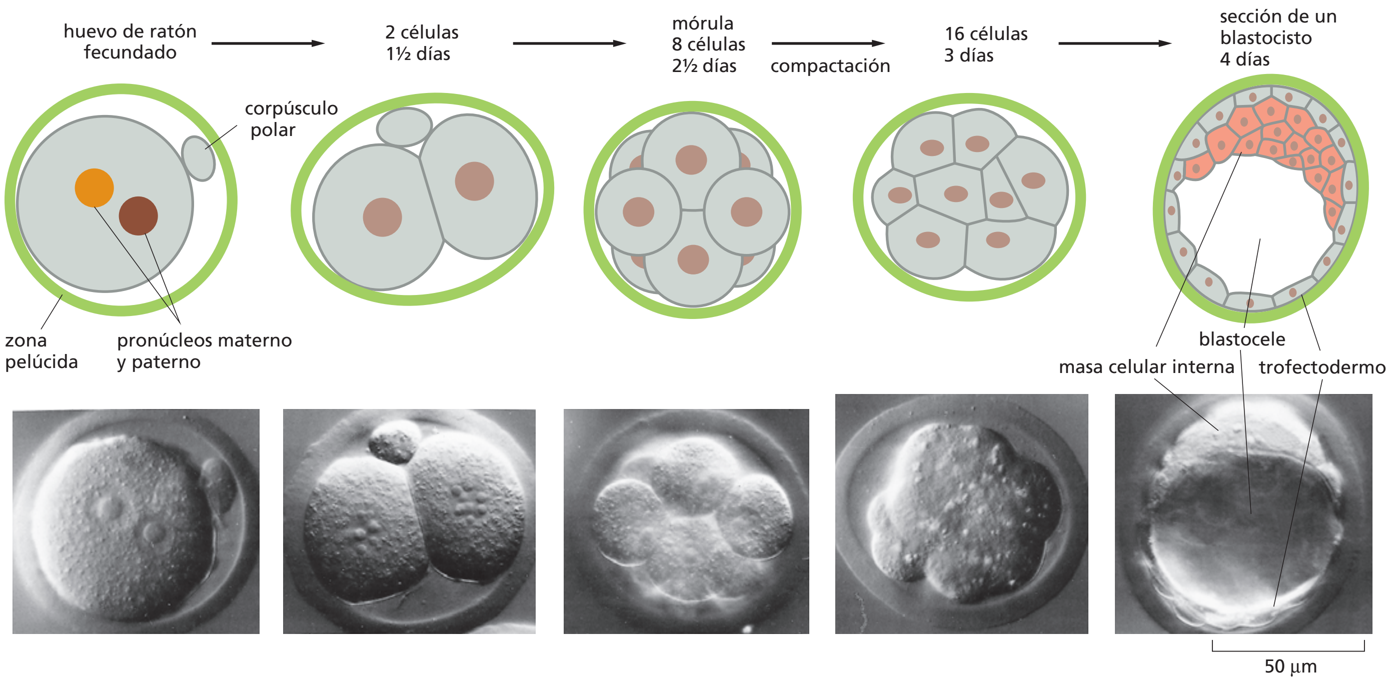


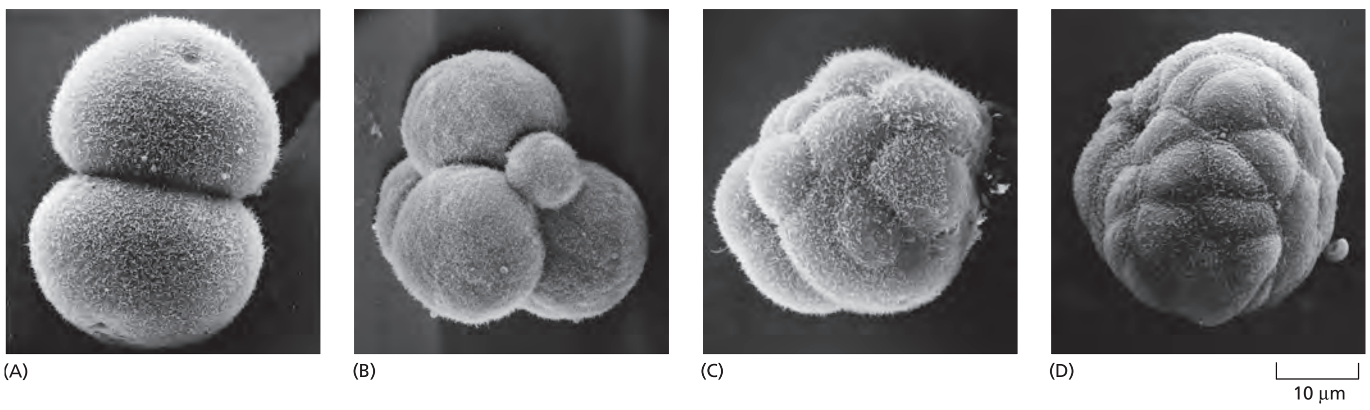
Figura 22–88 Estadios tempranos del desarrollo del ratón. La zona pelúcida es una cápsula gelatinosa por la que sale el embrión a los pocos días, que le permite implantarse en la pared del útero. (Fotografías por cortesía de Patricia Calarco.)

tienen lugar a la misma velocidad que las de muchas células somáticas y la transcripción empieza ya en el estadio de dos células. Y lo que es más importante, aunque los últimos estadios sean similares a los de *Xenopus*, los mamíferos empiezan con un largo rodeo, generando un conjunto complicado de estructuras (principalmente el saco amniótico y la placenta) que envuelven y protegen al embrión y le proporcionan un intercambio de metabolitos con la madre. Estas estructuras, como el resto del cuerpo, derivan del huevo fecundado, pero se llaman *extraembrionarias* porque son eliminadas cuando nace el animal y no forman parte del adulto. En aves y reptiles se forman, durante su desarrollo, estructuras accesorias similares.

Los primeros estadios del desarrollo del ratón se han resumido en la **Figura 22–88**. Hacia los 3 días después de la fecundación el huevo fecundado se divide generando 16 células. Al principio, las células están juntas pero sólo laxamente unidas; al principio del estadio de 8 células se vuelven más cohesivas y sufren *compactación*, formando una esfera sólida de células llamada *mórula* (del latín: "mora") (**Figura 22–89**). Entre las células se forman desmosomas apicales que sellan el interior de la mórula aislándolo del medio externo. Inmediatamente después, se desarrolla una cavidad interna, con lo que la mórula se convierte en una esfera hueca llamada *blastocisto*. La capa exterior de células, que forman la cubierta de la esfera, se llama *trofectodermo*. Ésta dará lugar a los tejidos extraembrionarios. Un agregado interno de células, llamado la *masa celular interna*, se sitúa a un lado de la cavidad y dará lugar al embrión propiamente dicho.

Cuando el embrión ya ha escapado de su cápsula gelatinosa (aproximadamente a los cuatro días), las células del trofectodermo entran en contacto íntimo con la pared del útero,

Figura 22–89 Electromicrografías de barrido de un embrión temprano de ratón. Se ha eliminado la zona pelúcida. (A) Estadio de dos-células. (B) Estadio de cuatro células (además de los cuatro blastómeros se ve un corpúsculo polar, véase Figura 21–23). (C) Mórula de ocho a dieciséis células, se ha producido la compactación. (D) Blastocisto. (A-C, por cortesía de Patricia Calarco; D, de P. Calarco y C.J. Epstein, *Dev. Biol*. 32:208-213, 1973. Con autorización de Academic Press.)



iniciando el proceso de implantación que llevará a la formación de la placenta. Mientras tanto, la masa celular interna crece y empieza a diferenciarse. Una parte de ella dará lugar a otras estructuras extraembrionarias, como el saco vitelino, mientras que el resto continuará con la formación del propio embrión, mediante los procesos de gastrulación, neurulación, etc., que son esencialmente los mismos que hemos visto en otros vertebrados, aunque las distorsiones en la geometría hacen que estas homologías sean difíciles de percibir a primera vista.

El embrión temprano de los mamíferos es altamente regulador

Los determinantes intracelulares localizados sólo tienen un pequeño papel en el desarrollo temprano de los mamíferos y los blastómeros que se generan con las primeras divisiones celulares son muy adaptables. Si el embrión temprano se divide en dos, se forman dos gemelos idénticos (dos individuos normales, completos a partir de una sola célula). En el ratón ocurre un fenómeno similar cuando, de un embrión de dos células, se destruye una de ellas pinchándola con una aguja y luego se implanta el "medio embrión" en una madre adoptiva: en muchos casos se desarrolla un ratón perfectamente normal.

También es posible la situación contraria: podemos formar una sola mórula gigante combinando dos embriones de ratón de ocho células: se desarrolla un ratón de tamaño y estructura normales (**Figura 22–90**). Estas criaturas formadas a partir de agregados de células genéticamente diferentes se llaman *quimeras*. También se pueden producir quimeras inyectando células de un embrión temprano en un blastocisto de otro genotipo. Las células inyectadas se incorporan a la masa celular interna del blastocisto huésped y se desarrolla un animal quimérico. Una sola célula de un embrión de 8 células o de la masa celular interna de otro blastocisto puede dar lugar a cualquier combinación de tipos celulares en la quimera. Cualquiera que sea el lugar donde se encuentre la célula añadida responde correctamente a las indicaciones de sus vecinas y sigue la vía de desarrollo apropiada.

Estos hallazgos tienen dos implicaciones. La primera es que durante los primeros estadios, el sistema de desarrollo se va autoajustando, de manera que se obtiene una estructura normal incluso si se han modificado las condiciones iniciales. Los embriones o partes de ellos que tienen esta propiedad se llaman **reguladores**. La segunda implicación es que las células individuales de la masa celular interna son inicialmente *totipotentes* o casi: aunque no pueden formar un trofoblasto, pueden dar lugar a cualquier parte del cuerpo adulto, incluyendo las células germinales.



Figura 22–90 Procedimiento para generar un ratón quimérico. Se combinan dos mórulas de genotipos distintos.

A partir de un embrión de mamífero se pueden obtener células madre embrionarias totipotentes

Si se injerta un embrión temprano normal de ratón en un riñón o en los testículos de un adulto, su desarrollo se altera hasta tal punto que no es posible una regulación adecuada; pero su desarrollo no se detiene. El resultado es un crecimiento tumoral grotesco, llamado *teratoma*, que consiste en una masa desorganizada de células que contiene una gran variedad de tejidos diferenciados (piel, hueso, epitelio glandular, etc.) mezclados con células madre indiferenciadas que continúan dividiéndose y generando más tejidos diferenciados.

La investigación de las células madre en teratomas y en otros tipos de tumores relacionados llevó al descubrimiento de que su comportamiento refleja una propiedad importante de las células normales de la masa celular interna: en un entorno adecuado se pueden inducir a proliferar indefinidamente, conservando su carácter totipotente. Las células en cultivo que tienen esta propiedad se llaman **células madre embrionarias** o **células ES** (***e****mbryonic* ***s****tem* ***c****ells*). Se pueden obtener cultivando células normales de la masa celular interna y dispersándolas cuando empiezan a proliferar. Si separamos las células de sus vecinas normales y las colocamos en un medio de cultivo adecuado, se interrumpe el programa normal de cambio del carácter celular y las células pueden seguir dividiéndose de forma indefinida sin diferenciarse. Como se tratará en el próximo capítulo, muchos tejidos del adulto también contienen células madre que pueden dividirse indefinidamente sin diferenciarse; pero estas *células madre adultas*, cuando se las deja diferenciar, por lo general dan lugar a una serie muy restringida de tipos celulares diferenciados.

Parece que el estado en el que las células ES se detiene es equivalente al de las células normales de la masa celular interna. Este hecho se puede observar inyectando células ES en

cultivo en un blastocisto normal (**Figura 22–91**). Las células inyectadas se incorporan a la masa celular interna del blastocisto y contribuyen a la formación de un ratón quimérico aparentemente normal. Las descendientes de las células ES injertadas se pueden encontrar casi en cualquier tejido del ratón, donde se diferencian de forma apropiada a su localización e incluso pueden formar células germinales viables. El comportamiento extraordinariamente adaptable de las células ES muestra que las indicaciones de las células vecinas no sólo dirigen la elección entre diferentes vías de diferenciación, sino que también detienen o inician el reloj del desarrollo, es decir, los procesos que llevan a la célula a progresar a un estado adulto a partir de un estado embrionario.

A nivel práctico, las células ES tienen una importancia doble. Primero, desde el punto de vista médico, ofrecen la posibilidad de una fuente versátil de células para reparar tejidos dañados o defectuosos del cuerpo del adulto, como se analizará al final del próximo capítulo. Segundo, las células ES hacen posible el control más preciso de la diferenciación genética, con la que podemos generar animales con casi cualquier alteración que se introduzca en su genoma. Como se describió en el Capítulo 8, la técnica aprovecha la recombinación génica para sustituir un segmento de DNA construido de forma artificial por la secuencia normal en un determinado locus del genoma de una célula ES. Aunque sólo en raras excepciones la construcción de DNA se incorpora correctamente, se han ideado procedimientos selectivos para encontrar la célula que ha incorporado la construcción de DNA. Una vez seleccionadas, las células ES modificadas se pueden inyectar en un blastocisto y producir un ratón quimérico. Con suerte, este ratón tendrá algunas células germinales derivadas de las ES, capaces de actuar como fundadoras de una nueva generación de ratones formados exclusivamente por células que llevan la mutación escogida. De esta forma, de una placa de cultivo se puede recuperar un ratón mutante completo (véase la Figura 8–65).

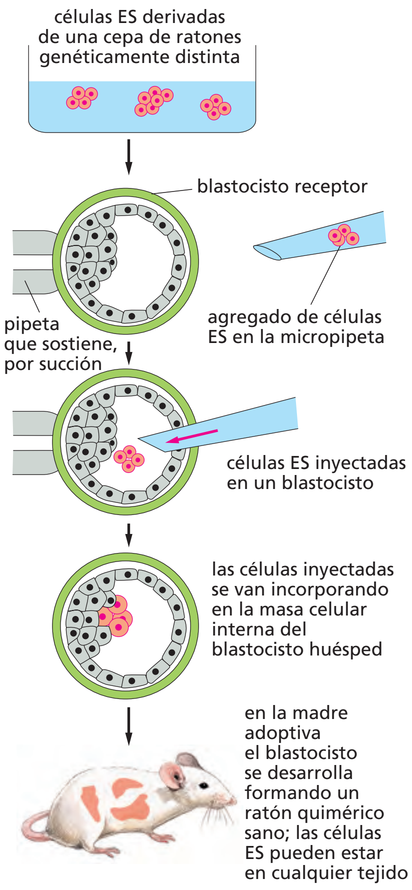


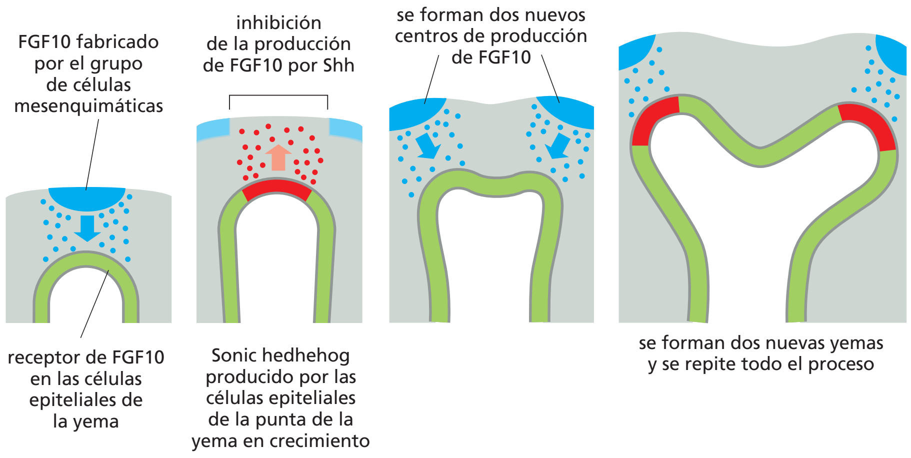
Figura 22–91 Fabricación de un ratón quimérico con células ES. Las células ES en cultivo se pueden combinar con células de un blastocisto normal formando un ratón quimérico sano, y pueden formar parte de cualquiera de sus tejidos, incluida la línea germinal. Así pues, las células ES son totipotentes.

Las interacciones entre el epitelio y el mesénquima generan estructuras tubulares ramificadas

Comparativamente, los vertebrados son animales grandes y esto se debe sobre todo a su gran masa de tejido conjuntivo. No obstante, para la excreción, la absorción de nutrientes y el intercambio de gases, también necesitan grandes cantidades de varios tipos especializados de superficies epiteliales. Muchas de ellas adoptan la forma de estructuras tubulares generadas mediante *morfogénesis de la ramificación*, en la cual un epitelio invade un tejido conjuntivo embrionario (mesénquima) y forman un órgano compuesto. El pulmón es un ejemplo típico. Se origina a partir de la línea celular de endodermo de la base del tubo digestivo anterior. Este epitelio forma gemas y crece hacia el interior del mesénquima próximo, formando el *árbol bronquial*, que consiste en un sistema tubular que se ramifica de forma repetida mientras se va extendiendo (**Figura 22–92**). El mismo mesénquima también es invadido por células endoteliales (la línea celular de los vasos sanguíneos), generándose así el sistema de vasos sanguíneos y conductos de aire íntimamente yuxtapuestos, que son necesarios para el intercambio de gases en el pulmón (tratado en el Capítulo 23).

Todo el proceso depende de intercambios de señales, en ambos sentidos, entre las yemas de epitelio que crecen y el mesénquima que están invadiendo. En el ratón, estas señales se pueden analizar por manipulación genética. Las proteínas señal de la familia del factor de crecimiento del fibroblasto (FGF) y el receptor de la tirosina quinasa desempeñan un papel central en este proceso. Esta vía de señalización tiene varias funciones en el desarrollo, pero parece que es sobre todo importante en las numerosas interacciones que tienen lugar entre el epitelio y el mesénquima.

Los mamíferos presentan unos 20 genes *Fgf* mientras que en *Drosophila* son tres y en *C. elegans* dos. El *Fgf* más importante en los pulmones es el *Fgf10*. Se expresa en agregados de células mesenquimáticas cercanas a los ápices de los túbulos epiteliales que se desarrollan, mientras que su receptor se encuentra en las propias células epiteliales. La FGF10 o su receptor se pueden inactivar mediante las técnicas estándar basadas en la recombinación de las células ES. El ratón mutante que se obtiene carece de todo el proceso de morfogénesis de la ramificación; se forma una yema primaria de epitelio pulmonar, pero no crece hacia el interior del mesénquima y no se forma el árbol bronquial. También es posible el proceso contrario: una perla microscópica inmersa en FGF10 y colocada cerca de un epitelio pulmonar embrionario en cultivo inducirá la formación de una yema que crecerá hacia él. Evidentemente, el epitelio sólo invade el mesénquima por estimulación, en respuesta a FGF10.



(A)


(B)

Figura 22–92 Morfogénesis ramificada del pulmón. (A) De qué forma, según parece, FGF10 y Sonic hedgehog inducen el crecimiento y la ramificación de las yemas del árbol bronquial. En este sistema también se expresan muchas otras moléculas señal, como BMP4; el mecanismo de ramificación sugerido sólo es una de las diversas posibilidades. (B) Aspecto del árbol bronquial adulto humano, tras haberle inyectado resinas en los conductos aéreos; en las diferentes ramas del árbol se han inyectado resinas de diferentes colores. (B, de R. Warwick y P.L. Williams, Gray's Anatomy, 35.ª ed. Edinburgh: Logran, 1973.)

Pero ¿qué es lo que hace que los túbulos epiteliales se ramifiquen de forma repetida mientras van invadiendo? Este fenómeno depende de la señal Sonic hedgehog que va en el sentido opuesto, desde las células epiteliales del ápice de las yemas hacia el mesénquima. En ratones que carecen de Sonic hedgehog, el epitelio pulmonar crece y se diferencia, pero forma un saco en lugar de un árbol ramificado de túbulos. Al mismo tiempo, en vez de estar restringida a pequeños agregados de células mesenquimáticas que actúan a modo de balizas dirigiendo la yema, se expresa en bandas anchas de células inmediatamente adyacentes al epitelio. Este hallazgo sugiere que la señal Sonic hedgehog tiene que actuar restringiendo la expresión de FGF10 a las células mesenquimáticas más cercanas al ápice de la yema que crece, separando en dos el agregado que secreta FGF10, hecho que resulta en la separación de la yema en dos ramas (véase la Figura 22–92A).

El crecimiento de la ramificación del epitelio y el mesénquima tiene que estar coordinado con el de los vasos sanguíneos asociados, y todo el proceso implica un conjunto de señales adicionales. Muchos aspectos de este sistema todavía son desconocidos. Sin embargo, sabemos que *Drosophila* utiliza mecanismos estrechamente relacionados para dirigir la morfogénesis de la ramificación de su sistema de tráqueas (los túbulos que forman los conductos aéreos de los insectos). En este caso, el proceso también depende de la proteína FGF de *Drosophila*, codificada por el gen *Branchless*, y del receptor de FGF de *Drosophila*, codificado por el gen *Breathless*, actuando ambos de modo parecido a como lo hacen en el ratón. Como es lógico, los estudios genéticos del desarrollo de las tráqueas en *Drosophila* también han identificado otros componentes del control de la maquinaria y son los genes de *Drosophila* los que han llevado a los homólogos de los vertebrados. Las manipulaciones genéticas en ratones han proporcionado sistemas para examinar si estos genes tienen funciones similares en los mamíferos y podemos confirmar que en gran medida es así.

Resumen

El ratón tiene un papel central como organismo modelo para el estudio de la genética molecular del desarrollo de los mamíferos. El desarrollo del ratón es esencialmente similar al de otros vertebrados, pero empieza con un preámbulo especial que consiste en la formación de estructuras como el amnios y la placenta. Se han ideado técnicas potentes para producir inactivaciones genéticas y otras alteraciones dirigidas, aprovechando las propiedades altamente reguladoras de las células de la masa celular interna del embrión de ratón. Estas células pueden cultivarse y mantenerse como células madre embrionarias (ES). En condiciones de cultivo adecuadas, las células ES pueden proliferar de forma indefinida sin diferenciarse, pero conservando la potencialidad de dar lugar a cualquier parte del cuerpo cuando se inyectan de nuevo en un embrión temprano de ratón.

Muchos procesos generales de desarrollo, incluyendo muchos de los que se han tratado a lo largo de este capítulo, se han comprendido gracias a los estudios con ratones. Por ejemplo, el ratón se ha utilizado para investigar el control de la morfogénesis de la ramificación. Este proceso da lugar a estructuras como los pulmones y las glándulas, y está gobernado por intercambios de señales entre el mesénquima y el epitelio que invade. Las funciones de estas señales se pueden analizar mediante experimentos de inactivación génica dirigida.

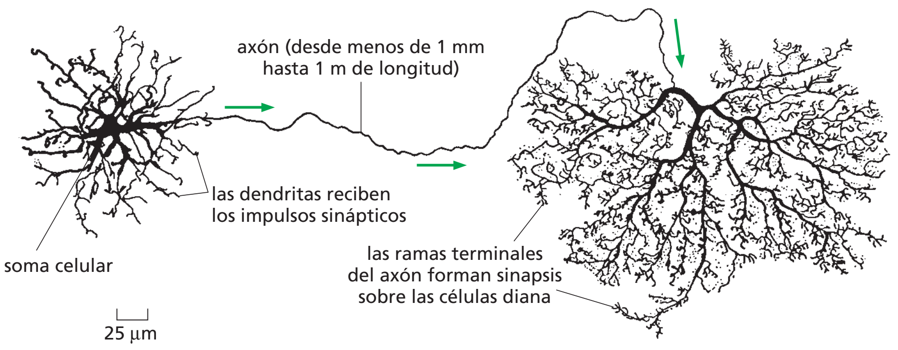


Figura 22–93 Neurona típica de vertebrado. Las *flechas* indican el sentido en el que se envían las señales. Esta neurona procede de una retina de mono. Las neuronas humanas más largas y anchas llegan al millón de μm de longitud; su axón tiene 15 μm de diámetro. (Esquema de la neurona de B.B. Boycott, en Essays on the Nervous System [R. Bellairs y E.G. Gray, eds.]. Oxford, UK: Clarendon Press, 1974.)

EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO

Las **células nerviosas** o **neuronas** son uno de los tipos celulares animales especializados más antiguos. Su estructura es distinta a todas las demás clases de células y el desarrollo del sistema nervioso propone interrogantes que no tienen parangón en otros tejidos. Una neurona es extraordinaria sobre todo por su forma enormemente extendida, con un largo *axón* y *dendritas* ramificadas que se conectan con otras células a través de sinapsis (**Figura 22–93**). El reto principal de su desarrollo consiste en explicar cómo se alargan los axones y las dendritas, cómo encuentran las compañeras adecuadas y se conectan selectivamente por sinapsis, generando una red funcional (**Figura 22–94**). El problema es formidable, ya que el cerebro humano contiene más de 10^{11} neuronas y cada una de ellas, en promedio, conecta con un millar de compañeras, según un plan regular y predecible de "cableado". La precisión que se requiere no es tan grande como en un ordenador, ya que el cerebro funciona de modo distinto y es más tolerante con los caprichos de sus componentes. Sin embargo, el cerebro aventaja a todas las demás estructuras biológicas en complejidad.

Los componentes de un sistema nervioso típico (las diferentes clases de neuronas, células de la glía, células sensoriales y músculos) se originan en lugares muy separados entre sí en el embrión e inicialmente no tienen conexión entre ellos. Así, en la primera fase del desarrollo del sistema nervioso (**Figura 22–95**), las diferentes partes siguen su propio programa local; es decir, las neuronas nacen y toman caracteres específicos según el lugar y el momento de su nacimiento, bajo el control de señales inductivas y mecanismos reguladores similares a los que hemos observado en otros tejidos del cuerpo. La siguiente fase incluye una morfogénesis particular del sistema nervioso: los axones y las dendritas crecen siguiendo rutas específicas, estableciendo una red provisional, pero ordenada, que conecta las partes separadas del sistema. En la tercera y última fase, que continúa durante la vida adulta, las conexiones se ajustan y perfeccionan mediante interacciones entre los componentes más alejados que dependen de las señales eléctricas que pasan entre ellos.

Las neuronas toman distintos caracteres según el momento y el lugar donde nacen

Casi siempre, las neuronas se generan en asociación con las **células de la glía**, que proporcionan un entramado de soporte y generan un ambiente cerrado y protegido donde las neuronas pueden llevar a cabo sus funciones. En todos los animales, los dos tipos celulares se



Figura 22–94 Organización compleja de las conexiones entre las células nerviosas. Este esquema representa una sección de una parte reducida del cerebro de un mamífero, el bulbo olfatorio de perro, impregnado con la técnica de Golgi. Los objetos *negros* son las neuronas; las *líneas finas* son los axones y las dendritas, por las que varios grupos de neuronas se interconectan de acuerdo con reglas muy precisas. (De C. Golgi, *Riv. sper. freniat. Reggio-Emilia* 1:405-425, 1875; reproducido en M. Jacobson, Developmental Neurobiology, 3.ª ed. New York: Plenum, 1992.)

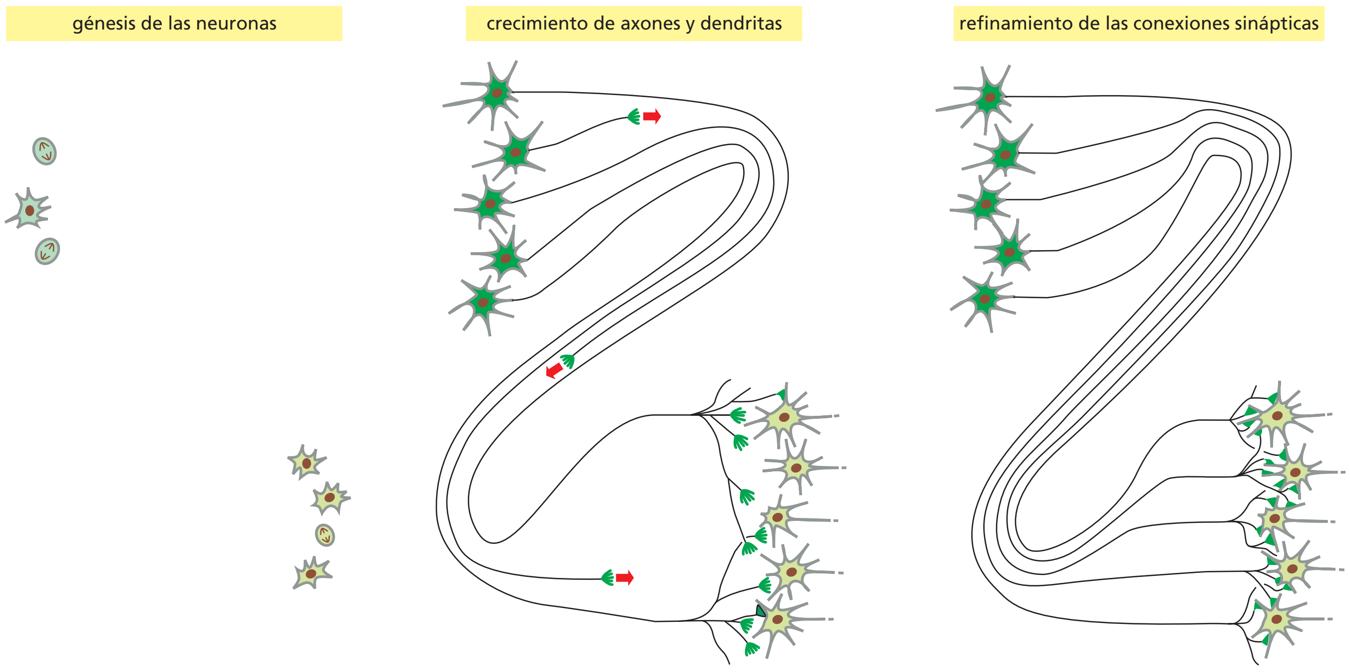


Figura 22–95 Las tres fases del desarrollo neuronal.

desarrollan a partir del ectodermo, normalmente como células hermanas o primas derivadas de un precursor común. Así, en los vertebrados, las neuronas y las células de la glía del *sistema nervioso central* (que incluye la médula espinal, el cerebro y la retina), derivan de la parte del ectodermo que se pliega formando el tubo neural, mientras que las del *sistema nervioso periférico* derivan sobre todo de la cresta neural (**Figura 22–96**).

El **tubo neural**, del que nos ocuparemos en especial, consiste inicialmente en un epitelio monocapa (**Figura 22–97**). Las células epiteliales son las progenitoras de las neuronas y de la glía. Cuando se generan todos estos tipos celulares, el epitelio se engrosa y se transforma en una estructura más compleja. Como se ha descrito, la señal Delta-Notch controla la diferenciación de las células progenitoras en neuronas de la siguiente forma: las neuronas nacientes expresan Delta, con lo cual impiden que sus vecinas se diferencien en neuronas al mismo tiempo. Esto asegura que las progenitoras no se diferencien todas de forma simultánea y que sigan dividiéndose y produciendo una población de la cual puedan generarse más neuronas. Las progenitoras y más tarde las células de la glía mantienen la cohesión del epitelio y forman un armazón que aumenta de grosor. Las neuronas acabadas de nacer migran entre estas células altas como si fueran animales entre los árboles de un bosque hasta encontrar sus asentamientos, donde maduran y envían sus axones y dendritas (**Figura 22–98**).

Las proteínas señal secretadas a cada lado, ventral y dorsal, del tubo neural actúan como morfógenos opuestos y hacen que las neuronas que nacen a diferentes niveles dorsoventrales expresen distintas proteínas reguladoras (véase la Figura 22–80). También existen diferencias a lo largo del eje cabeza-cola que reflejan el patrón anteroposterior de los genes *Hox* y las acciones de otros morfógenos. Además, igual que en *Drosophila*, durante muchos días, semanas e incluso meses, continúan generándose neuronas en cada región del sistema nervioso central, lo que resulta en una diversidad aún mayor, ya que las células adoptan distintas características según su "cumpleaños", es decir el momento de la última mitosis, que marca el principio de la diferenciación neuronal (**Figura 22–99**). Cuando se extraen células

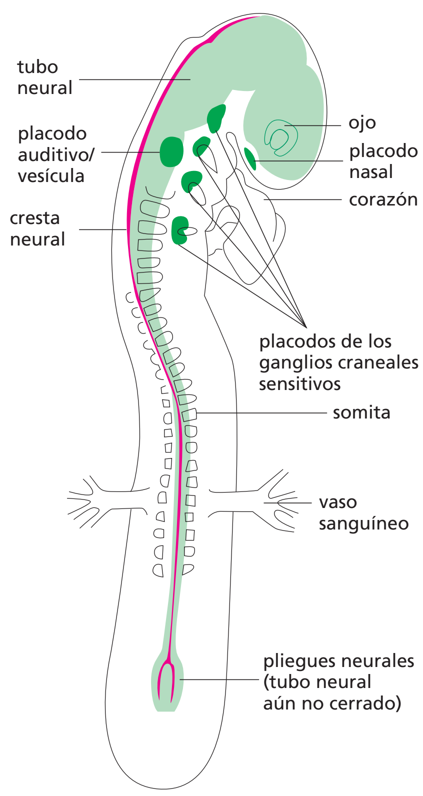


Figura 22–96 Diagrama de un embrión de pollo de 2 días, mostrando los orígenes del sistema nervioso. El tubo neural (*marcado en verde*) ya se ha cerrado, excepto en el extremo de la cola, y se extiende internamente, bajo el ectodermo, del que fue una parte (véase Figura 22–78). La cresta neural (*rojo*) se extiende en sentido dorsal justo debajo del ectodermo y encima del tubo neural. Además, unos engrosamientos, o *placodos* (*verde oscuro*), en el ectodermo de la cabeza dan lugar a células transductoras sensitivas y neuronas de cada región, esto es, del oído y de la nariz. Por el contrario, las células de la retina del ojo se originan en el tubo neural.

progenitoras del cerebro de un embrión de ratón y se mantienen en cultivo durante varios días, aisladas individualmente de su entorno normal, siguen más o menos el mismo programa que en el tejido intacto. Es decir, se dividen de forma repetida, produciendo pares de células hijas que con frecuencia adoptan destinos distintos, como el de seguir dividiéndose como progenitora mientras otras se comprometen a diferenciarse.

Las sucesivas divisiones dan lugar a una secuencia de diferentes tipos celulares, neuronales y gliales según un plan más o menos regular. Este proceso implica que las células progenitoras tienen que cambiar su carácter intrínseco de forma autónoma de una generación a la siguiente. El mecanismo molecular de este cambio progresivo todavía no se conoce, como en el caso de otros tipos celulares en los que también ocurren cambios lentos parecidos.

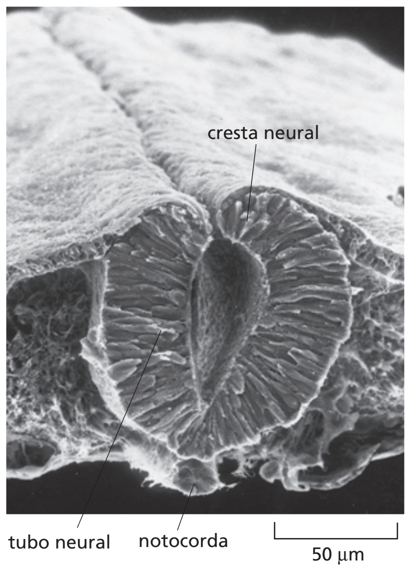


Figura 22–97 Formación del tubo neural. La electromicrografía de barrido muestra una sección transversal del tronco de un embrión de pollo de 2 días. El tubo neural está a punto de cerrarse y pinzarse a partir del ectodermo; en esta fase, está formado (en el pollo) por un epitelio del grosor de una célula. (Cortesía de J.P. Revel y S. Brown.)

El carácter asignado a una neurona en el momento de su nacimiento determina las conexiones que formará

Las diferencias en la expresión génica modulan los caracteres de las neuronas y esto hace que se conecten con diferentes compañeras. Por ejemplo, en la médula espinal, agregados de células situados en posición ventral expresan los genes *Islet*/*Lim* pertenecientes a la familia homeobox, que codifican proteínas reguladoras. Estas células se desarrollarán como neuronas motoras, enviando axones que conectarán con determinados grupos de músculos según cuáles sean los miembros de la familia *Islet*/*Lim* que se expresen. Si el modelo de expresión génica se altera artificialmente, las neuronas se proyectan hacia otros músculos.

Los diferentes destinos son el reflejo de las diferentes vías que los axones van escogiendo a medida que crecen y se alejan del cuerpo de la célula nerviosa, así como su reconocimiento selectivo de las distintas células diana que encuentran al final de su camino. En la parte dorsal de la médula espinal encontramos neuronas que reciben y envían información sensorial de las neuronas sensoriales situadas en la periferia del cuerpo. En posiciones intermedias existen otras clases de interneuronas que conectan entre sí determinados grupos

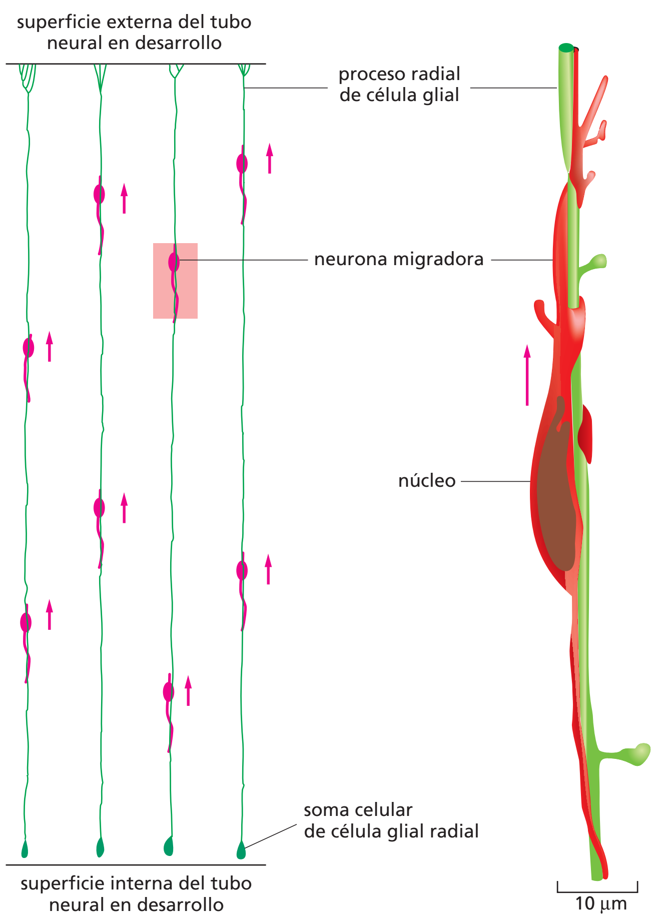


Figura 22–98 Migración de neuronas inmaduras. Antes de enviar los axones y dendritas, muchas veces las neuronas recién nacidas migran desde su lugar de nacimiento y se asientan en alguna otra parte. Los diagramas se basan en reconstrucciones de secciones de corteza cerebral de mono (parte del tubo neural). Las neuronas experimentan su última división celular en la proximidad de la cara interna luminal del tubo neural y luego migran al exterior reptando a lo largo de células gliales radiales. Cada una de estas células se extiende desde la superficie interna a la superficie externa del tubo, una distancia que puede ser como mucho de 2 cm en la corteza cerebral en desarrollo del mono. Las células gliales se pueden considerar como células vestigiales del epitelio columnar original del tubo neural que se extiende extraordinariamente a medida que la pared del tubo se va engrosando. (Según P. Rakic, *J. Comp. Neurol.* 145:61-84, 1972. Con autorización de John Wiley & Sons, Inc.)

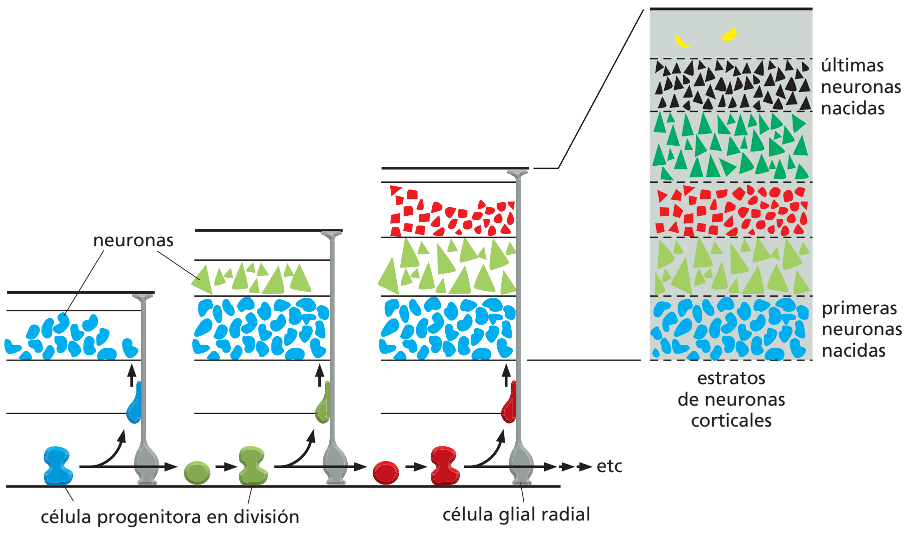


Figura 22–99 Producción programada de diferentes tipos de neuronas en diferentes momentos a partir de células progenitoras en división en la corteza cerebral de un mamífero. Junto a un lado del neuroepitelio cortical, las células progenitoras se dividen de manera repetida, a modo de células madre, produciendo neuronas. Las neuronas migran hacia el lado opuesto del epitelio reptando por las superficies de las células gliales radiales, tal como se muestra en la Figura 22–98. Las neuronas nacidas primero se asientan junto al lugar de su nacimiento, mientras que las nacidas posteriormente las sobrepasan colocándose a más distancia. Así, las generaciones sucesivas de neuronas van ocupando diferentes estratos en la corteza y adquieren diferentes características intrínsecas de acuerdo con sus fechas de nacimiento.

de células nerviosas. Algunas extienden sus axones en sentido dorsal, otras ventral, unas hacia la cabeza, otras hacia la cola y, finalmente, otro grupo lo hace a través de la base del tubo neural hacia el otro lado del cuerpo (**Figura 22–100**). En filmaciones de intervalo, con las neuronas en desarrollo teñidas con colorante fluorescente, podemos observar los desplazamientos de los ápices de los axones que se van extendiendo: recuerdan los faros de los coches en una hora punta nocturna, formando líneas que recorren las carreteras y viran en cruces bulliciosos, haciendo su propia elección de la ruta.

¿De qué forma se dirigen estos desplazamientos? Antes de intentar dar una respuesta, es necesario examinar más detenidamente la estructura de la neurona en crecimiento.

Cada axón y cada dendrita se alarga mediante el cono de crecimiento del ápice

Una neurona típica envía su largo axón proyectándolo hacia una diana lejana a la cual van destinadas las señales, y también varias dendritas más cortas que reciben principalmente señales entrantes emitidas por los terminales del axón de otras neuronas. Cada una de estas prolongaciones se extienden por crecimiento del ápice, donde se observa un engrosamiento erizado de espículas. Esta estructura, llamada **cono de crecimiento**, se arrastra por el tejido que lo envuelve, dejando tras de él un rastro que es en realidad un axón delgado (véase la Figura 22–100). <AAGA> El crecimiento del cono comprende dos elementos: la maquinaria

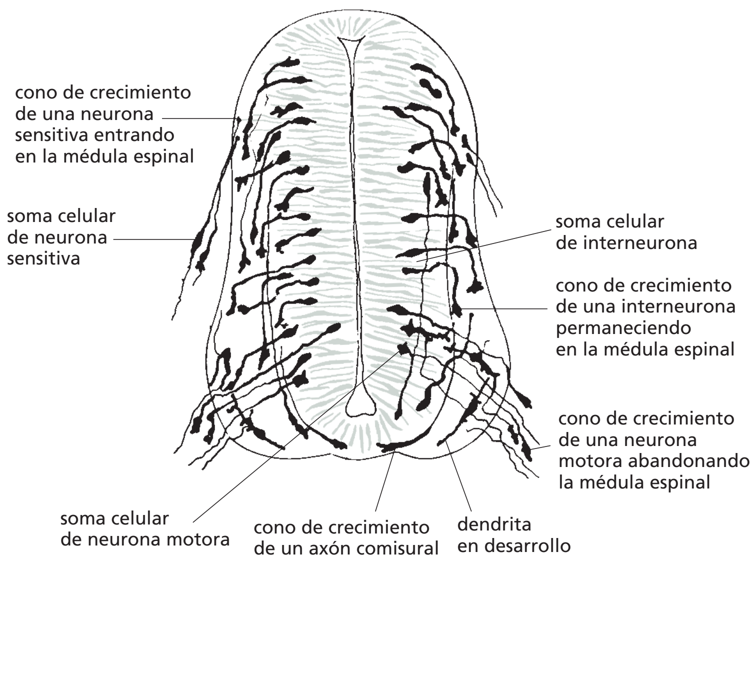


Figura 22–100 Axones en crecimiento en la médula espinal en desarrollo de un embrión de pollo de tres días. El esquema muestra una sección transversal impregnada con la técnica de Golgi. La mayoría de neuronas ya presentan aparentemente una prolongación alargada –el futuro axón. En el extremo de cada axón en crecimiento se puede ver una expansión irregular –el cono de crecimiento. Los conos de crecimiento de las neuronas motoras emergen de la médula espinal (dirigiéndose hacia los músculos), los de las neuronas sensitivas crecen hacia ellas desde fuera (donde se encuentran sus somas celulares), y los de las interneuronas permanecen en la médula espinal. Muchas interneuronas envían sus axones hacia la placa básica, cruzando al otro lado de la médula espinal; estos axones se llaman comisurales. En esta fase temprana, muchas de las células embrionarias de la médula espinal (en las regiones sombreadas en *gris*) aún están proliferando sin haber empezado su diferenciación como neuronas o como células gliales. (De S. Ramón y Cajal, Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés, 1909-1911. Paris: Maloine; reimpresión, Madrid: C.S.I.C., 1972.)

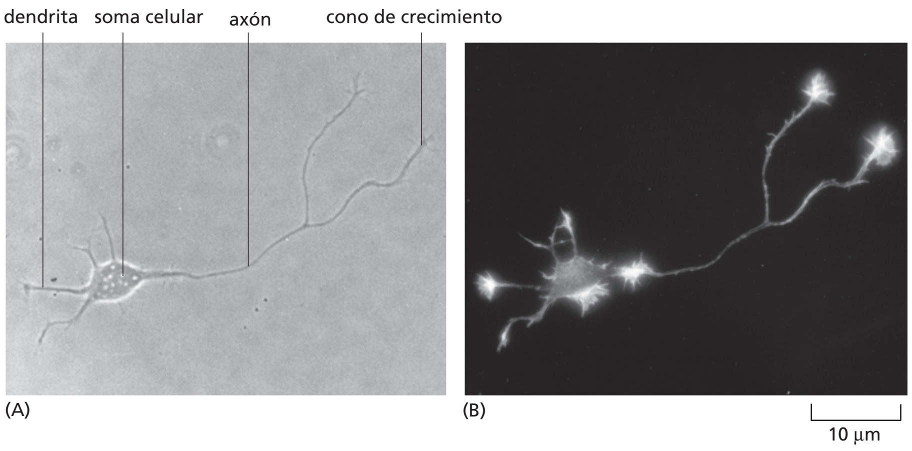


Figura 22–101 Formación de axones y dendritas en cultivo. Una neurona joven ha sido aislada a partir del cerebro de un mamífero y se ha sembrado para estudiar su desarrollo en cultivo, donde emite sus prolongaciones. Una de estas prolongaciones, el futuro axón, ha empezado a crecer más deprisa que la otras (las futuras dendritas) y se ha bifurcado. (A) Imagen en contraste de fases; (B) patrón de tinción con faloidina fluorescente, que se une a los filamentos de actina. La actina se concentra en los conos de crecimiento de los extremos de las prolongaciones, que se extienden activamente, y en algunos otros sitios de actividad de lamelipodios. (Por cortesía de Kimberly Goslin.)

que produce el desplazamiento y el aparato que dirige el rumbo del ápice de cada proyección a lo largo del camino que debe seguir (véase la Figura 16–105).

Gran parte de lo que se conoce de las propiedades del crecimiento de los conos se ha obtenido gracias a los estudios de tejidos o células en cultivo. Se puede observar cómo una neurona empieza a alargar sus prolongaciones, que al principio son todas iguales, hasta que el cono impone un súbito cambio de velocidad que identifica una de ellas como el axón, con su propia carga de proteínas específicas (**Figura 22–101**). En esta etapa, la diferencia entre axón y dendrita viene determinada por el transporte intracelular polarizado de diferentes materiales en cada tipo de prolongación. Como resultado de ello, crecerán alcanzando diferentes longitudes, seguirán distintos caminos y cada uno desempeñará su papel en la formación de la sinapsis.

El cono de crecimiento del extremo de una prolongación nerviosa típica en expansión, sea axón o dendrita, se desplaza hacia adelante a una velocidad de 1 mm por día, inspeccionando continuamente qué regiones tiene delante suyo y a cada lado, por medio de filopodios y lamelipodios. Cuando esta prolongación entra en contacto con una superficie desfavorable, se retrae, mientras que cuando entra en contacto con una superficie más favorable, se alarga, marcando el rumbo de todo el cono. De esta forma, el cono de crecimiento se guía por sutiles variaciones en las propiedades del sustrato por el que se desplaza. Al mismo tiempo es sensible a factores quimiotácticos que difunden por el medio circundante, favoreciendo u obstaculizando su avance. Estos comportamientos dependen de la maquinaria del citoesqueleto del interior del cono, como ya se ha descrito en el Capítulo 16. En la membrana del cono de crecimiento existen multitud de receptores que detectan las señales externas y controlan el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina y otros componentes de la maquinaria de desplazamiento celular, gracias a la intervención de reguladores intracelulares como las GTPasas monoméricas Rho y Rac.

El cono de crecimiento *in vivo* marca el rumbo de la neurita en desarrollo a lo largo de una vía perfectamente definida

En los animales vivos, por lo general los conos de crecimiento viajan hacia sus dianas siguiendo unas rutas totalmente predecibles. Para encontrar su camino, utilizan multitud de estrategias, pero para reptar siempre requieren un sustrato de matriz extracelular o de superficie celular. A menudo el cono de crecimiento toma rutas que han sido abiertas por otras neuritas, a las que siguen guiándose por contacto. Como resultado de ello, en el animal adulto normalmente las fibras nerviosas están agrupadas en haces paralelos compactos (llamados fascículos o tractos fibrilares). Parece que este desplazamiento reptante de los conos de crecimiento está mediado por moléculas de adhesión homofílicas, que son glucoproteínas de membrana que hacen que la célula se adhiera a otra que también tenga este mismo compuesto. Como se ha descrito en el Capítulo 19, dos de las clases más importantes de estas moléculas son las que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (como la N-CAM) y las de la familia de las cadherinas que son dependientes de Ca^{2+}. Generalmente encontramos miembros de las dos familias en la superficie de los conos de crecimiento, de los axones y de varios tipos celulares por los que los conos se arrastran, incluyendo las célu-

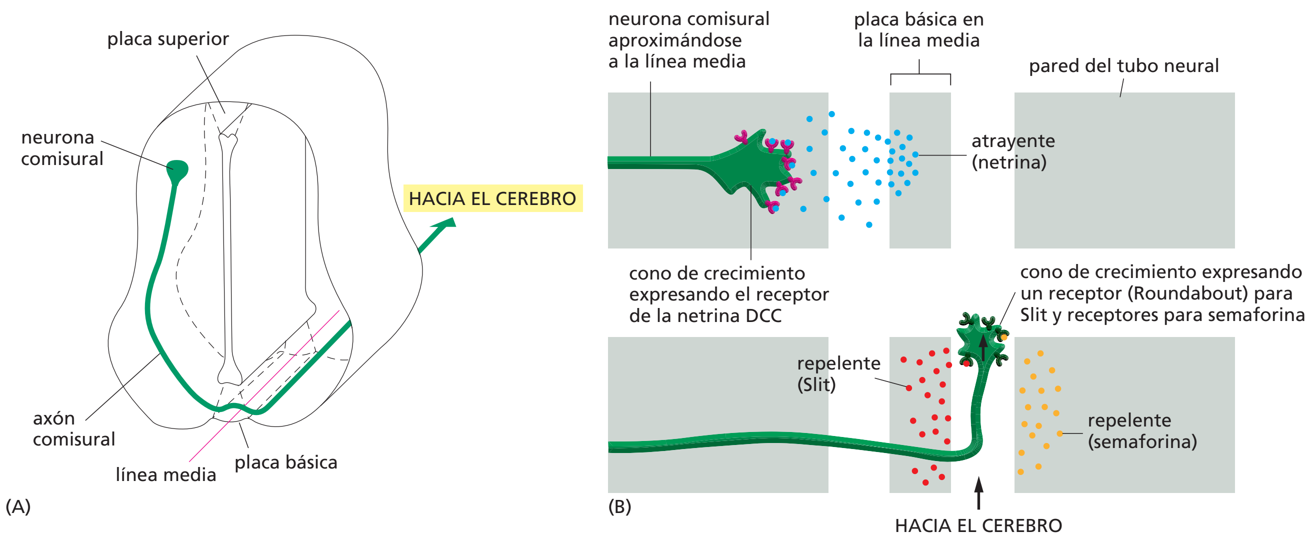


Figura 22–102 Guía de los axones comisurales. (A) Vía que siguen los axones comisurales en la médula espinal embrionaria de un vertebrado. (B) Señales que los guían. Los conos de crecimiento son atraídos primero hacia la placa básica por la netrina, la cual es segregada por las células de la placa básica y actúa sobre el receptor DCC en la membrana axónica. Una vez cruzada la placa básica, los conos de crecimiento incrementan la expresión de Roundabout, el receptor de una proteína repelente, Slit, también segregada por la placa básica. Slit, unida a Roundabout no sólo actúa como repelente impidiendo que las células vuelvan a entrar a la placa básica, sino que también bloquea la respuesta a la atracción de la netrina. Al mismo tiempo, los conos de crecimiento desencadenan la expresión de receptores para otra proteína repelente, la semaforina, que es segregada por las células de las paredes laterales del tubo neural. Confinados entre dos territorios, una vez cruzada la línea media los conos de crecimiento viajan por un apretado fascículo hacia el cerebro.

las de la glía del sistema nervioso central y las células musculares de la periferia del cuerpo. El genoma humano contiene más de 100 genes de cadherina y muchos de ellos se expresan en el cerebro (véase la Figura 19–6). Diferentes conjuntos de moléculas de adhesión célula-célula, actuando en combinaciones diversas, proporcionan un mecanismo de guía neuronal y reconocimiento selectivo. Los conos de crecimiento también migran pasando por encima de componentes de la matriz extracelular. Algunas moléculas de la matriz, como la *laminina*, favorecen la extensión del axón, mientras que otras, como los proteoglicanos de condroitín sulfato, actúan en el sentido contrario.

Los conos de crecimiento utilizan una sucesión de distintas estrategias de navegación en cada etapa de su viaje, de forma que la adhesión al sustrato no es lo único que importa. También desempeñan un papel importante los factores quimiotácticos secretados por las células que actúan como balizas en puntos estratégicos del camino atrayendo o repeliendo. La trayectoria de los axones *comisurales*, que son los que cruzan de un lado a otro del cuerpo, proporcionan un ejemplo ilustrativo de cómo una combinación de señales puede especificar un camino complejo. Los axones comisurales son característicos de todos los animales con simetría bilateral, porque los dos lados del cuerpo tienen que estar neurológicamente coordinados por el sistema nervioso. Los gusanos, las moscas y los vertebrados utilizan mecanismos de guía muy relacionados.

Por ejemplo, durante el desarrollo de la médula espinal de un vertebrado, un gran número de neuronas envían sus conos de crecimiento ventralmente hacia la placa basal, que es una banda de células especializadas que forma la línea media ventral del tubo neural (véase la Figura 22–100). Los conos de crecimiento atraviesan la placa basal y luego viran bruscamente en ángulo recto, siguiendo un camino longitudinal hacia el cerebro, paralelo a la placa basal, pero sin cruzarla (**Figura 22–102**A). La primera etapa del viaje depende del gradiente de concentración de la proteína *netrina*, secretada por las células de la placa basal: los conos de crecimiento comisurales detectan que su camino va hacia la fuente de netrina. La netrina se purificó del embrión de pollo experimentando con extractos de tejido neuronal en cultivo en busca de alguna actividad que pudiera atraer los conos de crecimiento de las neuronas de la comisura. Su secuencia reveló que se trata de un homólogo de una proteína ya conocida en *C. elegans* gracias a los cribajes genéticos de gusanos mutantes con axones descarriados; se llaman mutantes *Unc* (***unc**oordinated*) porque se mueven de forma descoordinada. Uno de los genes *Unc*, el *Unc6*, codifica el homólogo de la netrina. Otro, el *Unc40*, codifica su receptor transmembrana. Éste también tiene su homólogo en vertebrados llamado DCC, que se expresa en las neuronas comisurales y media su respuesta al gradiente de netrina.

La activación localizada de DCC por netrina lleva a la apertura de una clase especializada de canales iónicos de la membrana plasmática. Estos canales, llamados canales TRPC (***T**ransient **R**eceptor **P**otencial **C***; receptor potencial transitorio C), pertenecen a una gran familia (TRP), que es la responsable de muchos otros procesos de transducción sensorial, desde la sensación mecánica hasta la percepción de frío o calor. Cuando los canales TRPC están abiertos, permiten que el Ca^{2+} (y otros cationes) penetren en la célula. El aumento localiza-

do de Ca^{2+} activa la maquinaria que extiende los filopodios y el desplazamiento del cono de crecimiento hacia la fuente de netrina.

Los receptores del cono de crecimiento determinan la ruta que tomará: las neuronas no comisurales carecen de DCC, no son atraídas por la placa basal, mientras que las que expresan un receptor netrina diferente (en los vertebrados es el llamado Unc5H, correspondiente al Unc5 de los gusanos) son activamente repelidas por la placa basal y entonces envían sus axones hacia la placa superior.

Los conos de crecimiento pueden cambiar su sensibilidad mientras viajan

Si los conos de crecimiento son atraídos por la placa basal ¿por qué la atraviesan y emergen al otro lado, en vez de quedarse en el territorio por el que sienten atracción? y habiéndola atravesado, ¿por qué nunca vuelven atrás? La respuesta más plausible la encontramos en otro grupo de moléculas, algunas de las cuales también han sido conservadas entre vertebrados e invertebrados. Los estudios de mutantes de *Drosophila* con axones comisurales descoordinados identificaron tres de estas proteínas: Slit, Roundabout y Commissureless.

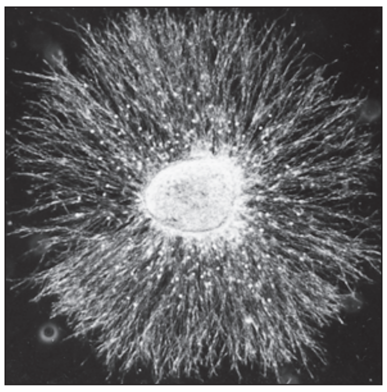
Slit, como la netrina, se produce en las células de la línea media de la mosca en desarrollo, mientras que su receptor, Roundabout, se expresa en las neuronas comisurales. Slit actúa en Roundabout, con efecto opuesto al de la netrina: repele el crecimiento de los conos y bloquea la entrada al territorio de la línea media. Sin embargo, Commissureless interfiere en la liberación de Roundabout en la superficie celular, con lo cual inicialmente los conos de crecimiento son ciegos a esta señal de "no pasar". Los conos comisurales de crecimiento provistos de la proteína Commissureless avanzan hacia la línea media; cuando la han atravesado, por algún mecanismo que todavía no entendemos se les cae la venda de los ojos respecto a Commissureless y empiezan a ser repelidos. Una vez en el otro lado, Roundabout es funcional en la superficie y, por lo tanto, tienen prohibido volver atrás.

En los vertebrados actúa un mecanismo similar, en el que intervienen homólogos de Slit y de Roundabout. Inicialmente los conos de crecimiento comisurales son atraídos hacia la línea media, y la cruzan cuando cambian las proteínas de su superficie, es decir, cambian de sensibilidad: aumenta la repulsión por Slit (que se expresa en la placa basal) y por la netrina pierden sensibilidad a la atracción. En el primer acercamiento a la línea media, la sensibilidad a Slit no está bloqueada por ningún homólogo de Commissureless, sino por un miembro divergente de la familia de receptores Roundabout, llamado Rig1, que se encuentra en la membrana plasmática e interfiere en la recepción de la señal de otros componentes de su familia. El bloqueo de Rig1 se desactiva por algún mecanismo desconocido cuando los conos ya han atravesado la línea media. La repulsión de la línea media impide que la vuelvan a cruzar. Al mismo tiempo, los conos ganan sensibilidad hacia otro grupo de señales de repulsión ejercidas por las proteínas llamadas semaforinas que impiden que regresen a las regiones de la médula espinal. Atrapados entre los dos grupos de señales repelentes, los conos no tienen otra elección que viajar por un camino estrecho que va paralelo a la placa basal, pero sin posibilidad de volverla a cruzar (Figura 22–102B).

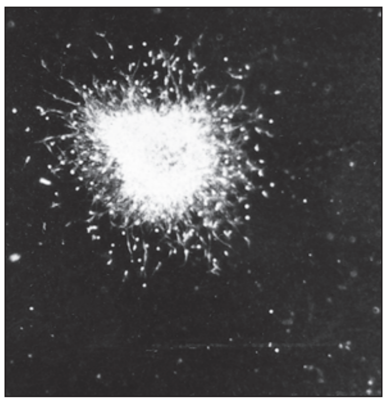
Los tejidos diana liberan factores neurotrópicos que controlan el crecimiento y la supervivencia de las células nerviosas

Cuando los conos de crecimiento llegan finalmente a la región diana tienen que detenerse y llevar a cabo la sinapsis. Ahora, las neuronas que han enviado sus axones ya pueden empezar a comunicarse con las células diana. Aunque por lo general las sinapsis transmiten señales en un solo sentido, es decir, del axón a una dendrita o a un músculo, durante el desarrollo estas señales pueden tener lugar en los dos sentidos. Las señales del tejido diana no sólo regulan cuáles de los conos tienen que hacer sinapsis y dónde (como se analizará más adelante), sino también qué número de las neuronas que han inervado sobrevivirán.

En los vertebrados la mayoría de los tipos de neuronas del sistema nervioso central y del periférico se producen en exceso; hasta un 50% o más mueren cuando han llegado a su diana incluso siendo perfectamente normales y sanas en el momento de su muerte. Por ejemplo, alrededor de la mitad de las neuronas motoras que envían sus axones a los músculos esqueléticos mueren a los pocos días de haber contactado con sus células musculares



NGF



control

Figura 22–103 Efectos del NGF sobre el crecimiento de la neurita. Fotomicrografías en campo oscuro de un ganglio simpático cultivado durante 48 horas en presencia (*arriba*) o ausencia (*abajo*) de NGF. Las neuritas crecen a partir de las neuronas simpáticas sólo cuando en el medio hay NGF. Cada cultivo contiene también células de Schwann (gliales) que han migrado del ganglio; a éstas no les afecta el NGF. La supervivencia neuronal y el mantenimiento de los conos de crecimiento para la extensión de las neuritas representan dos efectos distintos de NGF. El efecto sobre los conos de crecimiento es local, directo, rápido e independiente de la comunicación con el soma celular; cuando se suprime NGF, los conos de crecimiento afectados paran su desplazamiento durante uno o dos minutos. El efecto del NGF sobre la supervivencia es más lento y está asociada con la captación de NGF por endocitosis y su transporte intracelular de retorno al soma celular. (Cortesía de Naomi Kleitman.)

diana. Una proporción similar de las células sensoriales que inervan la piel mueren después de que sus conos de crecimiento han llegado a ella.

Parece que esta muerte de neuronas a gran escala refleja el resultado de una competencia. Cada tipo de célula diana libera una cantidad limitada del factor específico neurotrófico, que es necesario para que sobrevivan las neuronas que inervan esta diana. Aparentemente, las neuronas compiten por este factor y aquellas que no consiguen la cantidad suficiente, sufren una muerte programada. Si aumentamos la cantidad de tejido diana (p. ej., mediante un injerto de otra yema de extremidad a un lado del embrión) entonces sobreviven un mayor número de neuronas; si por el contrario, eliminamos la yema de extremidad, mueren todas las neuronas que la inervan. De esta forma, aunque los individuos difieran en sus proporciones corporales, siempre retienen el número adecuado de neuronas motoras para inervar todos sus músculos y el número adecuado de neuronas sensoriales para inervar toda la superficie del cuerpo. Esta estrategia de sobreproducción y muerte de las células sobrantes, que parece un gasto inútil, se lleva a cabo en casi todas las regiones del sistema nervioso. Proporciona la manera más sencilla y efectiva de ajustar las poblaciones de neuronas al volumen de tejidos que requieren inervación.

El primer factor neurotrófico que fue identificado sigue siendo el mejor caracterizado y simplemente se trata del factor de crecimiento nervioso o NGF (***n****erve* ***g****rowth* ***f****actor*), que es el miembro fundador de la familia de proteínas señal de las *neurotrofinas*. Este factor actúa favoreciendo la supervivencia de unas clases específicas de neuronas sensoriales que derivan de la cresta neural y de las neuronas del simpático (una subclase de neuronas periféricas que controlan las contracciones de la musculatura lisa y la secreción de las glándulas exocrinas). Los tejidos inervados por estas neuronas producen el factor NGF. Cuando existe una sobreproducción de NGF, sobreviven más neuronas sensoriales y simpáticas como si hubiera más tejido diana. Por el contrario, en un ratón con una mutación que inactiva el gen de NGF o su receptor (una tirosina quinasa transmembrana denominada TrkA) casi todas las neuronas simpáticas y sensoriales dependientes de NGF se pierden. Existen muchos factores neurotróficos pero sólo unos cuantos pertenecen a la familia de las neurotrofinas y actúan en diferentes combinaciones favoreciendo la supervivencia de diferentes clases de neuronas.

El NGF y otros factores relacionados tienen un papel adicional: además de actuar en toda la célula nerviosa controlando su supervivencia, regulan el crecimiento de los axones y las dendritas (**Figura 22–103**). Incluso pueden actuar de forma local en una parte de las ramificaciones de la neurona y favorecer el crecimiento de las ramas individuales o cortarlas. Un cono de crecimiento expuesto a NGF muestra un incremento inmediato de motilidad. En el caso contrario, cuando se elimina el factor NGF de una rama del axón, ésta muere, aunque el resto de la neurona continúe bañada en el factor.

La acción periférica del NGF continúa siendo importante después de la fase de muerte neuronal. Por ejemplo, en la piel controla la ramificación de las fibras nerviosas sensoriales, asegurando no solamente que toda la superficie del cuerpo esté inervada durante el desarrollo, sino también recuperando la inervación cuando la piel ha sufrido algún daño.

La especificidad neuronal guía la formación de mapas neuronales ordenados

En muchos casos, los axones originados a partir de neuronas de tipo similar, pero localizadas en posiciones diferentes, viajan juntos y llegan a la diana en un haz compacto. Entonces se dispersan otra vez y terminan en diferentes lugares del territorio diana.

La proyección que va del ojo al cerebro constituye un ejemplo relevante al respecto. <TACC> Las neuronas de la retina que transmiten la información visual al cerebro se llaman *células ganglionares de la retina*. Hay más de un millón de estas células y cada una de ellas envía información sobre una parte diferente del campo visual. Sus axones convergen en la cabeza del nervio óptico, en la parte trasera del ojo, y viajan juntos por el tronco óptico hasta el cerebro. En muchos vertebrados, a diferencia de los mamíferos, el principal lugar de terminación de todos ellos es el *tectum óptico* (un ancho territorio celular del cerebro medio). Los axones de la retina, al conectar con las neuronas del tectum, se distribuyen formando un patrón predecible que concuerda con la ordenación de los cuerpos neuronales en la retina: las células ganglionares que son vecinas en la retina conectan con células diana que son vecinas en el tectum. La proyección ordenada da lugar a un **mapa** del espacio visual en el tectum (**Figura 22–104**).

En muchas regiones del cerebro encontramos mapas de este tipo. Por ejemplo, en el sistema auditivo, las neuronas se proyectan desde el oído hasta el cerebro en un orden tonotópico, generando un mapa en el cual las células del cerebro que reciben información sobre sonidos de diferente frecuencia están ordenadas en una línea, como las teclas de un piano. Y en el sistema sensorial somático, las neuronas que transmiten la información de un mapa táctil a la corteza cerebral están ordenadas formando un "homúnculo" (una imagen bidimensional distorsionada de la superficie del cuerpo) (**Figura 22–105**).

El mapa retinotópico del espacio visual en el tectum óptico es el mejor caracterizado de todos estos mapas. Pero, ¿cómo se construye? En principio, los conos de crecimiento podrían estar físicamente canalizados hacia diferentes destinos, como consecuencia de sus posiciones iniciales, igual que los conductores en una carretera de varios carriles donde está prohibido cambiar de carril. Esta posibilidad se examinó en el sistema visual en un famoso experimento de la década de 1940. Cuando se corta el nervio óptico a una rana, se regenera. Los axones de la retina crecen hacia el tectum óptico restableciéndose la visión normal. Si, además damos la vuelta al ojo en el momento de cortar el nervio, de forma que se coloquen las células ventrales de la retina en posición dorsal, la visión todavía se puede restaurar, aunque con un defecto raro: el animal se comporta como si estuviese viendo el mundo boca abajo e invertido de forma lateral. Este fenómeno se debe a que las células de la retina mal colocadas realizan las conexiones que corresponderían a su posición original y no a la que realmente tienen.

Parece ser, pues, que las células tienen un valor posicional (propiedades bioquímicas específicas) que es el registro de su posición original. Como resultado de ello, las células situadas a cada lado de la retina son intrínsecamente diferentes, al igual que las neuronas motoras de la médula espinal que se proyectan a músculos distintos.

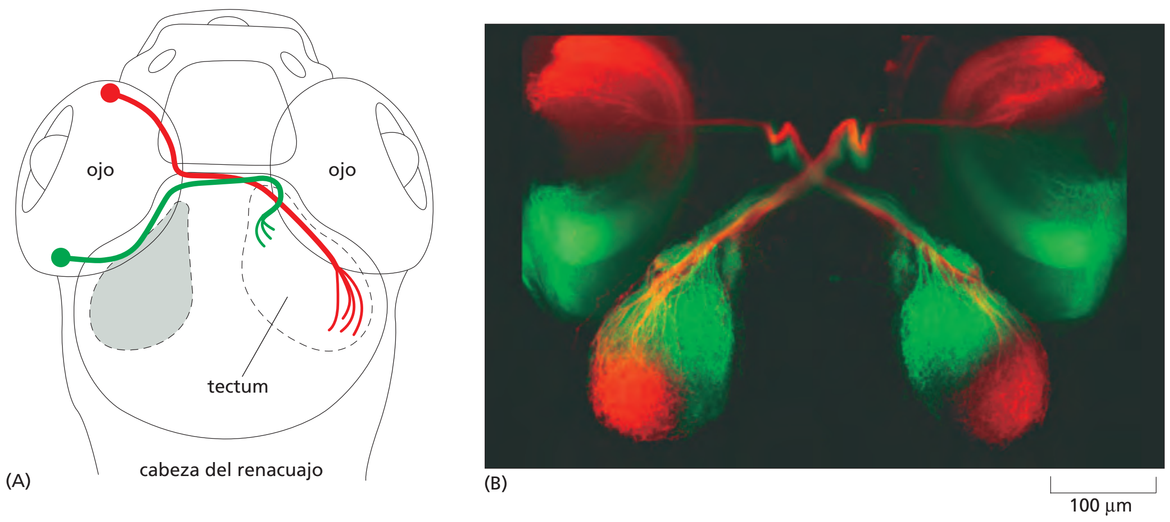


Figura 22–104 Mapa neuronal, desde el ojo hasta el cerebro, de un pez cebra joven. (A) Visión esquemática observada desde arriba de la parte superior de la cabeza. (B) Micrografía de fluorescencia. Se han inyectado colorantes fluorescentes marcadores en cada ojo, *rojo* en la parte anterior, *verde* en la parte posterior. Las moléculas marcadoras han sido captadas por las neuronas en la retina y transportadas a lo largo de sus axones, revelando los caminos que siguen hacia el tectum óptico en el cerebro y el mapa que allí forman. (Cortesía de Chi-Bin Chien, de D.H. Sanes, T.A. Reh y W.A. Harris, Development of the Nervous System. San Diego, CA: Academic Press, 2000.)

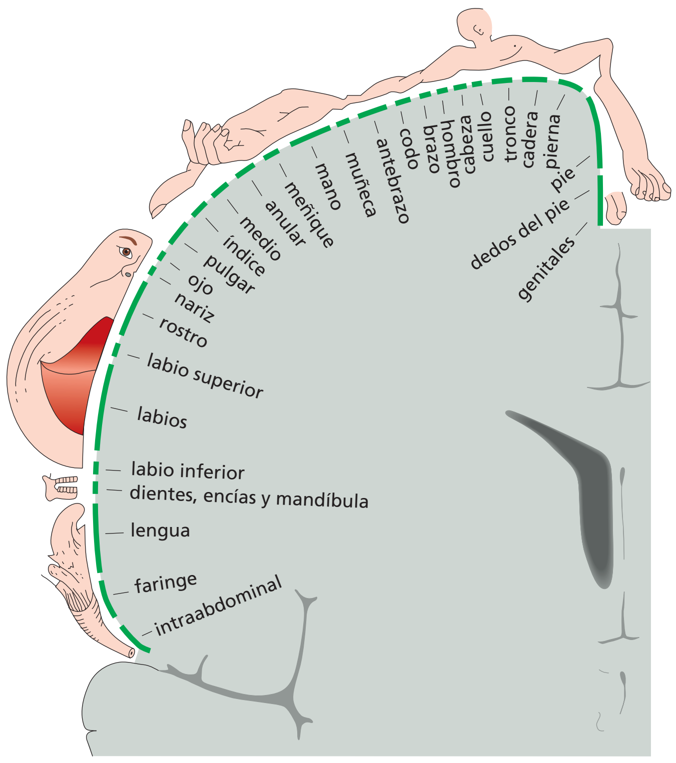


Figura 22–105 Mapa de la superficie corporal en el cerebro humano. La superficie del cuerpo se distribuye en un mapa de la región somatosensorial de la corteza cerebral mediante un sistema ordenado de conexiones de células nerviosas, de tal manera que la información sensorial de regiones próximas corporales se conduce a regiones próximas en el cerebro. Este hecho comporta que el mapa del cerebro siga fielmente la topología de la superficie del cuerpo, incluso aunque diferentes regiones del cuerpo se representen amplificadas de modo diferente de acuerdo con la densidad de la inervación. El homúnculo (el "hombrecito" del cerebro) tiene labios grandes puesto que los labios son una amplia e importante fuente de información sensitiva. El mapa se ha determinado estimulando diferentes puntos en la corteza de pacientes conscientes durante una cirugía cerebral y registrando lo que éstos dicen sentir. (Según W. Penfield y T. Rasmussen, The Cerebral Cortex of Man. New York: Macmillan, 1950.)

Esta no equivalencia entre las neuronas es lo que se ha denominado *especificidad neuronal*. Es esta característica intrínseca la que guía a los axones hacia sus lugares diana del tectum. Los axones los distinguen porque las células del tectum también tienen marcas de posición. Por lo tanto, el mapa neuronal depende de la correspondencia entre dos sistemas de marcadores de posición, uno en la retina y otro en el tectum.

Los axones de diferentes regiones de la retina responden de forma diferente a un gradiente de moléculas repelentes del tectum

Los axones de la retina nasal (la región más próxima a la nariz) se proyectan hacia el tectum posterior, y los de la retina temporal (la región más alejada de la nariz), hacia el tectum anterior, mientras que en las regiones intermedias se proyectan hacia regiones intermedias del tectum. Tanto los axones nasales como los temporales son selectivos cuando se cultivan sobre un tapiz de membranas del tectum anterior o posterior (**Figura 22–106**). Los axones temporales muestran una notable preferencia por las membranas del tectum anterior, igual que *in vivo*, mientras que los nasales prefieren las membranas posteriores o no muestran ninguna preferencia (según la especie animal). La diferencia clave entre el tectum anterior y posterior estriba en un factor de repulsión del tectum posterior, al cual son sensibles los axones de la zona temporal de la retina, pero no los de la zona nasal: si un cono toca la membrana del tectum posterior, sus filopodios se debilitan y se retraen.

Estudios *in vitro* basados en estos fenómenos han identificado algunas de las moléculas responsables. Parece que el factor de repulsión de la membrana del tectum posterior está formado, enteramente o en parte, por las proteínas *efrinaA*, un subgrupo de la familia de proteínas ligadas a GPI que actúan como ligandos de los receptores tirosina quinasa de la familia *EphA*. En el ratón se expresan dos efrinas distintas que forman un gradiente en las células del tectum, que va desde la parte anterior a la posterior. Las células anteriores no tienen efrina o muy poca, las del centro expresan efrina A2 y las del extremo posterior del tectum efrina A2 y efrina A5. De esta forma, se establece un gradiente de expresión de efrina a lo largo del tectum. Al mismo tiempo, los axones que llegan expresan receptores Eph, también lo hacen en gradiente: los axones de la zona temporal expresan altos niveles de Eph, haciéndolos sensibles a la repulsión por efrinaA, mientras que los axones de la zona nasal expresan bajos niveles de Eph. De modo similar, a través del otro eje principal del tectum (el que va de la zona media a la lateral), se distribuye una expresión gradual de la proteína efrinaB y tam-

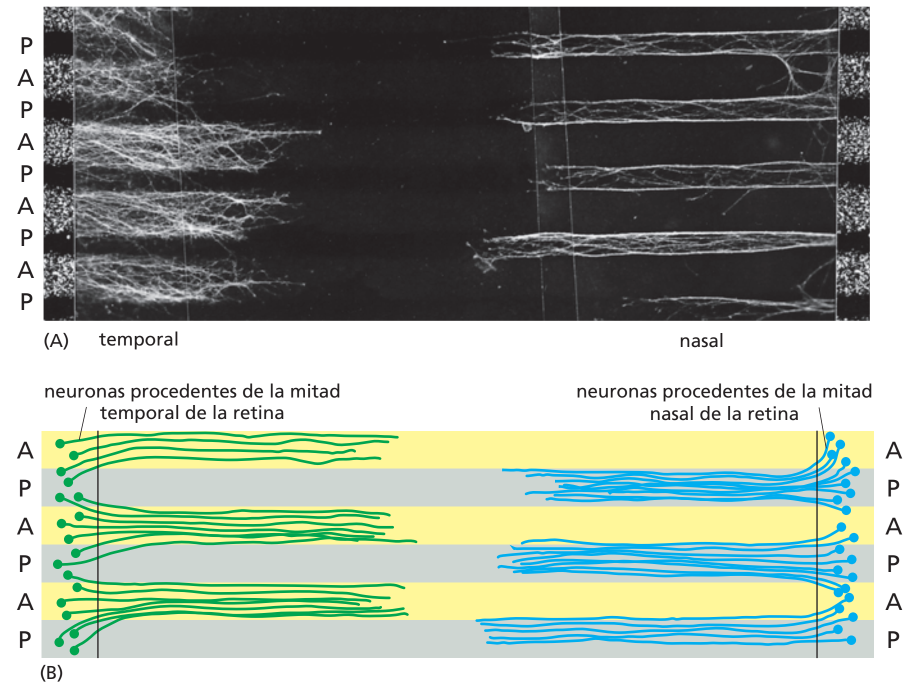


Figura 22–106 Selectividad de los axones retinianos creciendo sobre membranas de tectum. (A) Fotografía de una observación experimental. (B) Esquema de cómo se produce este proceso. El sustrato de cultivo se ha recubierto de tiras alternadas preparadas a partir de membranas de tectum **p**osterior (P) o a partir de membranas de tectum **a**nterior (A). En la fotografía, las tiras del tectum anterior se visualizan utilizando un marcador fluorescente en los márgenes verticales laterales de la imagen. Los axones de las neuronas de la mitad temporal de la retina (que crecen desde la *izquierda*) siguen las tiras de las membranas del tectum anterior evitando las membranas del tectum posterior, mientras que los axones de las neuronas de la mitad nasal de la retina (que crecen desde la *derecha*) lo hacen a la inversa. Por tanto, el tectum anterior difiere del tectum posterior y la retina nasal de la retina temporal; estas diferencias determinan el crecimiento selectivo de los axones. Estos experimentos han sido llevados a cabo con células de embrión de pollo. (De Y. von Boxberg, S. Deiss y U. Schwarz, *Neuron* 10:345-357, 1993. Con autorización de Elsevier.)

bién otro tipo de molécula señal, la Wnt3, con su correspondiente expresión gradual de receptores EphB y Wnt a lo largo del eje dorsoventral de la retina.

Este sistema de señales y receptores es suficiente para generar un mapa bidimensional ordenado, si asumimos el siguiente hecho, confirmado por experimentos *in vivo*: los axones de la retina interactúan y compiten entre sí por el territorio del tectum. Así, los axones de la zona temporal se restringen al tectum anterior e impiden que lo hagan los de la zona nasal; en consecuencia, éstos se restringen al tectum posterior. Entre los dos extremos se establece un equilibrio y se genera un mapa uniforme del eje temporonasal de la retina en el eje anteroposterior del tectum.

Los patrones difusos de conexiones sinápticas se definen por remodelación activa

En un animal normal, el mapa del tectum retiniano inicialmente es borroso e impreciso; el sistema descrito de marcadores que se corresponden es suficiente para definir una distribución general del mapa, pero no lo suficiente como para especificar los detalles más precisos. Los estudios con ranas y peces muestran que cada axón de la retina primero se ramifica profusamente en el tectum, con un número elevado de sinapsis esparcidas por una gran área del tectum que se solapa con los territorios inervados por otros axones. A continuación, estos territorios se ajustan mediante una eliminación selectiva de sinapsis y retracción de las ramas de los axones. Todo este proceso se acompaña de la formación de nuevas ramificaciones que hacen que los axones desarrollen una distribución más densa de las sinapsis en su territorio.

Una parte esencial de esta remodelación y definición del mapa es la generación de un orden espacial, en el cual intervienen dos reglas de competencia: (1) los axones de regiones alejadas de la retina, que tienden a excitarse en diferentes momentos, compiten para dominar el territorio del tectum disponible, pero (2) los axones de lugares cercanos de la retina, que tienden a excitarse al mismo tiempo, inervan regiones vecinas en el tectum, colaborando en el mantenimiento y refuerzo de sus sinapsis en células del tectum compartidas (**Figura 22–107**). El mecanismo subyacente de estas dos reglas depende de la actividad eléctrica y de la señalización en las sinapsis que se forman. Si todos los potenciales de acción se bloquean mediante una toxina ligada a los canales de Na^+, se inhibe la remodelación sináptica y el mapa permanece impreciso.

El fenómeno de la eliminación de las sinapsis dependiente de actividad está presente en casi todas las partes del sistema nervioso de los vertebrados en desarrollo. Primero, las si-

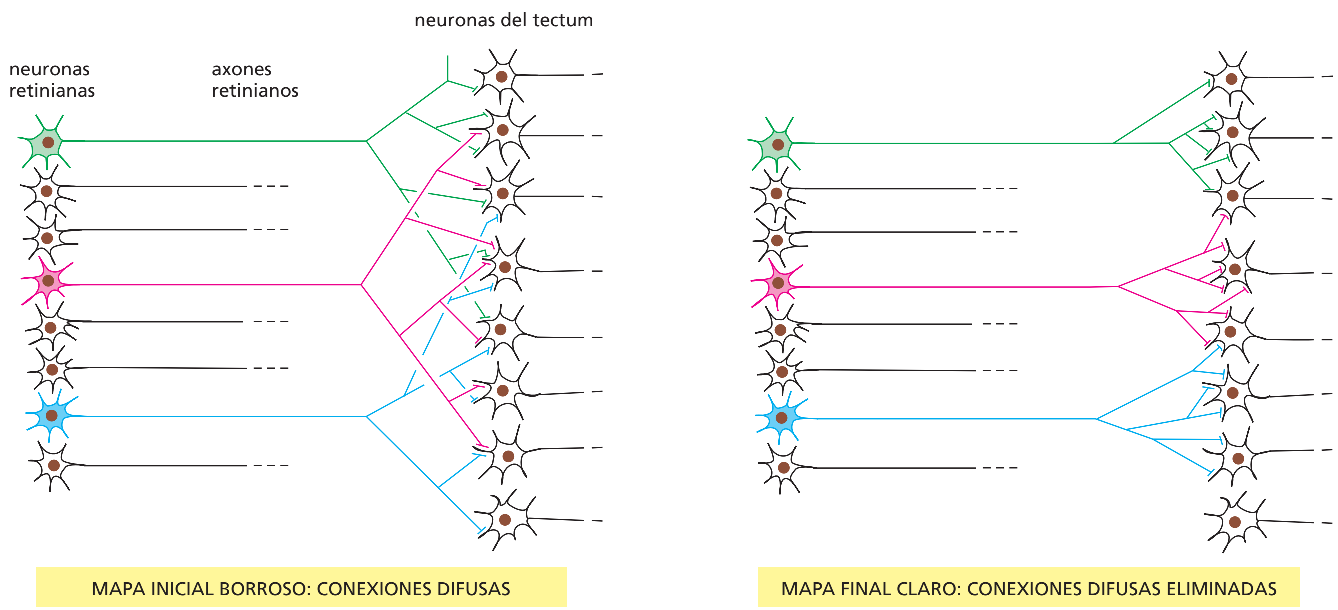


Figura 22–107 Clarificación del mapa retinotectal mediante eliminación de sinapsis. En un principio, el mapa es difuso porque cada axón retiniano se ramifica ampliamente inervando una amplia región del tectum y solapando las regiones inervadas por otros axones retinianos. Entonces, el mapa se va refinando mediante la eliminación de sinapsis. Cuando dos axones procedentes de diferentes partes de la retina forman sinapsis en una misma célula del tectum, compiten entre sí, eliminándose las conexiones de uno de los dos axones. Pero los axones de células que son vecinas en la retina cooperan y mantienen sus sinapsis en células comunes del tectum. Así, cada axón retiniano termina por inervar un territorio reducido del tectum, adyacente y parcialmente solapado con el territorio inervado por axones de sitios vecinos de la retina.

napsis se forman en abundancia y se distribuyen por un amplio territorio diana, luego el sistema de conexiones sufre una eliminación selectiva y se remodela mediante procesos competitivos que dependen de la actividad eléctrica y la señalización sináptica. Esta forma de eliminar sinapsis es distinta de la eliminación del exceso de neuronas por muerte celular y, además, ocurre después de finalizar el periodo normal de muerte celular.

Gran parte de lo que se conoce sobre los mecanismos celulares de la formación y eliminación de sinapsis procede de experimentos sobre la inervación del músculo esquelético en embriones de vertebrados. El intercambio dual de señales entre los terminales de los axones y las células musculares controla la formación inicial de las sinapsis. En los lugares de contacto, los receptores de acetilcolina están agrupados en la membrana de la célula muscular, y el sistema que secreta este neurotransmisor se organiza en los terminales de los axones (tratado en el Capítulo 11). Al principio, todas las células musculares reciben sinapsis de varias neuronas, pero al final, cada una queda de ellas inervada por un solo axón, mediante un proceso que dura un par de semanas. La retracción depende de la comunicación sináptica: si se bloquea una transmisión mediante una toxina, que se une a los receptores de acetilcolina de la membrana de la célula muscular, ésta retiene su inervación múltiple más allá del momento en que normalmente ya se habría eliminado.

Experimentos realizados sobre el sistema muscular esquelético y sobre el tectum retiniano, sugieren que para el mantenimiento de las sinapsis no sólo es importante que haya más o menos actividad eléctrica sino también su coordinación temporal. El hecho de que una sinapsis se refuerce o se debilite depende sobre todo de si la actividad de la célula presináptica está sincronizada con la de las otras células que realizan sinapsis en la misma diana, (y, por lo tanto, también sincronizada con la actividad de la misma diana.

Éstos y otros hallazgos han sugerido una interpretación sencilla de las reglas de competencia en la eliminación de las sinapsis en el sistema del tectum retiniano (**Figura 22–108**). Los axones de las distintas partes de la retina compiten descargando en diferentes momentos. Cada vez que uno descarga, se debilita la sinapsis de los otros que comparten la misma célula diana, hasta que uno de los axones queda solo al mando de esta célula. Por otro lado, los axones de las células vecinas de la retina tienden a descargar sincrónicamente: entonces no compiten, sino que mantienen las sinapsis con las células del tectum que comparten, creando un mapa ordenado muy preciso, en el cual las células vecinas de la retina se proyectan hacia lugares vecinos en el tectum.

La experiencia moldea el patrón de las conexiones sinápticas en el cerebro

El fenómeno que se acaba de describir se resume en la frase: "Las neuronas que descargan a la vez, conectan a la vez". La misma regla que relaciona el mantenimiento de la sinapsis con

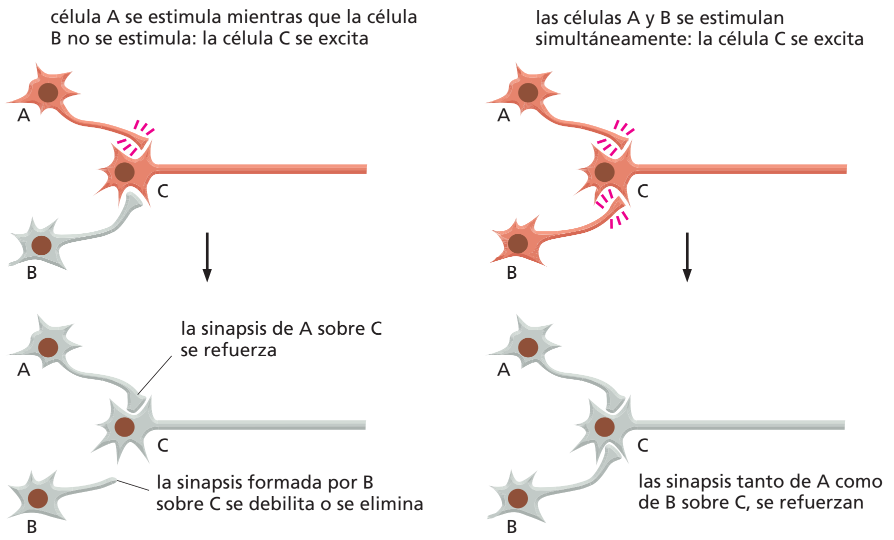


Figura 22–108 Modificación sináptica y su dependencia de la actividad eléctrica. Experimentos realizados en diferentes sistemas demuestran que las sinapsis se refuerzan o debilitan por actividad eléctrica de acuerdo con el principio que se muestra en el diagrama. Parece que el principio básico consiste en que cada excitación de una célula diana tiende a debilitar las sinapsis en las que el axón presináptico terminal haya estado silenciado, pero tiende a reforzar las sinapsis en las que el axón presináptico terminal haya estado activo. Como resultado de ello, "neuronas que se activan juntas, permanecen juntas". Una sinapsis que ha sido debilitada con frecuencia y que ha sido reforzada muy pocas veces, finalmente es eliminada por completo.

la actividad nerviosa facilita la organización del desarrollo de nuestro cerebro a la luz de la experiencia.

En el cerebro de un mamífero, los axones que llevan información de ambos ojos están juntos en un estrato específico de la región visual del córtex cerebral. En esta zona se forman dos mapas solapados del campo visual externo: el que se percibe con el ojo derecho y el que se percibe con el ojo izquierdo. Aunque hay alguna evidencia de que existe una tendencia a segregar las informaciones que envía cada ojo, incluso antes de que empiece la comunicación sináptica, una gran parte de los axones que llevan información de los dos ojos, en las primeras fases, realizan la sinapsis todos a la vez en células diana corticales compartidas. No obstante, el periodo de actividad temprana de señalización ocurre de forma espontánea y de forma independiente en cada retina, incluso antes de que empiece la visión; esto lleva a una segregación clara de las informaciones de los ojos, creando en el córtex bandas de células que están gobernadas por las informaciones provenientes del ojo derecho alternando con bandas gobernadas por las informaciones del ojo izquierdo (**Figura 22–109**). La regla de la descarga sugiere esta sencilla interpretación: dos axones que llevan información de lugares vecinos del ojo izquierdo por lo general descargan simultáneamente y, por lo tanto, conectan al mismo tiempo, igual que lo hacen los axones de lugares vecinos del ojo derecho; pero un axón del ojo derecho y otro del izquierdo en pocas ocasiones descargan a la vez, sino que compiten. Como es lógico, si se detiene la actividad de ambos ojos, mediante drogas que bloqueen los potenciales de acción o de transmisión de las sinapsis, la información no se segrega correctamente.

El mantenimiento del patrón de conexiones es extraordinariamente sensible a las primeras experiencias de la vida. Si durante cierto *periodo crítico* (que se acaba hacia los 5 años en humanos) se mantiene un ojo tapado durante un tiempo, privándolo de estimulación visual, mientras que el otro ojo recibe la estimulación normal, el ojo privado de estímulos pierde casi por completo sus conexiones sinápticas con el córtex, de forma que se vuelve casi irreversiblemente ciego. Según predice la regla de la descarga, ha tenido lugar una compe-

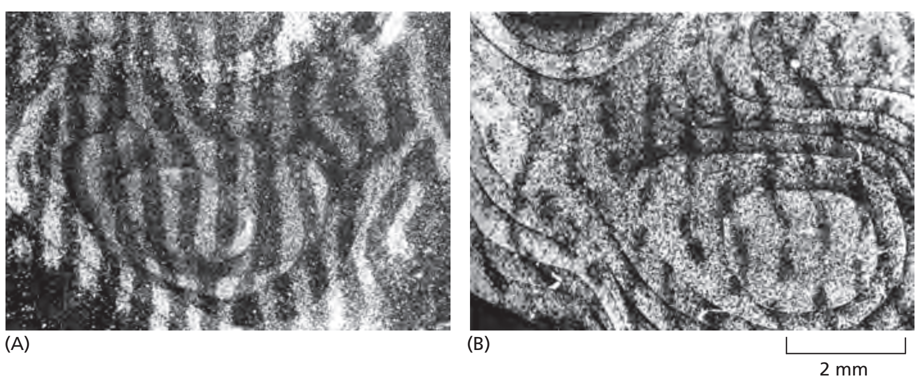


Figura 22–109 Franjas de dominancia ocular en la corteza visual de un cerebro de mono y su sensibilidad a la experiencia visual. (A) Normalmente, las franjas de células corticales regidas por el ojo derecho se alternan con franjas, de igual grosor, regidas por el ojo izquierdo. En este caso, las franjas se han revelado inyectando una molécula trazadora radiactiva en un ojo, dando tiempo para que este trazador se transporte a la corteza visual y detectando allí la radiactividad por autorradiografía en secciones paralelas a la superficie cortical. (B) Si un ojo se mantiene cubierto durante el periodo crítico de desarrollo y, por tanto, se le priva de experiencia visual, sus franjas se encogen y las del ojo activo se expanden. De esta forma, el ojo de luz privado pierde casi totalmente su poder de visión. (De D.H. Hubel, T.N. Wiesel y S. Le Vay, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 278:377-409, 1977. Con autorización de The Royal Society.)

tencia por la cual las sinapsis realizadas por los axones inactivos son eliminadas, mientras que las de los axones activos se consolidan. De esta forma, el territorio cortical se destina a los axones que transmiten información y no se desaprovecha con los que están inactivos.

En el establecimiento de las conexiones nerviosas que nos proporcionan el sentido de la vista, no sólo es importante la cantidad de estimulación visual, sino también su coordinación temporal. Por ejemplo, la capacidad de ver en profundidad (la visión estereoscópica) depende de células de otras capas del córtex visual, que reciben la información procedente de ambos ojos a la vez sobre una misma parte del campo visual, observada desde dos ángulos ligeramente distintos. Estas células que reciben la información de forma binocular, nos permiten comparar la visión del ojo derecho con la del ojo izquierdo para poder derivar información sobre las distancias relativas de los objetos. Sin embargo, si durante el periodo crítico se impide que los dos ojos vean la misma escena al mismo tiempo (p. ej., cubriendo primero un ojo y luego el otro en días alternos, o simplemente como consecuencia de tener un ojo bizco durante la infancia) no se retiene casi ninguna célula binocular en el córtex y se pierde de forma irremisible la capacidad de visión estereoscópica. Como es evidente de acuerdo con la ley de la descarga, la información de cada ojo que llega a una neurona binocular sólo se mantiene si las dos entradas son activadas con frecuencia a descargar sincrónicamente, como ocurre cuando los dos ojos miran la misma escena.

Posiblemente la memoria del adulto y la remodelación sináptica en el desarrollo dependen de mecanismos similares

En el Capítulo 11 se explicó que por lo menos en algunas partes del cerebro adulto, sobre todo en el hipocampo, los cambios sinápticos subyacentes de la memoria dependen directamente del comportamiento de un tipo particular de receptor para el neurotransmisor glutamato, el NMDA. Los iones Ca^{2+} que penetran en la célula postsináptica a través de los canales abiertos por este receptor desencadenan cambios duraderos en la fuerza de las sinapsis sobre esta célula, que afectan tanto a las estructuras presinápticas como las postsinápticas. En el cerebro adulto, los cambios inducidos por el mecanismo dependiente de NMDA obedecen reglas muy parecidas a la de la descarga: los acontecimientos del mundo exterior que hacen que dos neuronas se activen al mismo tiempo, o en una sucesión rápida, favorecen la formación o el fortalecimiento de las sinapsis entre ellas. Esta circunstancia, llamada *regla de Hebb*, se ha considerado como el principio fundamental que subyace a todo aprendizaje asociativo.

¿Entonces, es posible que, tanto el aprendizaje adulto como las formas más drásticas de plasticidad sináptica que observamos en el desarrollo, dependan de la misma maquinaria de ajuste sináptico? Existen muchos indicios de que esto es así. Por ejemplo, los inhibidores que bloquean de forma específica la activación del receptor NMDA interfieren en el perfeccionamiento y la remodelación de las conexiones sinápticas en el sistema visual en desarrollo. Tanto en el adulto como en el animal en desarrollo las alteraciones en la fuerza de las conexiones sinápticas corresponden a cambios en la estructura física. Sin embargo, la escala de estos cambios físicos es muy diferente. En el organismo en desarrollo, normalmente la actividad eléctrica regula la extensión y la regresión de grandes ramas de los árboles de dendritas y axones. Pero en el cerebro adulto, por lo general los ajustes estructurales que tienen lugar como respuesta a la actividad muestran una localización mucho más precisa y afectan al tamaño de las espinas de las dendritas individuales; las espinas son protuberancias de forma redondeada que miden apenas algunos micrómetros de largo y es donde las dendritas reciben las sinapsis individuales (**Figura 22–110**). Parece que los iones Ca^{2+} que entran en la espina a través de los canales de NMDA pueden hacer que esta espina remodele su citoesqueleto de actinas, como respuesta a la excitación de la sinapsis. Pero todavía tenemos mucho que aprender sobre el mecanismo de estos cambios y su relación con el aprendizaje y la memoria. Las bases moleculares del proceso de la remodelación sináptica, a través de la cual nuestra experiencia moldea el cerebro, es todavía uno de los retos principales que el sistema nervioso presenta a la biología celular.

Resumen

El desarrollo del sistema nervioso se realiza en tres fases: primero se generan las células nerviosas mediante divisiones celulares; después, una vez han cesado de dividirse, envían axones y dendritas para formar un gran número de sinapsis con células muy alejadas, iniciándose así la comunica-

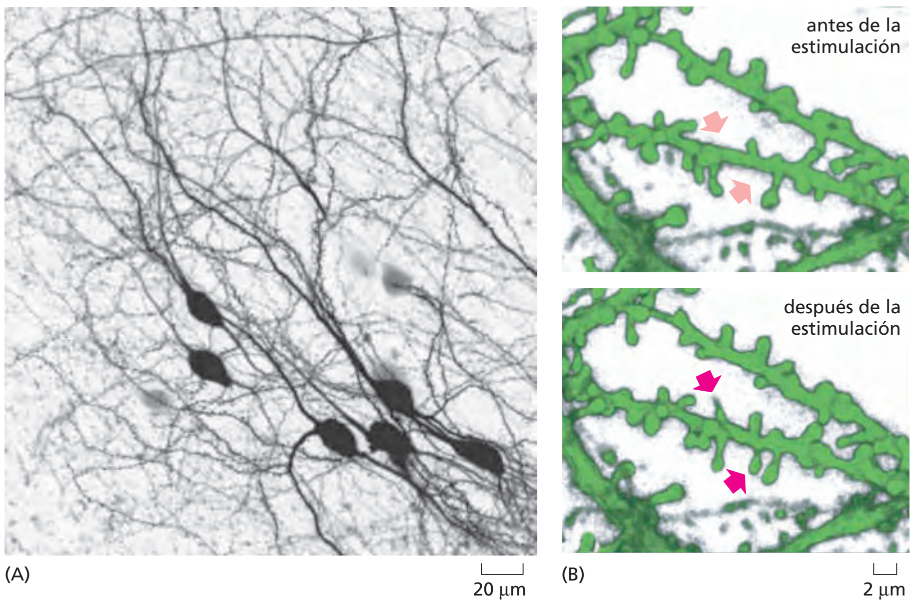


Figura 22–110 Crecimiento de espinas dendríticas en respuesta a la estimulación sináptica. (A) Neuronas en una sección de un tejido vivo procedente del hipocampo de un ratón joven. Las células se han marcado por la expresión de la proteína fluorescente verde y se han observado mediante un microscopio confocal, que permite observar a alta resolución las dendritas individuales. (B) Las dos figuras de la derecha muestran imágenes procesadas de una pequeña zona de la figura principal, correspondiente a dendritas. Estas dendritas están recubiertas de pequeñas espinas sinápticas, que son los lugares donde se forman las sinapsis. En efecto, impulsos repetidos de estimulación sináptica, generados por un microelectrodo cercano, producen a los 30 minutos la formación de nuevas espinas. El descenso de la frecuencia de la estimulación tiene efectos opuestos y causa la regresión de algunas espinas. (De U.V. Nägerl, N. Eberhorn, S.B. Cambridge y T. Bonhoeffer, *Neuron* 44:759-767, 2004. Con permiso de Elsevier.)

ción; por último, se perfecciona el sistema de conexiones sinápticas y se remodela de acuerdo con el patrón de actividad eléctrica de la red nerviosa.

Las neuronas y las células de la glía que siempre las acompañan, se generan a partir de precursores ectodérmicos; aquellas que nacen en diferentes lugares y momentos expresan distintos grupos de genes, que ayudarán a determinar qué conexiones se formarán. Los axones y las dendritas crecen mediante los conos de crecimiento, que siguen rutas específicas marcadas por señales que van apareciendo a lo largo de todo el camino. Estructuras como la placa basal de la médula espinal embrionaria secretan quimioatrayentes y quimiorepelentes, a los cuales responden de forma distinta los conos de crecimiento de las diferentes clases de neuronas. Cuando llegan al área diana, los axones terminan selectivamente en un grupo de células accesibles y se establecen mapas neuronales en muchas partes del sistema. Los mapas son proyecciones ordenadas de un conjunto de neuronas en otro. En el sistema del tectum retiniano, el mapa se basa en la correspondencia de sistemas complementarios de marcadores de posición de la superficie celular (efrinas y receptores Eph) que se encuentran en los dos grupos de células.

Cuando los conos de crecimiento han llegado a sus dianas y se han formado las conexiones iniciales, tienen lugar dos tipos de ajustes principales. Primero, muchas neuronas mueren como resultado de una competencia por factores de supervivencia como el NGF (factor de crecimiento nervioso), secretado por el tejido diana. Esta muerte celular ajusta la cantidad de inervación según el tamaño de la diana. Segundo, las sinapsis individuales se seleccionan y eliminan en algunos lugares y se refuerzan en otros, con lo cual se genera un patrón ordenado de conexiones muy preciso. Este último proceso depende de la actividad eléctrica: las sinapsis que se activan con frecuencia se refuerzan; las diferentes neuronas que contactan con la misma célula diana tienden a mantener sus sinapsis en la diana compartida sólo si son activadas de forma frecuente y simultánea. De esta manera, la estructura del cerebro se ajusta reflejando las conexiones entre los acontecimientos del mundo exterior. El mecanismo molecular subyacente a esta plasticidad sináptica podría ser similar al que es responsable de la formación de los recuerdos en el adulto.

EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS

Las plantas y los animales están separados aproximadamente por 1500 millones de años de historia evolutiva. Su organización pluricelular ha evolucionado de forma independiente pero utilizando el mismo conjunto de herramientas inicial: los genes heredados de su ancestro común, un eucariota unicelular. La mayor parte de las diferencias en sus estrategias de desarrollo surgen de dos peculiaridades básicas de las plantas. La primera es que éstas obtienen la energía de la luz solar y no a través de la ingesta de otros organismos. Este hecho implica un esquema corporal distinto del de los animales. La segunda es que sus células están encajadas en paredes celulares semirrígidas y cementadas entre sí de tal forma que no

pueden desplazarse como lo hacen las células animales. Estas características implican una serie de mecanismos que dan forma al cuerpo y diferentes procesos de desarrollo que les permitan adaptarse a un entorno cambiante.

El desarrollo animal está muy protegido de los cambios ambientales y el embrión genera la misma estructura corporal no afectada por las condiciones externas. Por el contrario, el desarrollo de la mayoría de las plantas está fuertemente influenciado por el entorno. Debido a que no pueden adaptarse al medio desplazándose de un lugar a otro, las plantas lo hacen alterando el curso de su desarrollo. Su estrategia es oportunista. Un tipo determinado de órgano (p. ej., una hoja, una flor o una raíz) se puede generar a partir del huevo fecundado de muchas maneras distintas, según las condiciones ambientales. Una hoja de begonia encabillada en el suelo puede producir una raíz, la raíz puede hacer brotar un tallo y el tallo puede dar hojas y flores bajo luz solar.

Normalmente una planta madura está constituida por muchas copias de un pequeño grupo de módulos estandarizados, tal como se describe en la **Figura 22–111**. Las posiciones que ocupan estos módulos y el momento en que se generan, están muy influenciados por el ambiente, hecho que implica que la estructura de la planta sea variable. La elección de módulos alternativos y su organización en el conjunto de la planta dependen de condiciones externas y de señales hormonales de largo alcance, que en el control del desarrollo de los animales desempeñan un papel mucho más secundario.

Pero aunque la estructura global de una planta (el patrón de las raíces o de las ramas, el número de hojas o de frutos) sea altamente variable, la organización detallada a pequeña escala no lo es. Una hoja, una flor o un embrión temprano están tan perfectamente especificados como cualquier órgano de un animal y posee una estructura *determinada*, en contraposición con el modelo *indeterminado* de ramificación y crecimiento de la planta en su conjunto. La organización interna de un módulo vegetal plantea en esencia los mismos problemas de control genético de formación del patrón que en el caso del desarrollo animal, y se solucionan de modo análogo. En esta sección nos centraremos en los mecanismos celulares del desarrollo de las plantas con flores y se examinarán tanto las diferencias como las similitudes con los animales.

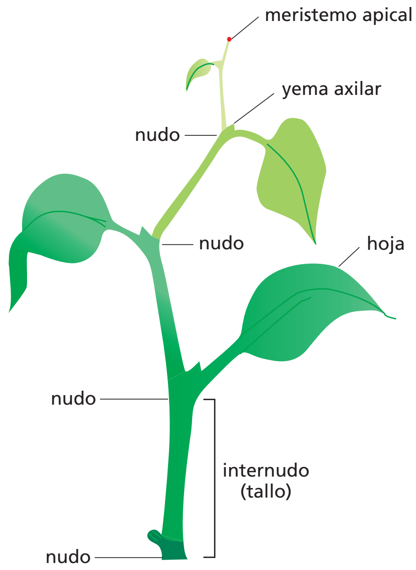


Figura 22–111 Un ejemplo sencillo de construcción modular de las plantas. Cada módulo (mostrado en diferentes tonos de *verde*) está formado por un tallo, una hoja y una yema que contiene un centro de crecimiento potencial o meristemo. La yema se forma en un punto de ramificación, o nudo, donde la hoja diverge del tallo. Los módulos aparecen secuencialmente a partir de la actividad continua del meristemo apical.

Arabidopsis se utiliza como organismo modelo para la genética molecular de las plantas

Las plantas con flores, a pesar de su asombrosa variedad, son de origen relativamente reciente. Los ejemplares fósiles más primitivos datan de 130 millones de años, mientras que los de los animales vertebrados datan de 350 millones de años o más. Sin embargo, a pesar de tanta diversidad morfológica existe un alto grado de similitud en los mecanismos moleculares. Como veremos, un pequeño cambio genético es capaz de transformar la estructura de la planta a gran escala; del mismo modo que la fisiología vegetal permite la supervivencia en una amplia variedad de ambientes, también hace posible que sobrevivan muchas formas de estructuras distintas. Una mutación que produzca un animal de dos cabezas por lo general es letal, mientras que una que doble el número de flores o de ramas, en general no lo es.

Para identificar los genes que rigen el desarrollo y descubrir cómo funcionan, los biólogos vegetales han elegido como organismo modelo, una pequeña planta herbácea, la crucífera *Arabidopsis thaliana* (**Figura 22–112**). A semejanza de *Drosophila* o de *Caenorhabditis elegans*, es pequeña, de reproducción rápida y adecuada para los estudios genéticos. Se puede cultivar en grandes cantidades en cápsulas de Petri o en pequeñas macetas; cada planta produce cientos de semillas en cuestión de 8 a 10 semanas. Junto con *C. elegans*, tiene una ventaja significativa sobre *Drosophila* o los vertebrados desde el punto de vista genético: igual que muchas plantas con flores, se puede reproducir como un hermafrodita, ya que una misma flor produce óvulos y también los gametos masculinos que pueden fecundarlos. Por lo tanto, cuando se autofecunda una flor que es heterocigota para una mutación letal recesiva, una cuarta parte de sus semillas presentarán el fenotipo embrionario homocigoto. Esto



Figura 22–112 ***Arabidopsis thaliana*.** Esta pequeña planta es un miembro de la familia de la mostaza (o crucíferas) (véase también Figura 1–46). Es una hierba de uso no económico pero de gran valor para los estudios genéticos del desarrollo vegetal. (De M.A. Estelle y C.R. Somerville, *Trends Genet*. 12:89-93, 1986. Con autorización de Elsevier.)

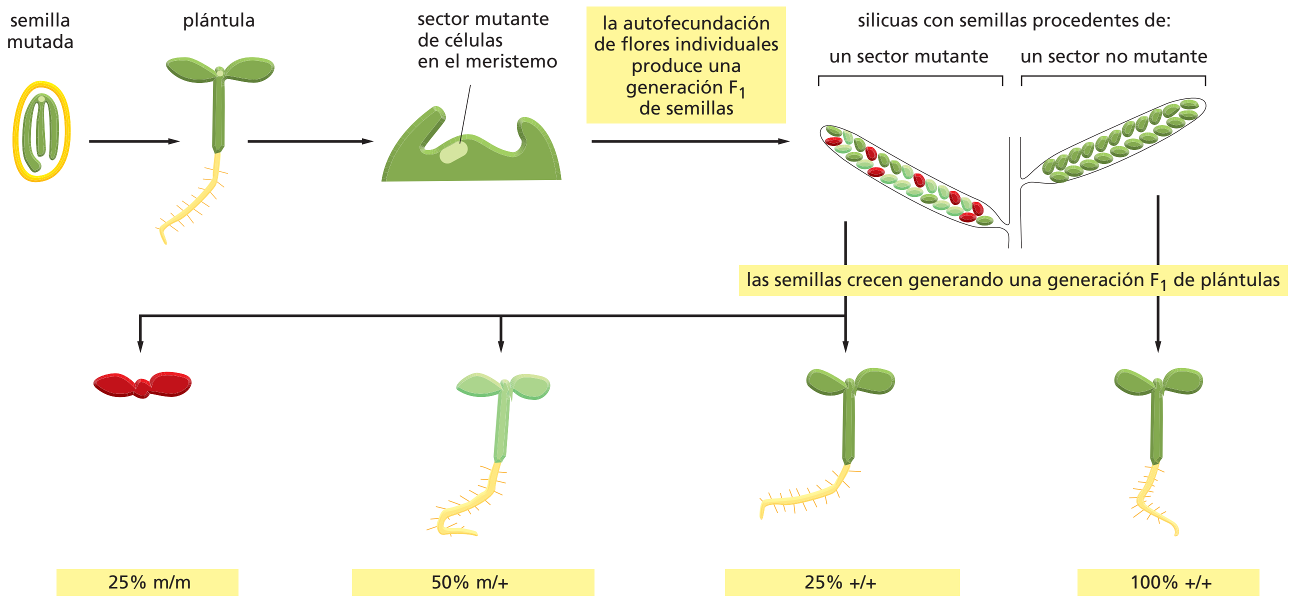


Figura 22–113 Producción de mutantes en *Arabidopsis*. Una semilla, que contiene un embrión pluricelular, se trata con un mutágeno químico y se le deja crecer hasta transformarse en una planta. Por lo general esta planta será un mosaico de clones de células portadoras de diferentes mutaciones inducidas. Normalmente, cada una de las flores producidas por esta planta está compuesta por células que pertenecen al mismo clon, todas ellas portadoras de la misma mutación, *m*, en la forma heterozigota (*m*/+). La autofecundación de flores individuales por su propio polen da como resultado silicuas con semillas, cada una de las cuales contiene una familia de embriones de cuyos miembros aproximadamente la mitad serán heterozigotos (*m*/+), una cuarta parte serán homozigotos mutantes (*m*/*m*) y la otra cuarta parte será homozigotos salvajes (+/+). A menudo, la mutación tendrá un efecto letal recesivo, como aquí se indica por la falta de raíz en la plántula *m*/*m*. En este caso, estas mutantes se mantienen a partir de los heterozigotos: se producirán silicuas con semillas (generación F_2) conteniendo todas ellas una mezcla de semillas +/+, *m*/+ y *m*/*m*.

facilita el cribado genético (**Figura 22–113**) y la obtención de un catálogo de los genes que se necesitan para procesos de desarrollo específicos.

El genoma de *Arabidopsis* es rico en genes de control del desarrollo

Arabidopsis tiene uno de los genomas vegetales más pequeños: 125 millones de pares de nucleótidos que equivalen al tamaño del genoma de *C. elegans* y *Drosophila*. En la actualidad se conoce que la secuencia completa de su DNA contiene cerca de 26.000 genes. Sin embargo, este número incluye muchos duplicados generados recientemente; de hecho, el número de tipos distintos de proteínas en términos funcionales debe ser bastante menor. Se han desarrollado técnicas de cultivo celular y transformación genética así como grandes bancos de semillas con mutaciones producidas por inserciones al azar de elementos genéticos desplazables, de forma que se pueden obtener plantas con mutaciones en cualquier gen que se elija. Tenemos a nuestro alcance herramientas poderosas para analizar las funciones genéticas. Aunque hasta ahora sólo se ha caracterizado una pequeña fracción de los genes, es posible asignar las funciones a muchos de ellos (unos 18.000), en base a las semejanzas en las secuencias de genes bien caracterizados, tanto en *Arabidopsis* como en otros organismos.

El genoma de *Arabidopsis* es aún más rico que los de los animales pluricelulares en genes que codifican proteínas reguladoras (**Tabla 22–2**). Algunas de las grandes familias de proteínas reguladoras animales (como la Myb, de proteínas que se unen al DNA) están ampliamente representadas, mientras que parece que otras (como los receptores hormonales nucleares) están ausentes por completo. En los vegetales también encontramos grandes familias de proteínas reguladoras que no tienen homólogos en los animales.

Las proteínas que tienen homólogos tanto en plantas como en animales (como las proteínas homeodominio), tienen muy poco en común con respecto a los genes que regulan o los tipos de decisiones del desarrollo que controlan, y existe muy poca conservación de la secuencia proteica fuera de los dominios que se unen al DNA.

Tabla 22–2 Algunas de las familias principales de proteínas reguladoras de genes en *Arabidopsis, Drosophila, C. elegans* y en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

FAMILIA	NÚMERO DE MIEMBROS DE LA FAMILIA CALCULADOS A PARTIR DEL ANÁLISIS DEL GENOMA			
	Arabidopsis	*Drosophila*	*C. elegans*	Levadura
Myb	190	6	3	10
AP2/EREBP (proteína de unión al elemento de respuesta a Apetala2/etileno)	144	0	0	0
bHLH (hélice-lazo-hélice básica)	139	46	25	8
NAC	109	0	0	0
C2H2 (dedo de Zn)	105	291	139	53
Homeobox	89	103	84	9
Caja MADS	82	2	2	4
bZIP	81	21	25	21
WRKY (dedo de Zn)	72	0	0	0
GARP	56	0	0	0
C2C2 (dedo de Zn)/GATA	104	6	9	10
Receptor hormonal nuclear	0	21	25	0
C6 (dedo de Zn)	0	0	0	52
Total estimado (incluyendo muchos de los no listados arriba)	1533	635	669	209
% de genes en el genoma	5,9	4,5	3,5	3,5

La tabla únicamente recoge las familias que al menos tienen 50 miembros por lo menos en un organismo. (Datos de J.L. Riechmann et al, *Science* 290:2105-2110, 2000. Con autorización de AAAS.)

Arabidopsis se parece a los animales pluricelulares en el hecho de que posee muchos genes para la comunicación celular y la transducción de señales (1900 genes de los 18.000 clasificados), pero los detalles específicos de estos genes son muy distintos, como se ha descrito en el Capítulo 15. Los mecanismos de señalización Wnt, Hedgehog, Notch y TGFβ están ausentes en *Arabidopsis*. En compensación, en las plantas se han desarrollado otras vías peculiares. Los receptores celulares de superficie de la clase tirosina quinasa parece que están completamente ausentes, aunque sí que encontramos muchos de los componentes de vías de señalización dependientes de estos receptores. Por el contrario, son muy abundantes los receptores de la clase serina/treonina quinasa, pero no actúan a través del mismo sistema de mensajeros intracelulares que los correspondientes receptores de los animales. Grandes grupos de genes se dedican a los procesos de desarrollo que son de especial importancia en las plantas: por ejemplo, más de 1000 son para la síntesis y remodelación de la pared celular, y más de 100 para detectar la luz y responder a ella.

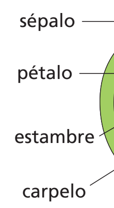
A continuación, se examinará cómo se utilizan los genes de la planta para controlar su desarrollo.

El desarrollo embrionario empieza estableciendo el eje raíz-tallo y luego se detiene dentro de la semilla

La estrategia básica de la reproducción de las plantas con flores se resume brevemente en el **Panel 22–1**. El huevo fecundado o cigoto de una planta superior empieza dividiéndose de forma asimétrica, con lo que se establece la polaridad del futuro embrión. Un producto de esta división es una célula pequeña con un citoplasma denso, que se convertirá en el embrión propiamente dicho. El otro producto es una célula grande, vacuolada, que sigue dividiéndose y forma una estructura llamada *haustorio* o *suspensor*, que de alguna forma podría compararse con el cordón umbilical de los mamíferos. El suspensor conecta el embrión con el tejido nutricio y proporciona una vía de transporte de nutrientes.

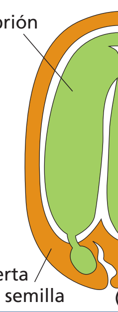
Durante la siguiente etapa del desarrollo, la célula embrionaria diploide prolifera hasta formar una esfera celular que adquiere con rapidez una estructura polarizada. Comprende dos grupos clave de células que proliferan: una en el extremo del suspensor del embrión, que colabora con la célula superior de éste en la producción de la raíz, y otra en el extremo opuesto, que generará el tallo (**Figura 22–114**). De esta forma se establece el eje principal raíz-tallo, que es análogo al eje cabeza-cola de los animales. Al mismo tiempo se empiezan a distinguir

LA FLOR
Las flores, que co
plantas superiore
apicales del vásta
vegetativo. Facto
de duración del
cambio desde el
floral. De este m
las células germi
partir de células
de una línea celu
animales.



La estructura de
pero generalmen
concéntrica cada

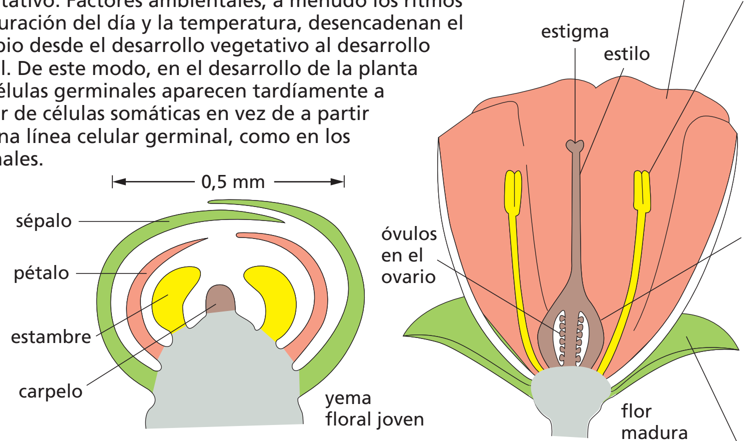
LA SEMILLA
Una semilla cont
embrión latente,
nutricional y una
Al final de su des
el contenido acu
semilla puede de
del 90% al 5%. N
la semilla está pr
un *fruto* cuyos te
de origen mater



Para que el embr
que germinar, un
internos (latencia
agua, la tempera
para la fase temp
endospermo (ma
Por lo general
de la semilla, ase
para la plántula.
suelo, como en la
o permanece ent
casos los cotiledo
Entonces, el m
capacidad para u
un patrón típico
(véase Figura 22-

LA FLOR

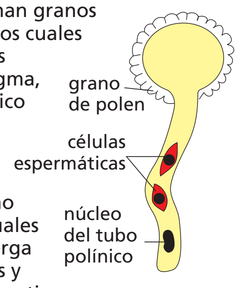
Las flores, que contienen las células reproductoras de las plantas superiores, derivan de los meristemos vegetativos apicales del vástago, donde completan su crecimiento vegetativo. Factores ambientales, a menudo los ritmos de duración del día y la temperatura, desencadenan el cambio desde el desarrollo vegetativo al desarrollo floral. De este modo, en el desarrollo de la planta las células germinales aparecen tardíamente a partir de células somáticas en vez de a partir de una línea celular germinal, como en los animales.



La estructura de la flor es a la vez variada y específica de la especie pero generalmente comprende cuatro grupos de estructuras distribuidas de forma concéntrica cada una de las cuales se pueden considerar hojas modificadas.

Pétalo: estructura distintiva a modo de hoja, habitualmente de colores vivos, que facilita la polinización, por ejemplo mediante la atracción de insectos. Su conjunto constituye la corola.

Estambre: órgano que contiene células que experimentan meiosis y forman granos de polen haploide, cada uno de los cuales contiene dos células espermáticas masculinas. Transferido a un estigma, el polen germina, y el tubo polínico libera dos espermatozoides no móviles al ovario.

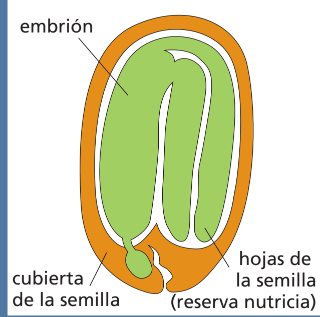


Carpelo: órgano que contiene uno o más ovarios, cada uno de los cuales contiene óvulos. Cada óvulo alberga células que experimentan meiosis y forma un saco embrionario que contiene la célula huevo femenina. En la fecundación, una célula espermática se fusiona con la célula huevo formando el futuro embrión diploide, mientras que el otro se fusiona con dos células del saco embrionario formando el tejido triploide del endospermo.

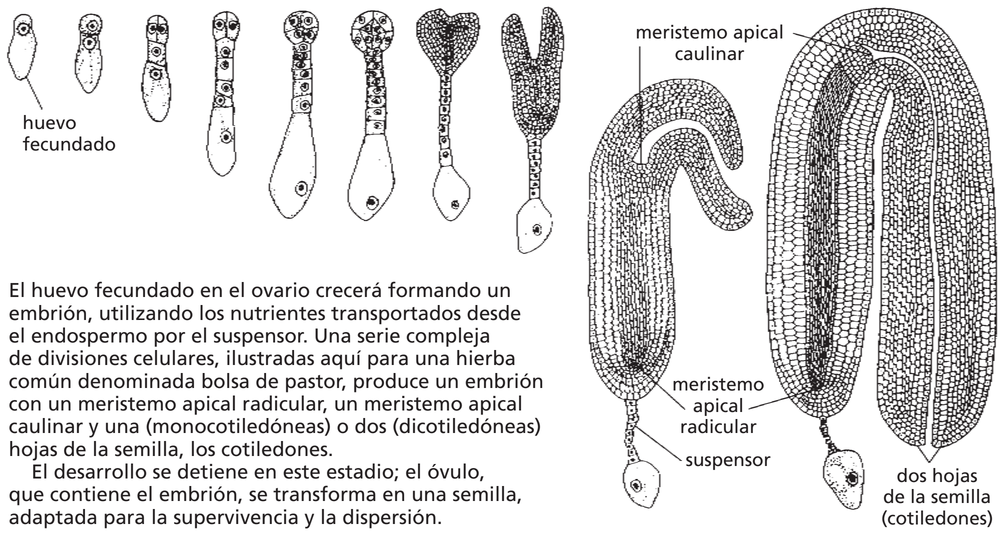
Sépalo: estructura a modo de hoja que forma una cubierta protectora durante el desarrollo temprano de la flor, el cáliz.

LA SEMILLA

Una semilla contiene un embrión latente, una reserva nutricional y una cubierta. Al final de su desarrollo, el contenido acuoso de la semilla puede descender del 90% al 5%. Normalmente la semilla está protegida en un *fruto* cuyos tejidos son de origen materno.



EL EMBRIÓN



El huevo fecundado en el ovario crecerá formando un embrión, utilizando los nutrientes transportados desde el endospermo por el suspensor. Una serie compleja de divisiones celulares, ilustradas aquí para una hierba común denominada bolsa de pastor, produce un embrión con un meristemo apical radicular, un meristemo apical caulinar y una (monocotiledóneas) o dos (dicotiledóneas) hojas de la semilla, los cotiledones.

El desarrollo se detiene en este estadio; el óvulo, que contiene el embrión, se transforma en una semilla, adaptada para la supervivencia y la dispersión.

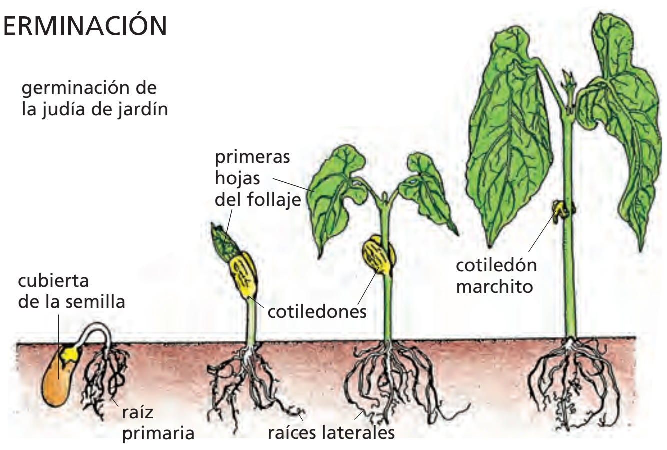
GERMINACIÓN

Para que el embrión reinicie su crecimiento la semilla tiene que germinar, un proceso que depende tanto de factores internos (latencia) como de factores ambientales como el agua, la temperatura y el oxígeno. Las reservas nutricionales para la fase temprana de germinación deben estar o en el endospermo (maíz) o en los cotiledones (guisante y judía).

Por lo general, la raíz primaria es la primera en emerger de la semilla, asegurando un suministro temprano de agua para la plántula. El cotiledón(es) aparece por encima del suelo, como en la judía de jardín que se muestra, o permanece enterrado, como en los guisantes. En ambos casos los cotiledones finalmente se marchitan.

Entonces, el meristemo apical puede desarrollar su capacidad para un crecimiento continuo y produce un patrón típico de nodos, internodos y yemas (véase Figura 22-106).

germinación de la judía de jardín



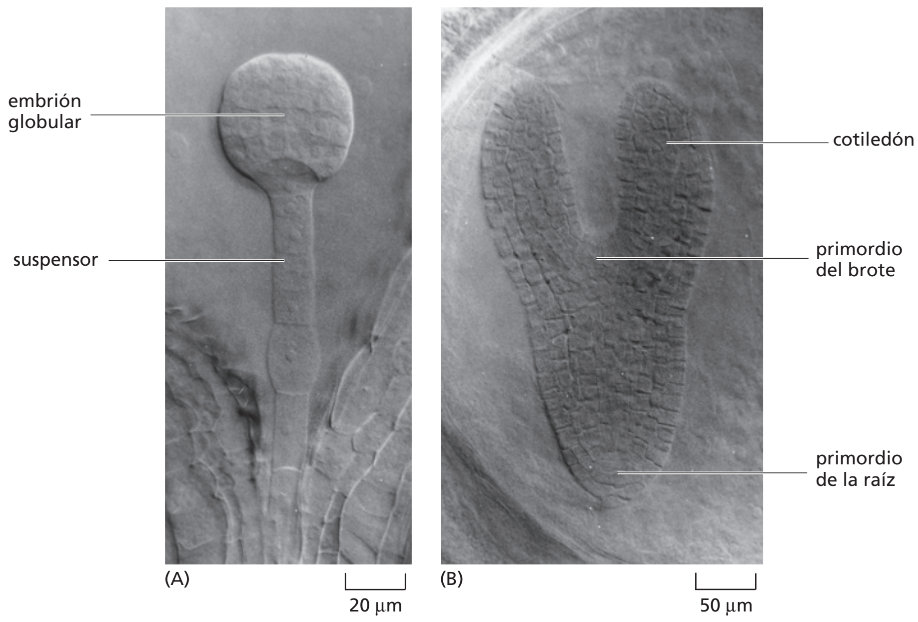


Figura 22–114 Dos estadios de la embriogénesis de *Arabidopsis thaliana*. (De G. Jürgens et al, *Development [Suppl.]* 1:27-38, 1991. Con autorización de The Company of Biologists.)

las futuras *células epidérmicas*, que forman la capa más externa del embrión, así como las futuras *células del parénquima*, que ocupan la mayor parte del interior, y las futuras *células del tejido vascular*, que formarán el núcleo central (**Panel 22–2**). Estos tres grupos de células se pueden comparar con las tres hojas embrionarias del embrión animal. Un poco más tarde, el rudimento del tallo empieza a producir las hojas embrionarias de la semilla o *cotiledones* (una en las monocotiledóneas y dos en las dicotiledóneas). Normalmente el desarrollo se detiene poco después de esta etapa y el embrión se empaqueta en una **semilla** (con una cubierta formada por tejidos de la planta madre), que es una estructura especializada en la dispersión y la supervivencia en condiciones adversas. El embrión en forma de semilla se estabiliza por deshidratación y puede permanecer latente durante largo tiempo, incluso cientos de años. Cuando se rehidrata, la semilla germina y prosigue el desarrollo embrionario.

En *Arabidopsis* se pueden utilizar cribajes genéticos como en *Drosophila* o *C. elegans* para identificar los genes que gobiernan la organización del embrión y agruparlos en categorías según sus fenotipos mutantes homocigotos. Algunos de ellos son necesarios para la formación de la raíz de la plántula, el tallo o el ápice con los cotiledones. Otra clase de genes son los que se requieren en la formación de los tres tipos principales de tejidos: la epidermis, el parénquima y el tejido vascular. Todavía existe otra clase de genes que son los que organizan los cambios de forma celular que darán al embrión y a la planta su forma alargada (**Figura 22–115**).

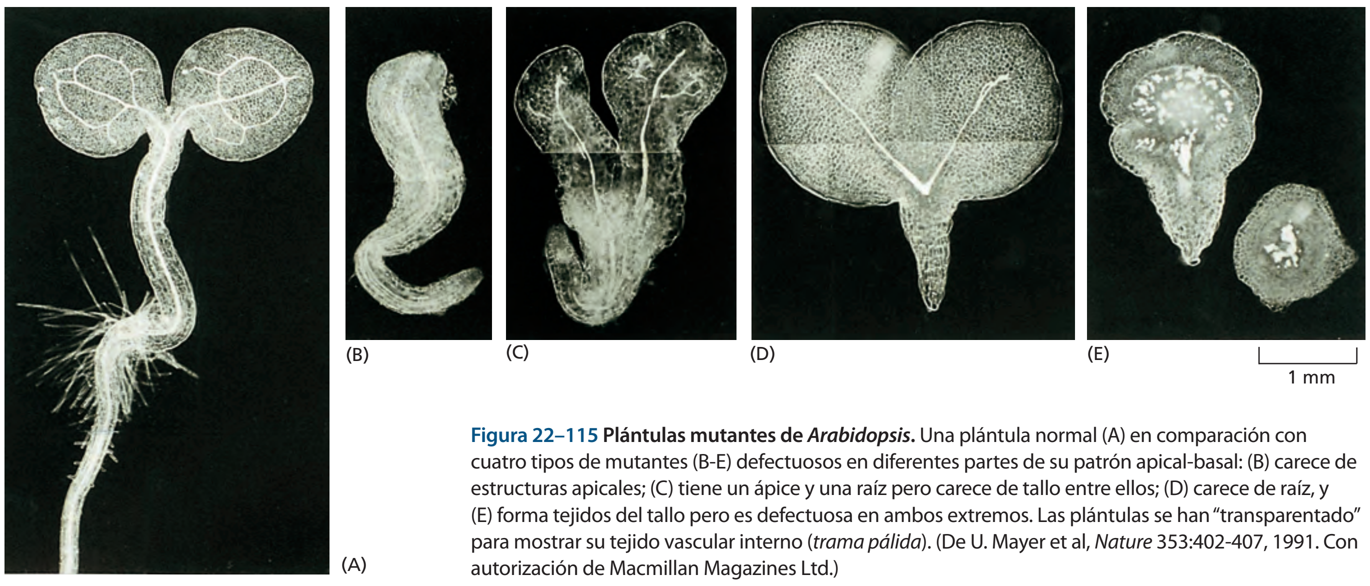


Figura 22–115 Plántulas mutantes de *Arabidopsis*. Una plántula normal (A) en comparación con cuatro tipos de mutantes (B-E) defectuosos en diferentes partes de su patrón apical-basal: (B) carece de estructuras apicales; (C) tiene un ápice y una raíz pero carece de tallo entre ellos; (D) carece de raíz, y (E) forma tejidos del tallo pero es defectuosa en ambos extremos. Las plántulas se han "transparentado" para mostrar su tejido vascular interno (*trama pálida*). (De U. Mayer et al, *Nature* 353:402-407, 1991. Con autorización de Macmillan Magazines Ltd.)

Las partes de la planta se generan secuencialmente por meristemos

De forma general, el embrión de un insecto o de un vertebrado no es más que un modelo rudimentario en miniatura de lo que será el futuro organismo; los detalles de su estructura corporal se van incorporando a medida que crece. El embrión de una planta se convierte en adulto de un modo distinto: las partes de la planta adulta se generan de forma secuencial por grupos de células que proliferan dando lugar a estructuras adicionales en la periferia de la planta. Estos grupos de células tan importantes se llaman **meristemos apicales** (véase la Figura 22–111). Cada meristemo consiste en una población autorrenovable de células madre. A medida que van dividiéndose van dejando un rastro de células descendientes que son desplazadas de la región meristemática, crecen y finalmente se diferencian. Aunque los meristemos apicales de la raíz y del tallo generan todas las variedades básicas de células que se necesitan para formar hojas, raíces y tallos, muchas células que se encuentran fuera de los meristemos también conservan la capacidad de proliferar y el potencial meristemático. De esta forma, por ejemplo los árboles y otras plantas perennes son capaces de aumentar el grosor de sus tallos y raíces año tras año y pueden producir nuevos tallos a partir de regiones durmientes cuando la planta sufre algún daño.

Los rudimentos de los meristemos apicales de la raíz y del tallo ya están determinados en el embrión. En cuanto se rompe la cubierta de la semilla durante la germinación, tiene lugar un crecimiento espectacular de las células no meristemáticas que en primer lugar conduce a la emergencia de la raíz, que arraiga inmediatamente, y luego del tallo (**Figura 22–116**). Esto se acompaña de divisiones celulares rápidas y continuas en los meristemos. Por ejemplo, en el meristemo apical de una raíz de maíz, las células se dividen cada 12 horas produciéndose 5×10^5 células cada día. La raíz y el tallo en rápido crecimiento sondean el medio: la raíz incrementa la capacidad de absorción de agua y sales minerales del suelo; el tallo, la capacidad de fotosíntesis (véase el Panel 22–1).



Figura 22–116 Una plántula de *Arabidopsis*. Los objetos *marrones* que aparecen a la derecha de la plántula joven son las dos valvas de la cubierta desechada de la semilla. (Cortesía de Catherine Duckett.)

El desarrollo de la plántula depende de señales ambientales

A partir de la germinación, el curso del desarrollo de la planta está muy influenciado por señales del entorno. El tallo tiene que abrirse camino rápidamente a través del suelo y abrir sus cotiledones y sólo puede empezar a llevar a cabo la fotosíntesis cuando ha salido a la luz. La temporización de esta transición desde la germinación subterránea hasta el crecimiento bajo la luz no se programa en términos genéticos porque no se puede predecir la profundidad a la cual se encontrará enterrada la semilla. El cambio en el desarrollo está controlado por la luz, que entre otros efectos, actúa sobre la plántula inhibiendo la producción de un tipo de reguladores del crecimiento llamados *brasinosteroides*, descritos en el Capítulo 15. Las mutaciones en los genes que se requieren en la producción o la recepción de la señal brasinosteroide son la causa de que el tallo de la plántula adquiera el color verde, haga más lenta su elongación y abra sus cotiledones de forma prematura cuando todavía se encuentra a oscuras.

Señales hormonales de largo alcance coordinan las fases del desarrollo en distintas partes de la planta

Las diferentes partes de la planta perciben distintos ambientes y reaccionan a ellos individualmente mediante cambios en su modo de desarrollo. No obstante, la planta tiene que continuar funcionando como un todo. Este hecho implica que las elecciones durante el desarrollo y los cambios que ocurren en una parte de la planta influyen en las decisiones de las otras partes. Tienen que existir señales de largo alcance que hagan posible esta coordinación.

Por ejemplo, como muy bien saben los jardineros, se puede estimular el crecimiento lateral cortando el ápice de una rama: la eliminación del crecimiento del meristemo apical exonera los meristemos axilares inactivos de su inhibición y les permite formar nuevas ramas. En este caso, se ha identificado la señal de largo alcance del meristemo apical o por lo menos un componente clave. Se trata de una auxina, un miembro de una de las clases de **reguladores del crecimiento de las plantas** (a veces toman el nombre de *hormonas vegetales*), todos ellas de gran influencia en el desarrollo de las plantas. Otras clases conocidas in-

LOS TRES SISTEMAS HISTOLÓGICOS

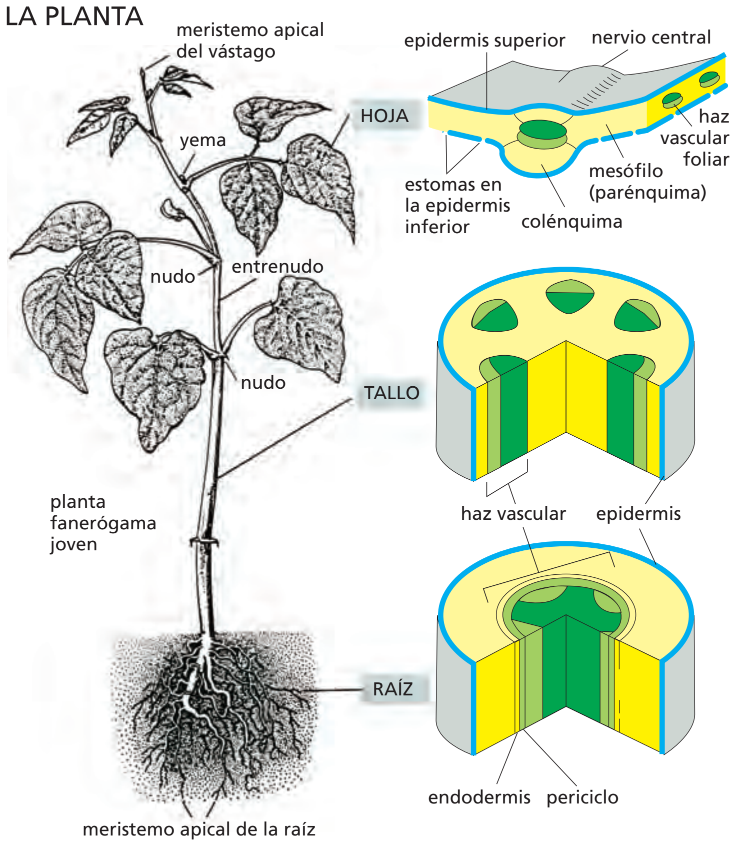
La división celular, el crecimiento y la diferenciación generan sistemas histológicos con funciones especializadas

TEJIDO EPIDÉRMICO (▬): Es la capa externa protectora, que está en contacto con el medio. Facilita la captación de agua e iones en las raíces y regula el intercambio de gases en hojas y tallos.

TEJIDO VASCULAR: Floema (▬) y xilema (▬), juntos, forman un haz vascular continuo por toda la planta. Este tejido conduce agua y solutos entre órganos y también constituye un soporte mecánico.

TEJIDO FUNDAMENTAL (▬): También denominado parénquima, este tejido de empaquetamiento y de soporte, ocupa la mayor parte de la masa de la planta joven. También actúa como fábrica y como almacén de alimento.

LA PLANTA



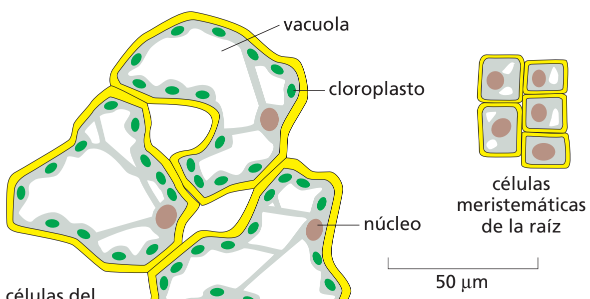
La planta fanerógama joven de la *derecha* está formada por tres tipos principales de órganos: hojas, tallos y raíces. Cada órgano vegetal está formado, a su vez, por tres sistemas histológicos: el fundamental o parénquima (▬), el epidérmico (▬) y el vascular (▬).

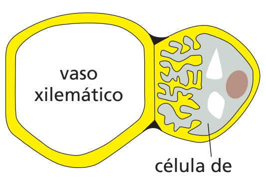
Los tres sistema histológicos derivan en último término de la actividad celular proliferativa de los meristemos apicales del vástago y de la raíz, y cada uno de ellos contiene un número relativamente pequeño de tipos celulares especializados. Estos tres sistemas histológicos comunes, y sus células, se describen en este panel.

TEJIDO FUNDAMENTAL

El sistema histológico fundamental contiene tres tipos principales de células denominados parénquima, colénquima y esclerénquima.

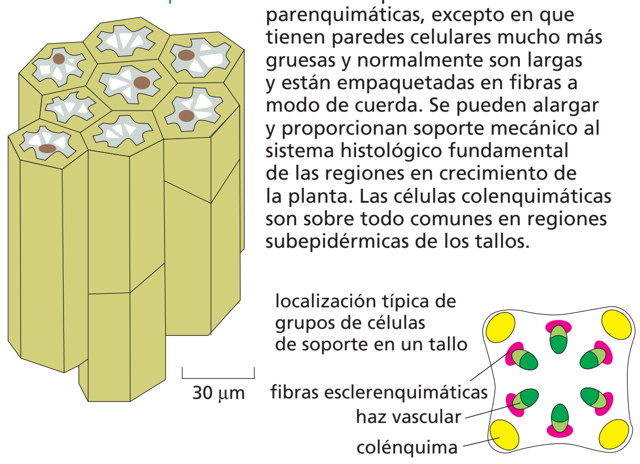
Las células parenquimáticas se encuentran en todos los sistemas histológicos. Son células vivas, por lo general capaces de divisiones adicionales, y tienen una fina pared celular primaria. Estas células tienen funciones muy diversas. Las células meristemáticas apicales y laterales de los vástagos y de las raíces proporcionan nuevas células necesarias para el crecimiento. La producción y almacén de alimentos tienen lugar en las células fotosintéticas de la hoja y del tallo (denominadas células del mesófilo); las células parenquimáticas de reserva forman la carne de muchos frutos y hortalizas. Dada su capacidad proliferativa, las células parenquimáticas hacen de células madre para el cierre de heridas y la regeneración.



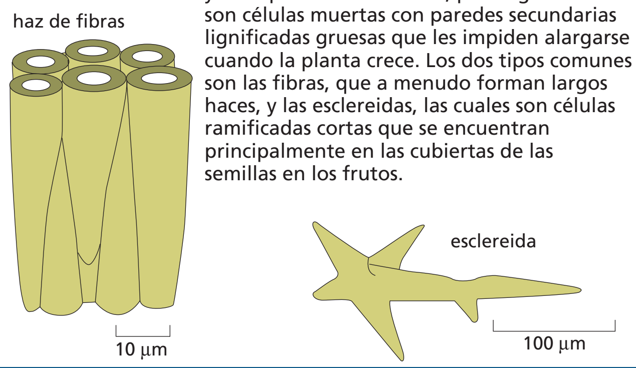


Una célula de transferencia, forma especializada de célula parenquimática, se distingue fácilmente por los elaborados pliegues de su pared primaria. El incremento del área de la membrana plasmática bajo estas paredes facilita el transporte rápido de solutos hacia y desde el sistema vascular.

El colénquima son células vivas parecidas a las células parenquimáticas, excepto en que tienen paredes celulares mucho más gruesas y normalmente son largas y están empaquetadas en fibras a modo de cuerda. Se pueden alargar y proporcionan soporte mecánico al sistema histológico fundamental de las regiones en crecimiento de la planta. Las células colenquimáticas son sobre todo comunes en regiones subepidérmicas de los tallos.



Como el colénquima, el esclerénquima, tiene funciones de refuerzo y de soporte. No obstante, por lo general son células muertas con paredes secundarias lignificadas gruesas que les impiden alargarse cuando la planta crece. Los dos tipos comunes son las fibras, que a menudo forman largos haces, y las esclereidas, las cuales son células ramificadas cortas que se encuentran principalmente en las cubiertas de las semillas en los frutos.



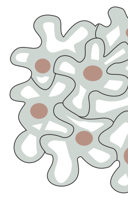
TEJIDO EPID

La epidermis es l
externa del cuer
la epidermis tam
los estomas y tric

Epidermis



La epidermis (no
una sola capa de
tallo, la hoja y la
Las células son vi
primarias gruesa
su superficie exte
especial con una
Las células están
de diferentes ma



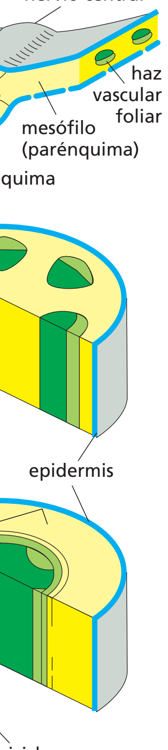
TEJIDO VASC

El floema y el xile
sistema o haz vas
de la planta. En l
normalmente se
celulares forman
Tanto el floema c
complejos. Sus el
asocian con célu
los mantienen e i
con ellos. Ademá
colénquima y del

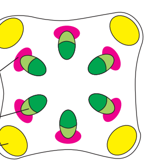
Floema

célula
acomp
área
visión externa
elemento de v

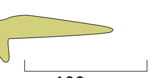
El floema está i
planta. Las célu
tubos denomina
cribosos son cél
paredes termina
y modificados (
plasmática, per
por tanto su ma
acompañantes.
del transporte a
elementos de tu



las células
o en que
mucho más
son largas
n fibras a
den alargar
mecánico al
miento de
enquimáticas
en regiones
llos.



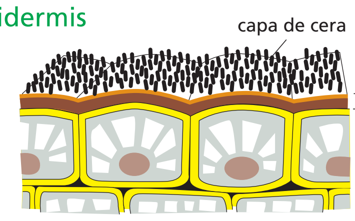
iones de refuerzo
or lo general
edes secundarias
mpiden alargarse
los tipos comunes
forman largos
uales son células
cuentran
tas de las



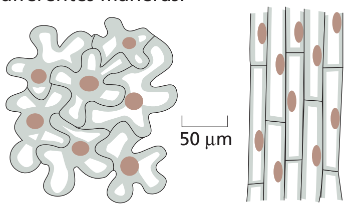
TEJIDO EPIDÉRMICO

La epidermis es la cubierta protectora primaria externa del cuerpo de la planta. Las células de la epidermis también están modificadas formando los estomas y tricomas de diversos tipos.

Epidermis



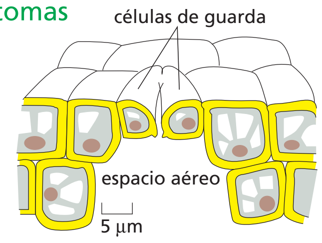
La epidermis (normalmente del grosor de una sola capa de células) recubre todo el tallo, la hoja y la raíz de la planta joven. Las células son vivas, tienen paredes primarias gruesas y están cubiertas en su superficie externa por una cutícula especial con una capa externa de cera. Las células están íntimamente encajadas de diferentes maneras.



epidermis externa de una hoja

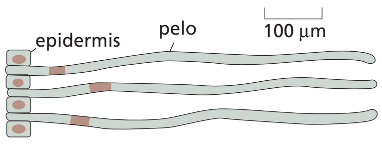
epidermis de un tallo

Estomas

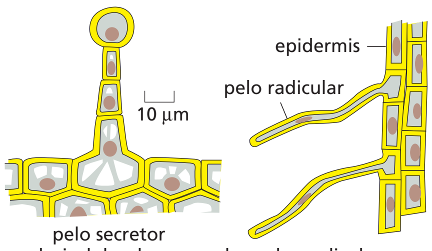


Los estomas son aberturas en la epidermis, principalmente en la superficie inferior de la hoja, que regulan el intercambio gaseoso en la planta. Están formados por dos células epidérmicas especializadas llamadas *células de guarda*, que regulan el diámetro del poro. Los estomas están distribuidos en distintos patrones específicos de especie en cada epidermis.

Los pelos (o tricomas) son apéndices derivados de células epidérmicas. Existen en formas muy variables y normalmente se encuentran en todas las partes de la planta. Los pelos intervienen en la protección, absorción y secreción; por ejemplo,



los pelos jóvenes unicelulares de la epidermis de la semilla del algodón. Cuando crecen, sus paredes se engruesan de forma secundaria con celulosa y forman las fibras de algodón.

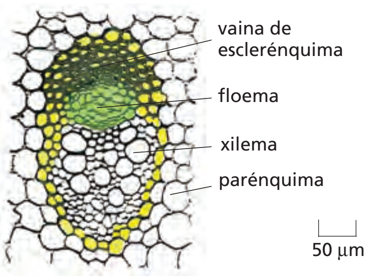


pelo secretor pluricelular de una hoja de geranio

los pelos radiculares unicelulares tienen una función importante en la absorción de agua e iones

Haces vasculares

Las raíces tienen un solo haz vascular, pero los tallos tienen varios haces. Están distribuidos con una estricta simetría radial en las dicotiledóneas, pero dispersos con una mayor irregularidad en las monocotiledóneas.

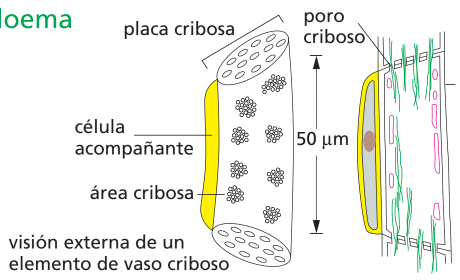


haz vascular típico de un tallo joven de botón de oro

TEJIDO VASCULAR

El floema y el xilema forman, juntos, un sistema o haz vascular continuo a través de la planta. En las plantas jóvenes normalmente se asocian con otros tipos celulares formando los *haces vasculares*. Tanto el floema como el xilema son tejidos complejos. Sus elementos conductores se asocian con células parenquimáticas que los mantienen e intercambian materiales con ellos. Además, grupos de células del colénquima y del esclerénquima proporcionan soporte mecánico.

Floema



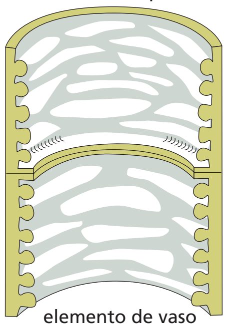
visión externa de un elemento de vaso criboso

sección de un elemento de tubo criboso

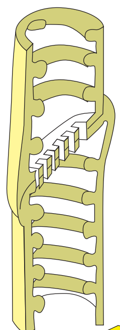
El floema está implicado en el transporte de los solutos orgánicos por la planta. Las células conductoras principales (vasos) se alinean formando tubos denominados *vasos cribosos*. Los elementos maduros de los tubos cribosos son células vivas interconectadas mediante perforaciones en sus paredes terminales formadas a partir de plasmodesmos ampliados y modificados (placas cribosas). Estas células mantienen su membrana plasmática, pero han perdido su núcleo y gran parte de su citoplasma; por tanto su mantenimiento depende de su asociación con células acompañantes. Estas *células acompañantes* tienen la función adicional del transporte activo de moléculas nutritivas solubles hacia y desde los elementos de tubo criboso a través de áreas de poros cribosos en la pared.

Xilema

El xilema conduce agua e iones en disolución por la planta. Las células conductoras principales son los elementos de vaso mostrados, los cuales en su madurez son células muertas, que carecen de membrana plasmática. La pared celular se ha engrosado secundariamente y se ha lignificado con fuerza. Como se muestra más abajo, su pared terminal ha sido eliminada casi en su totalidad, favoreciendo la formación de tubos muy largos y continuos.

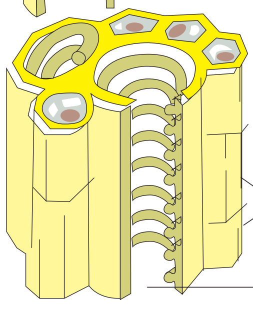


elemento de vaso grande maduro



elemento de vaso pequeño en el extremo de la raíz

Los elementos del vaso están íntimamente asociados con células parenquimáticas del xilema, que transportan de forma activa solutos seleccionados hacia y desde los elementos a través de la membrana plasmática del parénquima.



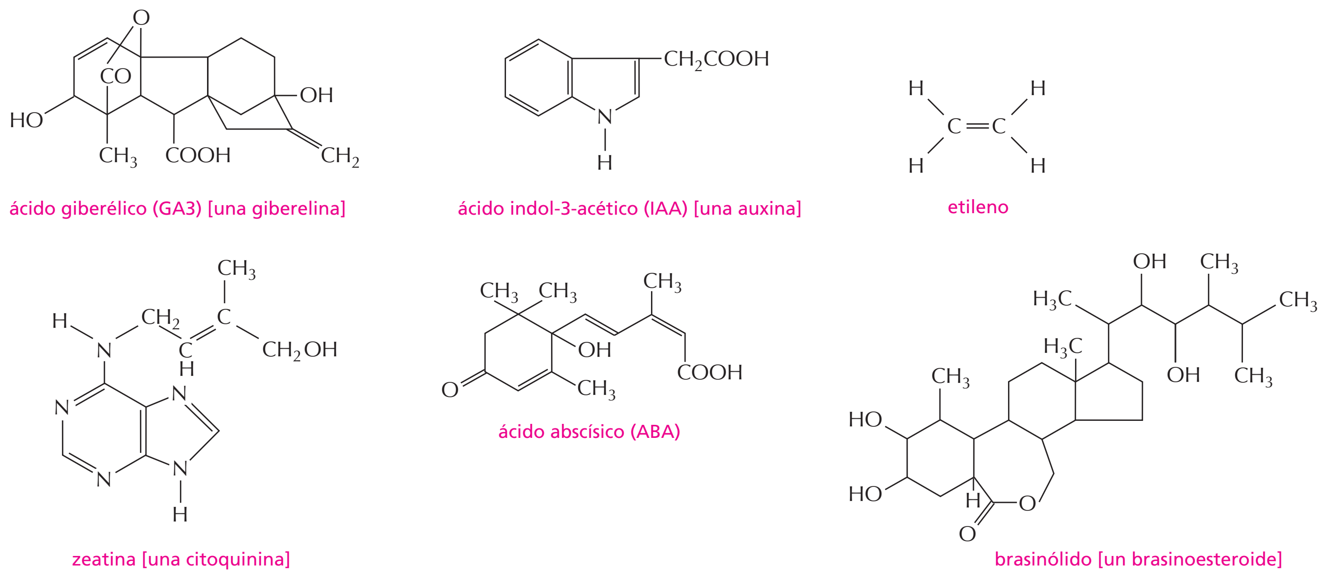


Figura 22–117 Reguladores del crecimiento vegetal. Se muestra la fórmula de una molécula funcional representativa de cada uno de los seis grupos de reguladores del crecimiento vegetal.

cluyen las *giberelinas*, las *citoquininas*, el *ácido abscísico*, el gas *etileno* y los *brasinosteroides*. Como se observa en la **Figura 22–117**, todas ellas son moléculas de pequeño tamaño que penetran fácilmente las paredes celulares. La mayoría de las plantas pueden sintetizarlas y actúan de forma local o son transportadas a distancia hasta las células diana. La auxina, por ejemplo, se transporta de célula a célula a una velocidad de aproximadamente 1 cm por hora, desde el ápice de una rama hasta su base. Cada uno de los reguladores del crecimiento tiene varios efectos, modulados por otros reguladores, así como por las condiciones ambientales y el estado nutricional. Así, la auxina activa por sí sola la formación de la raíz, pero junto con la giberelina activa el crecimiento del tallo, con la citoquinina suprime el crecimiento de ramas laterales y con el etileno puede estimular el crecimiento lateral de la raíz. Como veremos más adelante, es especialmente importante el hecho de que la auxina también controla los modelos detallados de especialización celular a escala microscópica en el meristemo apical. Los receptores que reconocen algunos de estos reguladores se han explicado en el Capítulo 15.

La formación de cada nueva estructura depende de la división orientada y de la expansión celular

Las células vegetales, encerradas en sus paredes celulares, no pueden arrastrarse ni mezclarse durante el proceso de crecimiento de la planta, pero en cambio pueden dividirse, hincharse, alargarse y doblarse. La morfogénesis de una planta en desarrollo depende, por lo tanto, de divisiones celulares ordenadas, seguidas de expansiones orientadas. Por ejemplo, la mayoría de las células producidas en el meristemo apical de la raíz pasan por tres fases distintas: división, crecimiento (elongación) y diferenciación. Estas tres etapas, que se solapan en espacio y tiempo, tienen como resultado la arquitectura característica y distintiva del ápice radical. Aunque a menudo el proceso de diferenciación celular empieza cuando una célula todavía se está alargando, es comparativamente fácil distinguir tres zonas en el ápice de la raíz: la zona de división celular, la de elongación celular orientada (que es responsable en última instancia del crecimiento de la raíz en longitud) y la de diferenciación celular (**Figura 22–118**).

En la fase de expansión controlada que por lo general sigue a la división celular, las células hijas pueden aumentar su volumen unas 50 veces o más. Esta expansión está dirigida por una presión de turgencia de tipo osmótico que presiona la pared celular hacia afuera, en la dirección que determina la orientación de las fibrillas de celulosa de la pared, las cuales constriñen la expansión a lo largo de un eje (véase la Figura 19–73). A su vez, la orientación de la celulosa es aparentemente controlada por la orientación de series de microtúbulos del interior de la membrana plasmática, los cuales parece que guían la deposición de la celulosa (tal como se ha explicado en el Capítulo 19). Estas orientaciones pueden cambiar

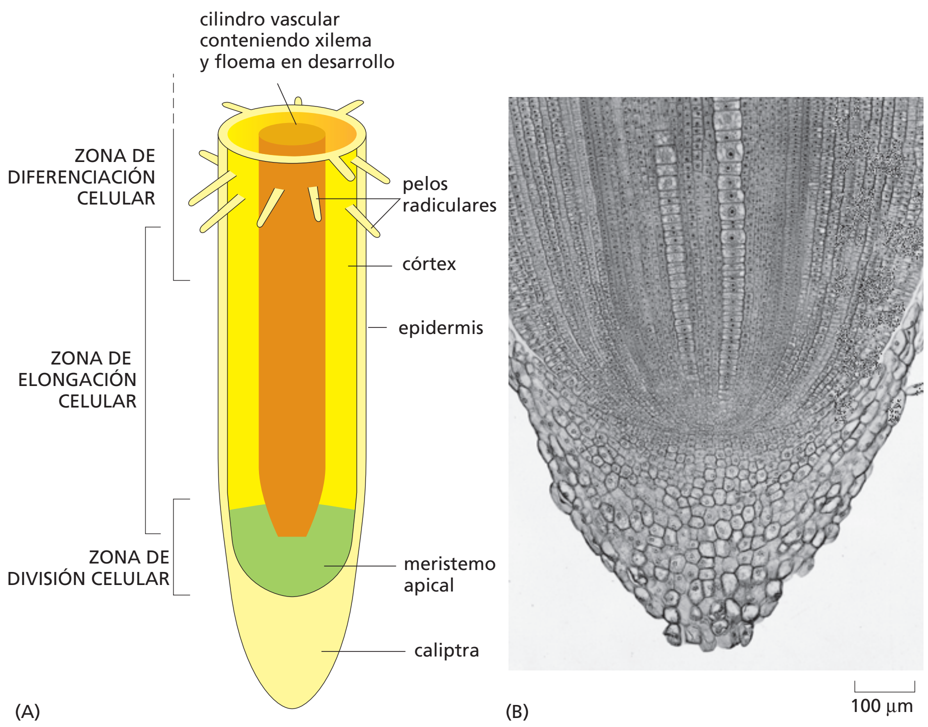


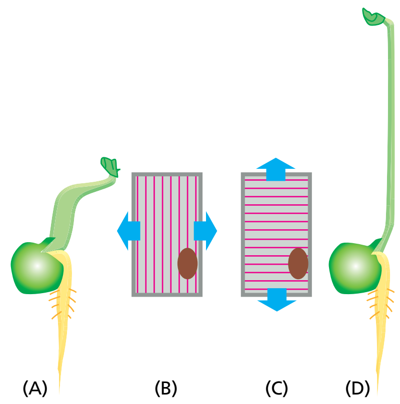
Figura 22–118 Punta de raíz en crecimiento. (A) Organización de los 2 mm finales de la punta de la raíz en crecimiento. Se indican de forma aproximada las zonas en las que las células se dividen, alargan y diferencian. (B) Meristemo apical y caliptra en la punta de raíz del cereal, mostrando las filas ordenadas de células que se han producido. (B, de R.F. Evert, Biology of the Plants, 4.ª ed. New York: Worth, 1986.)

rapidez mediante reguladores del crecimiento como el etileno y el ácido giberélico (**Figura 22–119**), pero los mecanismos moleculares que rigen estos importantes reordenamientos todavía se desconocen.

Cada módulo de la planta crece a partir de un grupo de primordios microscópicos del meristemo

Los meristemos apicales se autoperpetúan: en una planta perenne continúan de forma indefinida con sus funciones, mientras sobreviva la planta, y son responsables de su continuo crecimiento y desarrollo. Pero los meristemos apicales también dan lugar a un segundo tipo de crecimiento, de desarrollo estrictamente limitado, que culmina en la formación de una estructura, como una hoja o una flor, de tamaño y forma determinados, y de vida corta. Así, un tallo vegetativo (no florífero) se alarga y su meristemo apical deja tras de sí una secuencia ordenada de *nudos*, donde crecen las hojas, y de *entrenudos* (segmentos de tallo). De esta forma, la continua actividad del meristemo produce un número cada vez mayor de módulos similares, que consta cada uno de tallo, hoja y yema (véase la Figura 22–111). Los módulos están conectados entre sí por tejido de soporte y conductor; los módulos sucesivos están colocados guardando unos con otros una relación precisa, hecho que da lugar a un patrón estructural repetitivo. Este modo iterativo de desarrollo es característico de las plantas y se puede observar en muchas otras estructuras además del sistema tallo-hojas (**Figura 22–120**).

Figura 22–119 Diferentes efectos de los reguladores del crecimiento vegetal: etileno y ácido giberélico. Estos reguladores ejercen efectos rápidos y opuestos sobre la orientación de la trama microtubular cortical de las células de brotes jóvenes de guisante. Una célula típica en una planta tratada con etileno (B) muestra una orientación longitudinal neta de la trama microtubular, mientras que una célula típica de una planta tratada con ácido giberélico (C) muestra una orientación neta transversal. Se van depositando nuevas fibrillas de celulosa, paralelamente a los microtúbulos. Esto tiene influencia sobre el sentido de la expansión celular, por lo que el ácido giberélico y el etileno fomentan el crecimiento en sentidos opuestos: plántulas tratadas con etileno desarrollarán brotes cortos y gruesos (A), mientras que plántulas tratadas con ácido giberélico desarrollarán brotes largos y delgados (D).



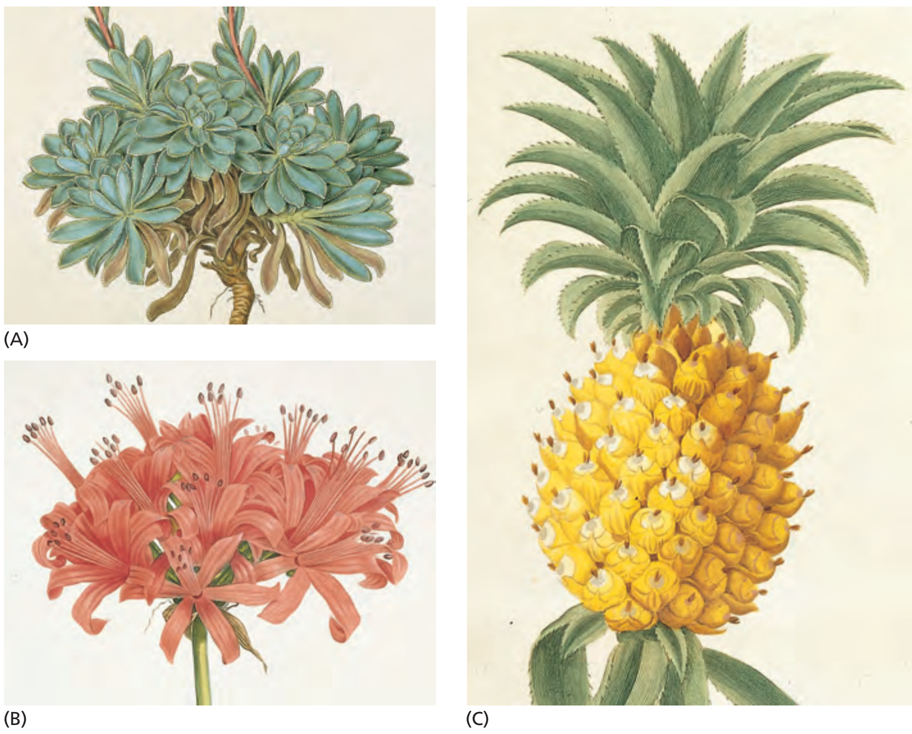


Figura 22–120 Patrón repetitivo en las plantas. La colocación cuidadosa de módulos sucesivos a partir de un solo meristemo apical produce estos patrones elaborados pero regulares en hojas (A), flores (B) y frutos (C). (A, de John Sibthorp, Flora Graeca. London: R.Taylor, 1806-1840; B, de Pierre Joseph Redouté, Les Liliacées. Paris: chez l'Auteur, 1807; C, de Christopher Jacob Trew, Uitgezochte planten. Amsterdam: Jan Christiaan Sepp, 1771; todas las ilustraciones por cortesía de la Fundación John Innes.)

Aunque el módulo final puede ser grande, su organización, al igual que la del embrión animal, está esbozada desde el principio a escala microscópica. En el ápice del tallo, en un espacio de un milímetro o menos, encontramos una pequeña cúpula rodeada de unas protuberancias muy aparentes en varias fases de elongación (**Figura 22–121**). La cúpula central es el meristemo propiamente dicho; cada una de las protuberancias es el primordio de una hoja. Por lo tanto, esta pequeña región contiene ya los rudimentos de varios módulos completos. Por medio de un programa bien definido de proliferación y elongación celular, cada primordio de hoja y las células adyacentes formarán una hoja, un nudo y un entrenudo. Mientras tanto, el meristemo apical dará lugar a un nuevo primordio foliar, de forma que se generan más y más módulos en una sucesión interminable. Por lo tanto, la organización en serie de los módulos de la planta está controlada por los procesos que tienen lugar en el ápice del tallo.

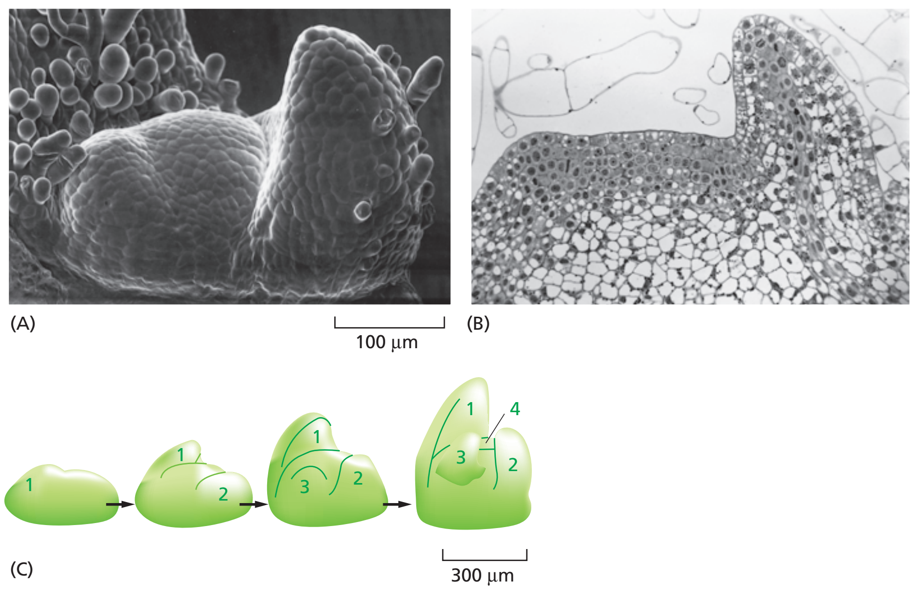


Figura 22–121 Ápice de un brote joven de una planta de tabaco. (A) Se muestra mediante una electromicrografía de barrido, el ápice del brote con dos primordios foliares emergiendo secuencialmente; en este caso, dos abombamientos a cada lado del domo del meristemo apical. (B) Corte fino de un ápice parecido mostrando que el primordio foliar más joven surge de un grupo pequeño de células (alrededor de 100) en las cuatro o cinco capas externas de células. (C) Esquema en el que se representa la aparición secuencial de los primordios foliares a distancias cortas y precozmente en el desarrollo del brote. El crecimiento del ápice formará al final internudos que separarán las hojas de forma ordenada a lo largo del tallo (véase Figura 22–111). (A y B de R.S. Poethig e I.M. Sussex, *Planta* 165: 158-169, 1985. Con autorización de Springer-Verlag.)

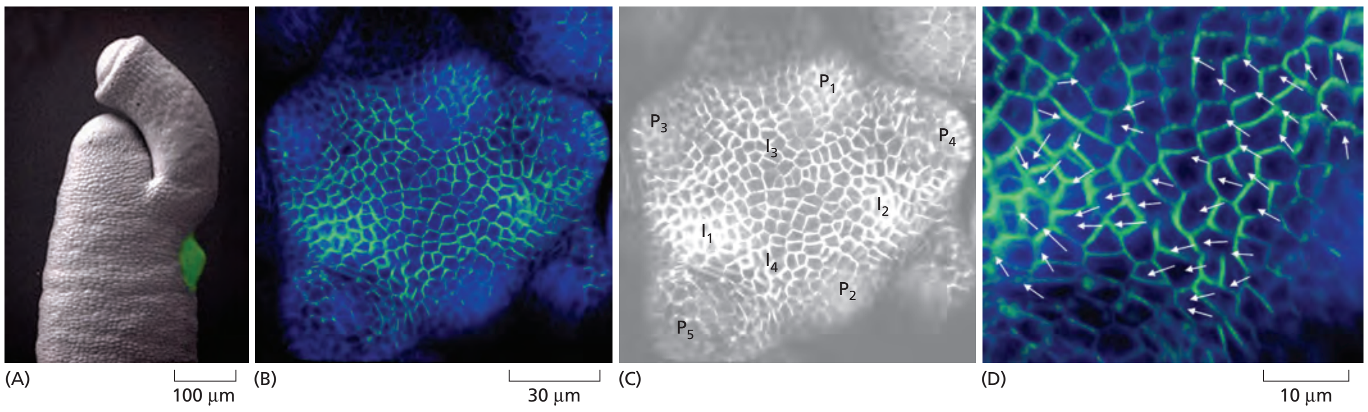


Figura 22–122 Control de la formación del patrón en un meristemo por auxina y Pin1. (A) A un lado de un meristemo mutante, similar en su fenotipo al mutante *Pin1,* puesto que le falta la proteína requerida para el control del transporte de la auxina, se le ha aplicado una microgota que contiene auxina (*mancha verde*). La auxina ha inducido la formación de un primordio floral lateral. (B) Distribución del transportador de la auxina Pin1 en un meristemo. Un meristemo apical de *Arabidopsis* visto desde arriba con microscopía de fluorescencia, en el que se revela la distribución de Pin1 unida a GFP en el estrato superficial de las células. (C) La misma imagen marcada para mostrar la localización de los primordios ya formados (siendo P_1 el más reciente y P_4 el más maduro) y de los primordios más incipientes (siendo I_1 el más temprano en formarse e I_4 el más tardío). (D) Detalle ampliado de (B), muestra la distribución asimétrica de Pin1 en las membranas de las células individuales, dirigiendo la auxina hacia el lugar de un primordio incipiente. Las *flechas* indican el sentido del transporte. A medida que los primordios se establecen, la cantidad de Pin1 en su estrato superficial decrece, en parte porque la distribución de las proteínas transportadoras hace que la auxina sea bombeada hacia los tejidos vasculares inferiores en desarrollo. La estructura detallada de muchos otros tejidos vegetales en desarrollo también está controlada por patrones complejos del transporte de auxina. (A, de Reinhardt et al., *Nature* 426:255-260, 2003. Con autorización de Macmillan Publishers Ltd; B-D, de M.G. Heisler et al., *Curr. Biol.* 15:1899-1911, 2005. Con autorización de Elsevier.)

El transporte polarizado de auxina controla el patrón de los primordios en el meristemo

¿Qué señales actúan en la pequeña región apical determinando la organización de los primordios? ¿Cómo se generan estas señales en el patrón apropiado? Algunos indicios provienen de la mutación de un gen llamado *Pin1*, cuya pérdida impide la formación de los primordios foliares, pero permite que el tallo principal siga creciendo; de ello resulta una estructura desnuda, larga y delgada, en forma de alfiler, con un meristemo apical en el ápice. La proteína Pin1 es un transportador de auxina, dirigiendo el flujo a través de la membrana plasmática hacia el espacio extracelular. Este hecho sugiere que el mutante carece de primordios foliares a causa de una distribución errónea de la auxina. Como es lógico, una microgota de auxina aplicada a un lado del meristemo apical de un mutante *Pin1,* u otro similar, induce a la formación de un primordio foliar o florífero en el lugar donde se haya aplicado la auxina (**Figura 22–122**A).

En el tejido vivo se puede observar la distribución de la proteína transportadora Pin1 mediante la creación de una planta transgénica (normal en los demás aspectos) que expresa una forma de Pin1 marcada con la proteína fluorescente Green (Figura 22–122B–D). En la capa más externa de células meristemáticas, la cantidad de Pin1 varía de una región a otra según un patrón correlacionado con el de los primordios en desarrollo, porque *Pin1* es un gen regulado por auxina. Además, la proteína Pin1 se distribuye de forma asimétrica en las membranas de las células individuales de forma que bombean más auxina en un lado que en el otro, y generan un máximo local que señala dónde tienen que empezar a formarse los primordios. El bombeo es más intenso en el lado en que la concentración de auxina en las células vecinas es máxima, hecho que sugiere una retroalimentación positiva en la acumulación de auxina. Los modelos generados por ordenador muestran que una retroalimentación positiva de este tipo puede amplificar la asimetría y generar un patrón de máximos y mínimos de concentración de auxina similar al observado. El transporte localizado de la auxina en dirección perpendicular respecto a la capa externa de las células meristemáticas y las bandas de tejido vascular en desarrollo, que se encuentran debajo, contribuye a la asimetría. A medida que las células proliferan y el tejido crece, se ajusta la distribución de Pin1 y de auxina, produciendo nuevos máximos y nuevos primordios laterales en una sucesión regular.

Las variaciones sobre este tema básico repetitivo dan lugar a arquitecturas más complejas, que incluyen estructuras como zarcillos, ramas y flores. Así, activando diferentes grupos de genes en el ápice del tallo, la planta produce diferentes tipos de primordios en diferentes patrones espaciales.

La señalización celular mantiene el meristemo

La cuestión central de todos estos fenómenos es cómo el meristemo apical se mantiene a sí mismo. Las células meristemáticas pueden continuar proliferando durante semanas, años o incluso siglos mientras la planta crece, reemplazándose al tiempo que la progenie que se genera de manera continua va diferenciándose. Con todo, el tamaño del agregado celular que constituye el meristemo se mantiene casi constante (p. ej., en *Arabidopsis* es de 100 células).

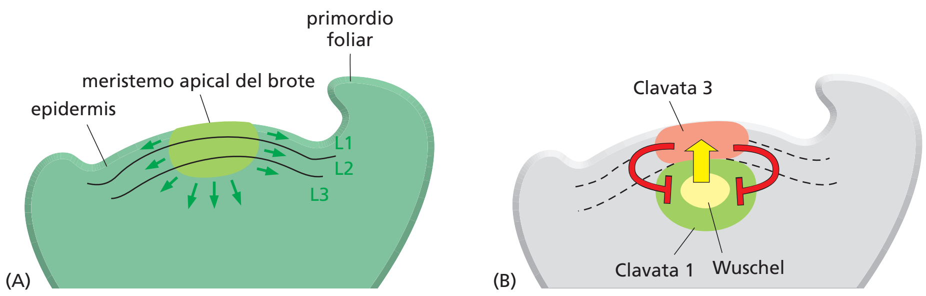


Figura 22–123 Bucles de retroalimentación que al parecer mantienen el meristemo apical del brote. (A) Distribución de las capas celulares que constituyen el meristemo apical del brote. (B) Patrón de comunicación intercelular que mantiene el meristemo. Una sobreexpresión artificial de *Wuschel* en la región L3 produce un aumento del número de células en las capas L1 y L2 que se comportan como meristemáticas y expresan *Clavata3;* una sobreexpresión artificial de *Clavata3* en las capas L1 y L2 provoca una reducción de la expresión de *Wuschel* en la región inferior de L3 y una disminución del número de células meristemáticas. *Clavata3* codifica una pequeña proteína señal, mientras que *Clavata1* codifica su receptor, una proteína quinasa transmembrana. *Wuschel*, que se expresa en la parte central de la región en la que se expresa el receptor Clavata1, codifica una proteína reguladora de genes de la clase homeodominio. Se cree que el tamaño del meristemo se controla por un balance autorregulado entre una señal estimuladora de corto alcance producida por las células que expresan Wuschel (*flecha amarilla*) y una señal inhibidora de largo alcance liberada por Clavata3 (*barras rojas*).

Pueden surgir nuevos meristemos a medida que la planta se ramifica, pero también conservan el mismo tamaño.

Mediante cribados genéticos, se han identificado genes que intervienen en el mantenimiento del meristemo. Por ejemplo, las mutaciones que afectan al gen *Wuschel*, que codifica una proteína homeodominio, transforman el meristemo apical en un tejido no meristemático y, como consecuencia de ello, la plántula no puede brotar. Por el contrario, mutaciones en el grupo de genes *Clavata*, que codifican componentes de una vía de señalización célula-célula (véase la Figura 15–83), hacen que el meristemo sea anormalmente grande. Estos genes se expresan en diferentes capas de células de la región meristemática (**Figura 22–123**A). Las dos capas de células más superficiales, llamadas L1 y L2, junto con la parte superior de la capa L3, contienen las células del meristemo propiamente dicho, es decir, las células madre, capaces de dividirse de forma indefinida y dar lugar a las futuras partes de la planta. Las células meristemáticas de las capas L1 y L2 expresan Clavata3, una pequeña proteína señal de secreción. Justo debajo, en la capa L3, encontramos un agregado de células que expresan Clavata1 (el receptor de Clavata3). En el centro de esta zona donde se expresa Clavata1, algunas células expresan la proteína reguladora Wuschel.

El patrón de divisiones celulares implica que las células que expresan Wuschel no forman parte del propio meristemo; las nuevas células que expresan este gen son reclutadas continuamente por la parte meristemática de la población L3, justo encima del dominio de Wuschel. Sin embargo, estas células que expresan Wuschel son el corazón del mecanismo que mantiene el meristemo. La señal que producen mantiene el comportamiento meristemático de las células situadas encima y estimula la expresión de los genes *Clavata;* además, parece que también induce a la incorporación de nuevas células en el dominio Wuschel para expresar este gen. La retroalimentación negativa que proviene de las células meristemáticas superiores se ejerce por la vía de señalización Clavata y actúa sobre las regiones inferiores limitando el tamaño del dominio Wuschel, con lo que se impide que el meristemo sea demasiado grande (Figura 22–123B).

Todas estas consideraciones sobre el meristemo de las plantas, aunque con algunos detalles imprecisos y una simplificación evidente, proporcionan los ejemplos más esclarecedores de la estrategia general del desarrollo: muestran como un bucle de retroalimentación, que implica una señal activadora de corto alcance (como es la que producen las células que expresan Wuschel) y otra inhibidora de largo alcance (como es Clavata3), puede mantener de forma estable un centro de señales de un tamaño definido, aun cuando exista una proliferación continua y una renovación de las células que forman este centro. Como ya hemos señalado al principio de este capítulo, en el desarrollo de los animales operan sistemas de señales análogos que mantienen los centros de señales localizados, como el Organizador de la gástrula de los anfibios o la zona de actividad polarizada de las yemas de las extremidades. Y es precisamente esta estrategia la que utiliza la planta madura para mantener sus meristemos, igual que también se sirven de ella algunos tejidos animales adultos, como es el caso del tubo digestivo (tema tratado en el Capítulo 23) que mantiene los agregados de células madre, cuya importancia es vital.

Las mutaciones reguladoras pueden transformar la topología de la planta alterando el comportamiento celular en el meristemo

Para que el tallo se ramifique se deben generar nuevos meristemos apicales; este mecanismo también depende de los procesos que tienen lugar alrededor del ápice del vástago. En cada nudo se forma una yema en la axila, entre el primordio foliar y el tallo (**Figura 22–124**).

En la yema anidan células derivadas del meristemo apical, que conservan el carácter meristemático. Tienen la capacidad de convertirse en el meristemo apical de una nueva rama o en el primordio de una estructura como la flor, pero también tienen la alternativa de permanecer quiescentes como *yemas axilares*. El patrón de ramificación de la planta se regula mediante esta elección y las mutaciones que la afectan pueden transformar la estructura de la planta. El maíz proporciona un ejemplo ilustrativo al respecto.

El maíz representa uno de los hitos más remarcables de la ingeniería genética. Los nativos americanos lo generaron por cultivo selectivo hace entre 5000 y 10.000 años, durante un periodo de siglos o quizá de milenios. Partieron de la gramínea silvestre llamada teosinte, que poseía tallos muy ramificados y foliosos y unas pequeñas espigas portadoras de granos duros e incomibles. Mediante análisis genéticos se han identificado unos cinco loci como sitios de las mutaciones responsables de la mayoría de las diferencias entre este ancestro poco prometedor y el maíz actual. Uno de estos loci, que tiene un efecto en particular destacable, corresponde al gen llamado *Teosinte-branched-1 (Tb1)*. En maíz con mutaciones de pérdida de función de *Tb1*, el tallo, que normalmente no es ramificado y presenta algunas hojas grandes a intervalos, se transforma en ramificado y con una masa foliosa densa que recuerda a la teosinte (**Figura 22–125**A). En el mutante, el patrón de ramificación indica que las yemas axilares, que se originan en posiciones normales, han escapado de la inhibición que en el maíz normal impide que se desarrollen en ramas.

En el maíz normal, el tallo único está coronado por un fascículo de flores masculinas, mientras que algunas yemas axilares situadas a lo largo del tallo se desarrollan en flores femeninas, que, una vez fecundadas, darán lugar a los granos de maíz que comemos. En el maíz mutante que carece del gen *Tb1*, estas yemas axilares que dan frutos están transforma-

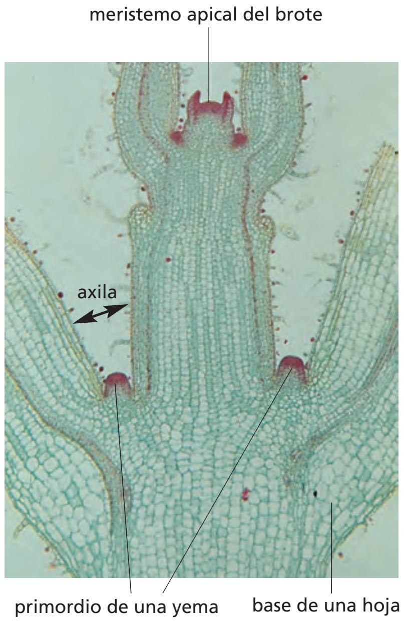


Figura 22–124 Yemas axilares situadas en la proximidad del ápice del brote. En la fotografía se muestra una sección longitudinal de *Coleus blumei*, una planta común de interior. (De P.H. Raven, R.F. Evert, y S.E. Eichhorn, Biology of Plants, 6.ª ed. New York: Freeman/Worth, 1999, utilizada con autorización.)

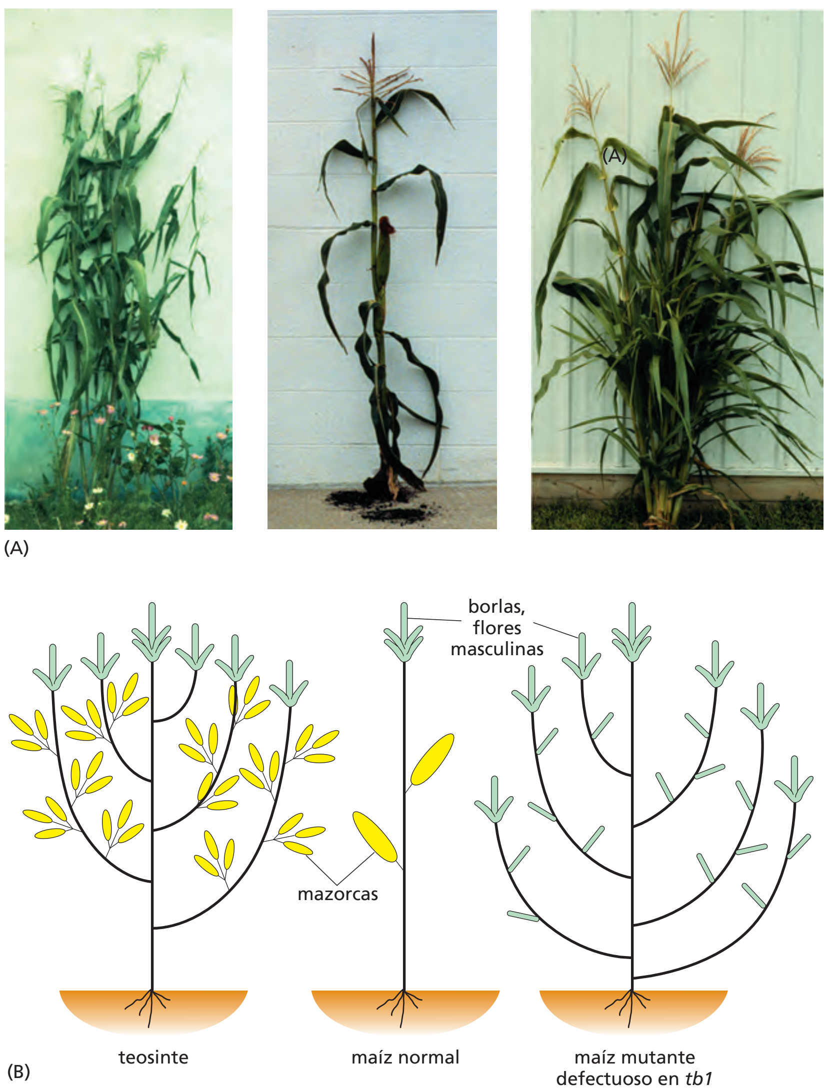


Figura 22–125 Cambio de la arquitectura vegetal debida a una mutación: comparación entre el teosinte, el maíz normal y el maíz defectuoso en *Tb1*. (A) Fotografías de los tres tipos de plantas. (B) Comparación esquemática entre la arquitectura del teosinte, el maíz normal y el maíz defectuoso en *Tb1*. El producto del gen *Tb1* es necesario para el desarrollo de las mazorcas. Está ausente en el mutante *Tb1* y está presente en las formas del maíz teosinte y normal, pero estas dos plantas se diferencian en que el gen está regulado de forma diferente. (A, imagen de la izquierda, de J. Doebley y R.L. Wang, *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.* 62: 361-367, 1997. Con autorización de Cold Spring Harbor Press; A, imágenes del centro y de la derecha, de J. Doebley, A. Stec y L. Hubbard, *Nature* 386:485-488, 1997. Con autorización de Macmillan Magazines Ltd.)

das en ramas que llevan espigas. La planta silvestre teosinte se parece al maíz falto de *Tb1* en su aspecto folioso y muy ramificado; pero, a diferencia del mutante, la planta silvestre produce mazorcas en muchas de sus ramas, como si *Tb1* estuviera activo. El análisis del DNA revela la explicación. Tanto teosinte como el maíz normal poseen el gen *Tb1* funcional, con una secuencia casi idéntica, pero en el maíz la región reguladora ha sufrido una mutación que aumenta el nivel de expresión génica. Así, en el maíz normal, el gen se sobreexpresa en cada yema axilar, inhibiéndose la formación de las ramas, mientras que en teosinte la expresión es baja en muchas yemas axilares, de forma que pueden formarse ramas (Figura 22–125B).

Este ejemplo muestra cuán simples son las mutaciones, ya que, por el solo hecho de cambiar el comportamiento de las células meristemáticas, se transforma la estructura de toda la planta. Este es un principio de enorme importancia en el cultivo de plantas para la alimentación. Desde un punto de vista más general, el caso del gen *Tb1* ilustra cómo los nuevos esquemas corporales, ya sean de plantas o de animales, pueden ser el resultado de cambios en el DNA regulador, sin que haya ningún cambio en las características de las proteínas que expresa.

La activación de la floración depende de las condiciones ambientales pasadas y presentes

Los meristemos se enfrentan a otras decisiones en el curso del desarrollo además del reposo y el crecimiento, como en el caso del maíz; estas decisiones con frecuencia están reguladas por las condiciones ambientales. La más importante es la decisión de formar una flor (**Figura 22–126**).

El cambio del crecimiento meristemático a la formación de una flor se desencadena por una combinación de factores. La planta no sólo tiene en cuenta las condiciones presentes de temperatura, intensidad lumínica y factores nutricionales, sino que su decisión de formar una flor se basa también en las condiciones que tuvieron lugar en el pasado. Una de las más importantes para las plantas es la duración del día. Para reconocerla, las plantas utilizan el reloj circadiano (un ritmo endógeno de expresión génica que corresponde a 24 horas), el cual genera la señal de floración sólo cuando hay luz durante la parte apropiada del día. El reloj está a su vez influenciado por la luz y, de hecho, la planta lo utiliza para comparar las condiciones lumínicas pasadas con las presentes. Se han identificado partes importantes del circuito genético que subyacen a estos fenómenos, desde los fitocromos y criptocromos, que actúan como receptores de la luz (descrito en el Capítulo 15), hasta el gen *Constans*, cuya expresión en las hojas de la planta representa una señal para florecer. Se cree que la señal parte de las hojas y se dirige al meristemo por vía vascular, mediante el producto de otro gen, el *Flowering locus T* (*Ft*), que está regulado por *Constans*.

Pero esta señal llegará al meristemo y desencadenará la floración sólo si la planta se encuentra en un estado receptivo, que depende normalmente de su historia durante un largo periodo de tiempo. Muchas plantas sólo florecen si previamente han experimentado temperaturas bajas durante mucho tiempo: deben pasar el invierno antes de que se comporten como en primavera; este proceso se llama *vernalización*. El frío prolongado causa cambios en la estructura de la cromatina, que dependen de un gran número de genes, incluyendo homólogos de algunos miembros del grupo *Polycomb*, mencionados anteriormente por su papel en la perpetuación de los modelos de expresión génica en *Drosophila*. Estos cambios epigenéticos (tratados en los Capítulos 4 y 7) silencian de forma gradual el *Flowering locus C* (*Flc*). Su efecto es duradero y persisten durante muchos ciclos de división celular, incluso cuando la temperatura ambiental es más alta. *Flc* codifica un inhibidor de la floración, antagonista de la expresión y acción de *Ft*. De esta forma, mediante el bloqueo de la producción del inhibidor, la vernalización permite que el meristemo reciba la señal *Ft* y responda a ella activando la expresión de un grupo de genes *florales de identidad meristemática* en el meristemo apical.

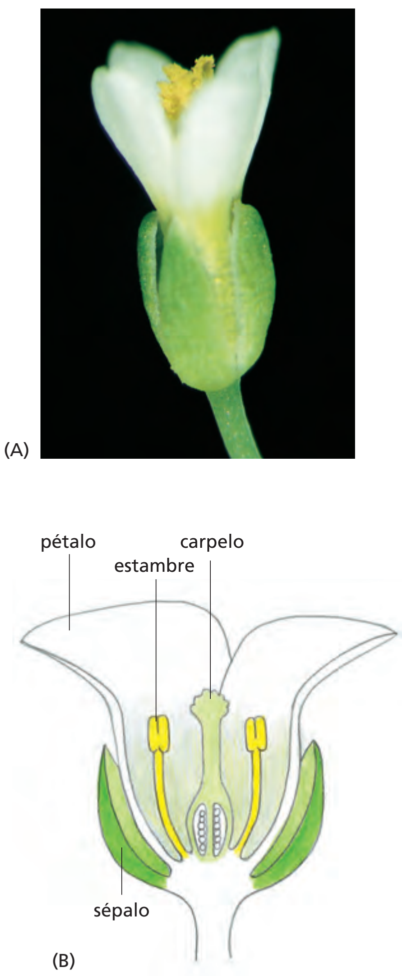


Figura 22–126 Estructura de una flor de *Arabidopsis*. (A) Fotografía. (B) Visión esquemática de una sección longitudinal. Como se muestra en (B), el plan básico es común a la mayoría de plantas dicotiledóneas con flores. (A, cortesía de Leslie Sieburth.)

Las mutaciones que afectan la regulación de la expresión de *Flc* alteran el momento de la floración y, por lo tanto, la capacidad de florecer en un clima determinado. Así pues, el sistema de control que gobierna el inicio de la floración es de vital importancia para la agricultura, especialmente en una era de cambio climático.

Los genes selectores homeóticos especifican las partes de una flor

Mediante la activación de los genes florales de identidad meristemática el meristemo apical ya no puede continuar el crecimiento vegetativo, sino que debe dedicarse a la futura producción de gametos. Sus células se embarcan en un programa estrictamente limitado de crecimiento y diferenciación: mediante la modificación de los mecanismos normales de producción de hojas, se forman una serie de verticilos de apéndices especializados siguiendo un orden preciso; primero se forman los sépalos, luego los pétalos, después los estambres, con las anteras que contienen el polen y, finalmente, los carpelos, que contienen los óvulos (véase el Panel 22–1). Hacia el final de este proceso, el meristemo ha desaparecido, pero de entre su progenie se han originado las células germinales.

La hojas modificadas que forman la flor se han comparado con los segmentos que forman la mosca. En las plantas, al igual que en las moscas, encontramos mutaciones homeóticas que convierten una parte del patrón en el carácter de otro. Los fenotipos mutantes se pueden agrupar como mínimo en cuatro clases, en las cuales están alterados diferentes grupos de órganos que se solapan (**Figura 22–127**). La primera de estas clases es la "A" y está ejemplificada por el mutante *Apetala2* de *Arabidopsis*, que presenta los verticilos más externos transformados: los sépalos se han convertido en carpelos y los pétalos en estambres. La segunda clase, llamada "B", esta representada por *Apetala3*, que tiene los dos verticilos intermedios transformados: los pétalos se han convertido en sépalos y los estambres en carpelos. La clase "C" es la tercera y su paradigma es *Agamous*, que tiene los dos verticilos más internos transformados con consecuencias más drásticas: los estambres se han convertido en pétalos y los carpelos están ausentes, y en su lugar las células centrales de la flor se com-

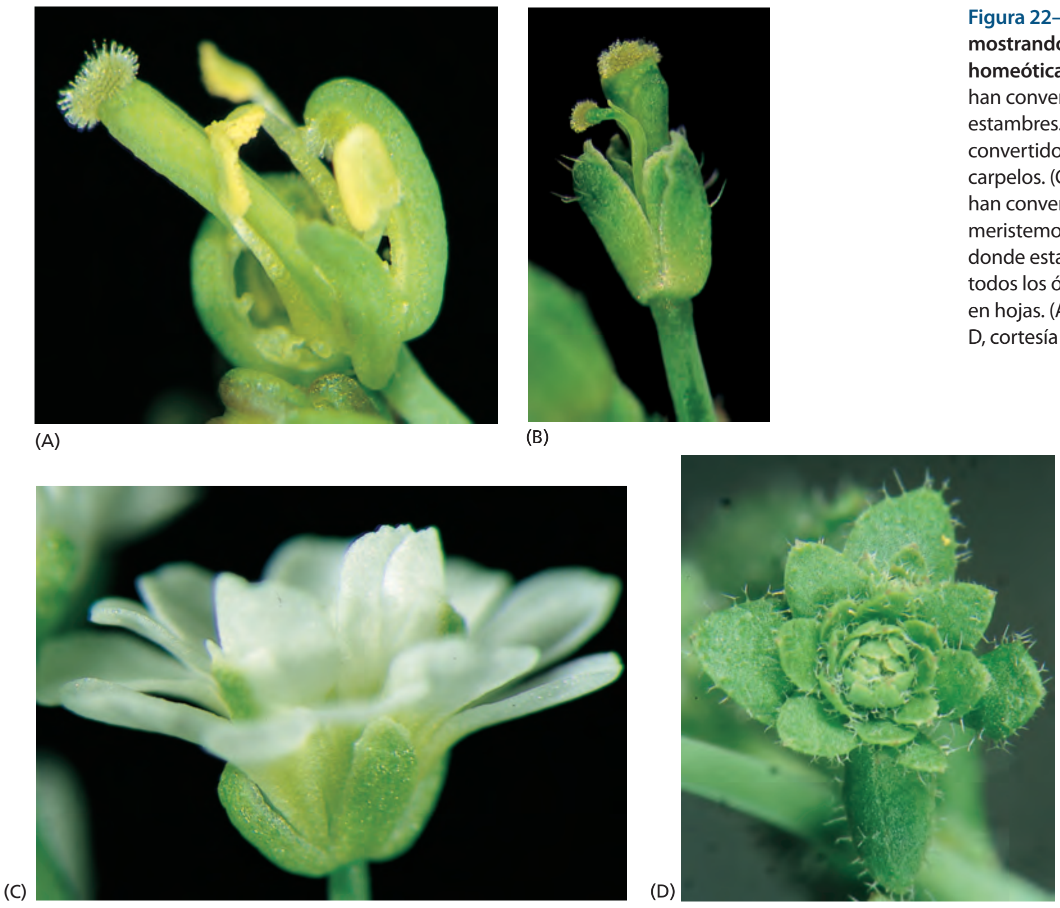


Figura 22–127 Flores de *Arabidopsis* mostrando una selección de mutaciones homeóticas. (A) En *Apetala2*, los sépalos se han convertido en carpelos y los pétalos en estambres. (B) En *Apetala3*, los pétalos se han convertido en sépalos y los estambres en carpelos. (C) En *Agamous*, los estambres se han convertido en pétalos y los carpelos en meristemo floral. (D) En un triple mutante donde estas tres funciones estan ausentes, todos los órganos de la flor se han convertido en hojas. (A-C, cortesía de Leslie Sieburth; D, cortesía de Mark Running.)

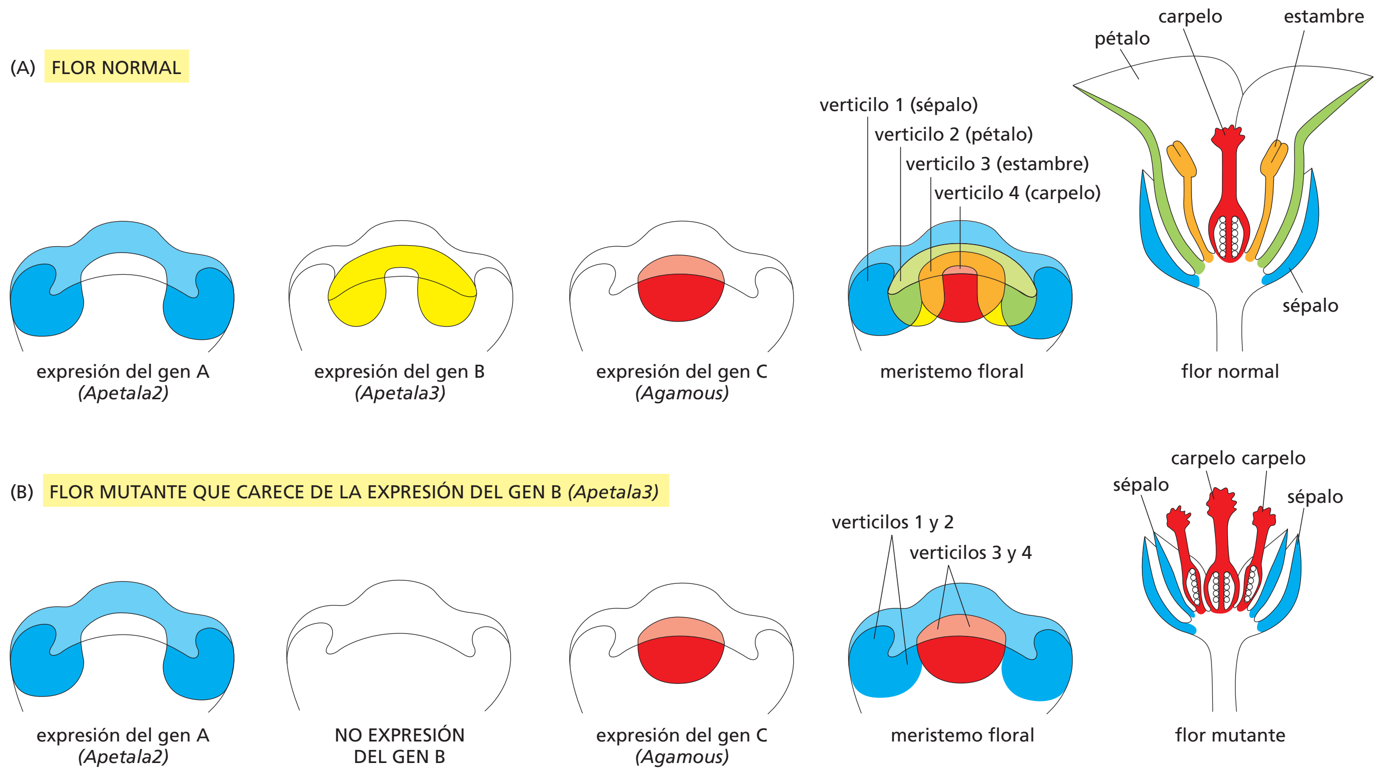


Figura 22–128 Expresión de genes selectores homeóticos en una flor de *Arabidopsis*. (A) Diagrama de los patrones normales de expresión de los tres genes cuyos fenotipos mutantes se ilustran en la Figura 22–127A–C. Los tres genes codifican proteínas reguladoras de genes. En la flor, el sombreado de color indica qué órgano se desarrolla a partir de cada verticilo del meristemo, pero ello no implica que los genes selectores homeóticos todavía se expresen en este estadio. (B) Patrones en un mutante defectuoso para el gen *Apetala 3*. En cada verticilo, el carácter de los órganos se define por el grupo de genes selectores homeóticos que expresan, por lo que los estambres y los pétalos se han convertido en sépalos y carpelos. La consecuencia de una deficiencia en un gen de la clase A, como *Apetala 2*, es algo más compleja: la ausencia del producto de este gen de la clase A permite la expresión de un gen de la clase C en los dos verticilos externos y en los dos verticilos internos, siendo la causa de que los dos verticilos externos se desarrollen como carpelos y estambres, respectivamente. La deficiencia de un gen de la clase C impide que la región central siga su diferenciación terminal como carpelo y es la causa de que continúe creciendo como meristemo, generando cada vez más sépalos y pétalos.

portan como un meristemo floral, que repite la ejecución del desarrollo, generando otro conjunto anormal de sépalos y pétalos anidados en los primeros y, en potencia, otro conjunto dentro del anterior, y así sucesivamente de forma indefinida. Una cuarta clase, la de los mutantes *Sepallata*, tiene los tres verticilos internos transformados en sépalos.

Estos fenotipos identifican cuatro clases de genes selectores homeóticos que, al igual que los de *Drosophila*, codifican proteínas reguladoras. Éstos se expresan en diferentes dominios y definen las diferencias en el estado celular que dan a las distintas partes de la flor normal sus características propias, tal como se muestra en la **Figura 22–128**. Los productos génicos colaboran formando complejos proteicos que dirigen la expresión de los genes apropiados que se encuentran por debajo en la cascada de expresión. En un triple mutante, donde faltan las funciones A, B y C, en lugar de una flor se forma una sucesión indefinida de hojas en verticilos superpuestos (véase la Figura 22–127D). El fenómeno inverso ocurre en las plantas transgénicas en las que los genes de las clases A, B y *Sepallata* se expresan juntos y fuera de sus dominios normales, de forma que las hojas parecen transformadas en pétalos. Por lo tanto, las hojas representan un "estado básico" en el cual no se expresa ninguno de estos genes selectores homeóticos mientras que los otros tipos de órganos resultan de la expresión de estos genes en diferentes combinaciones.

Se han llevado a cabo estudios similares en otras especies de plantas y se han identificado grupos similares de fenotipos y de genes; las plantas, igual que los animales, han conservado sus sistemas de genes selectores homeóticos. La duplicación génica ha tenido un papel importante en la evolución de estos genes; algunos de ellos, como los que se necesitan en los diferentes órganos de la flor, tienen secuencias claramente homólogas. No son de la clase de los homeobox, pero son miembros de otra familia de proteínas reguladoras, la llamada MADS, que también se encuentra en las levaduras y en los vertebrados. Es evidente que, tanto las plantas como los animales, han encontrado de forma independiente soluciones muy similares a los problemas fundamentales del desarrollo pluricelular.

Resumen

El desarrollo de las plantas con flores, igual que el de los animales, empieza con la división del huevo fecundado, que genera un embrión de organización polarizada; la zona apical dará lugar al vástago, la basal a la raíz y la zona media al tallo. Al principio, las divisiones celulares tienen lugar en todo el cuerpo del embrión. No obstante, a medida que crece, la producción celular queda restringi-

da a unas pequeñas regiones llamadas meristemos. Los meristemos apicales, en el ápice de vástagos y raíces, persisten a lo largo de toda la vida de la planta y hacen posible el crecimiento secuencial, que va añadiendo nuevas partes del cuerpo en la periferia. Normalmente el vástago genera una serie repetitiva de módulos, cada uno con un fragmento de tallo, una hoja y una yema axilar. El transporte polarizado de la auxina controla la localización de los primordios de estas estructuras a medida que van surgiendo cerca del meristemo. Una yema axilar es en potencia un nuevo meristemo, capaz de dar lugar a una rama lateral; las condiciones ambientales, junto con señales hormonales de largo alcance, controlan el desarrollo de la planta regulando la activación de las yemas. Las mutaciones que alteran las reglas de activación de las yemas axilares tienen efectos drásticos en la forma y en la estructura de la planta; una sola de estas mutaciones (una de las cinco alteraciones genéticas clave) es la responsable de la mayor parte de las diferencias abismales entre el maíz actual y su ancestro silvestre, el teosinte.

La pequeña planta herbácea Arabidopsis thaliana *se ha utilizado ampliamente como organismo modelo en los estudios genéticos y es la primera planta de la cual se ha obtenido la secuencia completa de su genoma. Igual que en los animales, los genes que gobiernan el desarrollo de las plantas se pueden identificar por cribajes genéticos y sus funciones se pueden examinar mediante manipulaciones genéticas. Estos estudios han revelado los mecanismos moleculares por los cuales la organización de cada módulo de la planta se esquematiza a escala microscópica mediante interacciones célula-célula en los alrededores del meristemo apical. Este meristemo se mantiene gracias a un bucle de retroalimentación local, en el cual las células que expresan la proteína reguladora Wuschel proporcionan un estímulo positivo, mientras que una retroalimentación negativa, dependiente de la vía de señalización Clavata, es la que impide que el meristemo crezca demasiado.*

Las condiciones ambientales, especialmente una adecuada regulación horaria de la exposición a la luz, desencadenan la expresión de los genes que convierten un meristemo apical formador de hojas en uno formador de flores. Las partes de una flor, sépalos, pétalos, estambres y carpelos, se forman mediante la modificación del mecanismo de desarrollo de las hojas; las diferencias entre estas partes están controladas por genes selectores homeóticos que son análogos, aunque no homólogos, a los de los animales.

BIBLIOGRAFÍA

General

Carroll SB, Grenier JK & Weatherbee SD (2004) From DNA to Diversity: Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design, 2.ª ed. Malden, MA: Blackwell Science.

Gilbert SF (2006) Developmental Biology, 8th ed. Sunderland, MA: Sinauer.

Nüsslein-Volhard C (2006) Coming to Life: How Genes Drive Development. London: Yale University Press

Wolpert L, Jessell TM, Lawrence P et al (2006) Principles of Development, 3.ª ed. Oxford: Oxford University Press.

Mecanismos generales del desarrollo animal

Gilbert SF & Raunio AM (eds) (1997) Embryology: Constructing The Organism. Sunderland, MA: Sinauer.

Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME et al (2005) MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 308:833–838.

Lander AD (2007) Morpheus unbound: reimagining the morphogen gradient. *Cell* 128:245–256.

Meinhardt H & Gierer A (2000) Pattern formation by local self-activation and lateral inhibition. *BioEssays* 22:753–760.

Spemann H (1938) Embryonic Development and Induction. New Haven: Yale University Press. Reimpresión 1988, New York: Garland Publishing.

Tyson JJ, Chen KC & Novak B (2003) Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Curr Opin Cell Biol* 15:221–231.

Caenorhabditis elegans: su desarrollo desde la perspectiva de la célula individual

Girard LR, Fiedler TJ, Harris TW et al (2007) WormBook: the online review of *Caenorhabditis elegans* biology. *Nucleic Acids Res* 35:D472–475.

Harris WA & Hartenstein V (1991) Neuronal determination without cell division in *Xenopus* embryos. *Neuron* 6:499–515.

Kamath RS, Fraser AG, Dong Y et al (2003) Systematic functional analysis of the Caenorhabditis elegans genome using RNAi. *Nature* 421:231–237.

Lyczak R, Gomes JE & Bowerman B (2002) Heads or tails: cell polarity and axis formation in the early *Caenorhabditis elegans* embryo. *Dev Cell* 3:157–166.

Metzstein MM, Stanfield GM & Horvitz HR (1998) Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet* 14:410–416.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F et al (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408:86–89.

Strome S & Lehmann R (2007) Germ versus soma decisions: lessons from flies and worms. *Science* 316:392–393.

Drosophila y la genética molecular de la formación del patrón: génesis del esquema corporal

Bate M & Martinez Arias A (eds) (1993) The Development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Gregor T, Bialek W, de Ruyter van Steveninck RR, Tank DW & Wieschaus EF (2005) Diffusion and scaling during early embryonic pattern formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18403–18407.

Huynh JR & St Johnston D (2004) The origin of asymmetry: early polarisation of the *Drosophila* germline cyst and oocyte. *Curr Biol* 14:R438–449.

Lawrence PA (1992) The Making of a Fly: The Genetics of Animal Design. Oxford: Blackwell Scientific.

Nusslein-Volhard C & Wieschaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287:795–801.

Peel AD, Chipman AD & Akam M (2005) Arthropod segmentation: beyond the *Drosophila* paradigm. *Nature Rev Genet* 6:905–916.

Stathopoulos A & Levine M (2004) Whole-genome analysis of *Drosophila* gastrulation. *Curr Opin Genet Dev* 14:477–484.

Los genes selectores homeóticos y su papel en la formación del patrón del eje anteroposterior

Lemons D & McGinnis W (2006) Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science* 313:1918–1922.

Lewis EB (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276:565–570.

McGinnis W, Garber RL,Wirz J et al (1984) A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37:403–408.

Ringrose L & Paro R (2007) Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development* 134:223–232.

Wellik DM & Capecchi MR (2003) Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. *Science* 301:363–367.

Organogénesis y diseño de los apéndices

Bellaiche Y & Schweisguth F (2001) Lineage diversity in the *Drosophila* nervous system. *Curr Opin Genet Dev* 11:418–423.

Betschinger J & Knoblich JA (2004) Dare to be different: asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates. *Curr Biol* 14:R674–685.

Betschinger J, Mechtler K & Knoblich JA (2006) Asymmetric segregation of the tumor suppressor brat regulates self-renewal in *Drosophila* neural stem cells. *Cell* 124:1241–1253.

Irvine KD & Rauskolb C (2001) Boundaries in development: formation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:189–214.

Harvey K & Tapon N (2007) The Salvador-Warts-Hippo pathway—an emerging tumour-suppressor network. *Nature Rev Cancer* 7:182–191.

O'Farrell P (2004). How metazoans reach their full size : the natural history of bigness, In Cell Growth: The Control of Cell Size, MN Hall et al, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 1–22.

Panganiban G, Irvine SM, Lowe C et al (1997) The origin and evolution of animal appendages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5162–5166.

Rogulja D & Irvine KD (2005) Regulation of cell proliferation by a morphogen gradient. *Cell* 123:449–461.

Tickle C (2003) Patterning systems—from one end of the limb to the other. *Dev Cell* 4:449–458.

Los desplazamientos celulares y la formación del cuerpo de los vertebrados

David NB, Sapede D, Saint-Etienne L et al (2002) Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16297–16302.

Heasman J (2006) Maternal determinants of embryonic cell fate. *Semin Cell Dev Biol* 17:93–98.

Hirokawa N, Tanaka Y, Okada Y & Takeda S (2006) Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell* 125:33–45.

Kalcheim C & Le Douarin NM (1999) The Neural Crest, 2.ª ed. Cambridge: Cambridge University Press.

Lewis J (2003) Autoinhibition with transcriptional delay: a simple mechanism for the zebrafish somitogenesis oscillator. *Curr Biol* 13:1398–1408.

Pourquie O (2003) The segmentation clock: converting embryonic time into spatial pattern. *Science* 301:328–330.

Raz E (2004) Guidance of primordial germ cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 16:169–173.

Schier AF (2007) The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs. *Science* 316:406–407.

Tabin CJ (2006) The key to left-right asymmetry. *Cell* 127:27–32.

Takeichi M, Nakagawa S, Aono S et al (2000) Patterning of cell assemblies regulated by adhesion receptors of the cadherin superfamily. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355:885–890.

El ratón

Ghabrial A, Luschnig S, Metzstein MM & Krasnow MA (2003) Branching morphogenesis of the *Drosophila* tracheal system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:623–647.

Hogan BL & Kolodziej PA (2002) Organogenesis: molecular mechanisms of tubulogenesis. *Nature Rev Genet* 3:513–523.

Larsen WJ (2001) Human Embryology, 3.ª ed: Churchill Livingstone.

Lu CC, Brennan J & Robertson EJ (2001) From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo. *Curr Opin Genet Dev* 11:384–392.

Smith AG (2001) Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:435–462.

Weaver M, Dunn NR & Hogan BL (2000) Bmp4 and Fgf10 play opposing roles during lung bud morphogenesis. *Development* 127:2695–2704.

Zernicka-Goetz M (2006) The first cell-fate decisions in the mouse embryo: destiny is a matter of both chance and choice. *Curr Opin Genet Dev* 16:406–412.

El desarrollo del sistema nervioso

Bi G & Poo M (2001) Synaptic modification by correlated activity: Hebb's postulate revisited. *Annu Rev Neurosci* 24:139–166.

Flanagan JG (2006) Neural map specification by gradients. *Curr Opin Neurobiol* 16:59–66.

Hubel DH & Wiesel TN (1965) Binocular interaction in striate cortex of kittens reared with artificial squint. *J Neurophysiol* 28:1041–1059.

Kandel ER, Schwartz JH & Jessell TM (2000) Principles of Neural Science, 4.ª ed. New York: McGraw-Hill.

Nägerl UV, Eberhorn N, Cambridge SB & Bonhoeffer T (2004) Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron* 44:759–767.

Pearson BJ & Doe CQ (2004) Specification of temporal identity in the developing nervous system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:619–647.

Sanes DH, Reh TA & Harris WA (2000) Development of the Nervous System. San Diego: Academic Press.

Tessier-Lavigne M (2002) Wiring the brain: the logic and molecular mechanisms of axon guidance and regeneration. *Harvey Lect* 98:103–143.

Waites CL, Craig AM & Garner CC (2005) Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annu Rev Neurosci* 28:251–274.

Wang GX & Poo MM (2005) Requirement of TRPC channels in netrin-1-induced chemotropic turning of nerve growth cones. *Nature* 434:898–904.

Zou Y, Stoeckli E, Chen H & Tessier-Lavigne M (2000) Squeezing axons out of the gray matter: a role for slit and semaphorin proteins from midline and ventral spinal cord. *Cell* 102:363–375.

El desarrollo de las plantas

Bäurle I & Dean C (2006) The timing of developmental transitions in plants. *Cell* 125:655–664.

Doebley J, Stec A & Hubbard L (1997) The evolution of apical dominance in maize. *Nature* 386:485–488.

Heisler MG, Ohno C, Das P et al (2005) Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Curr Biol* 15: 1899–1911.

Howell SH (1998) Molecular Genetics of Plant Development. Cambridge: Cambridge University Press.

Jack T (2001) Relearning our ABCs: new twists on an old model. *Trends Plant Sci.* 6:310–316.

Schoof H, Lenhard M, Haecker A et al (2000) The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* 100:635–644.

Los tejidos especializados, las células madre y la renovación tisular

23

Las células evolucionaron inicialmente como individuos de vida libre, pero las que son más importantes para los seres humanos son los elementos celulares especializados de una comunidad pluricelular. Estas células han perdido las características necesarias para sobrevivir de forma independiente y han adquirido unas características peculiares que satisfacen las necesidades del conjunto del organismo. Aunque todas ellas tienen el mismo genoma, son espectacularmente distintas: en el cuerpo humano se han caracterizado más de 200 tipos celulares diferentes (véase la lista en inglés buscando Molecular Biology of the Cell, Supplements, en la web www.garlandscience.com). Estas células colaboran entre sí formando tejidos diferentes, ordenados en el interior de órganos, y desarrollando una amplia variedad de funciones. Para comprender su funcionamiento no es suficiente analizarlas en una placa de cultivo: también es necesario saber cómo viven, cómo funcionan y cómo mueren en su hábitat natural, el organismo intacto.

En los Capítulos 7 y 21 se describió cómo los distintos tipos celulares se diferencian en el embrión y cómo la memoria celular y las señales emitidas por las células vecinas les permiten seguir siendo diferentes. En el Capítulo 19, se trataron las técnicas de construcción de los tejidos pluricelulares, es decir, los mecanismos que mantienen las células unidas. Este capítulo se centra en las funciones y las formas de vida de las células especializadas del cuerpo adulto de un vertebrado. Describiremos cómo las células funcionan conjuntamente llevando a cabo sus tareas, cómo nacen las nuevas células especializadas, cómo viven y mueren, y cómo se mantiene la arquitectura de los tejidos a pesar de la constante sustitución de las células envejecidas por otras nuevas. Se analizará con detalle la función que llevan a cabo en muchos tejidos las *células madre*, aquellas células que se especializan en proporcionar a los tejidos un suministro indefinido de nuevas células diferenciadas en el lugar en el que se han perdido, se han eliminado o se necesitan en grandes cantidades.

La exposición de estos temas se acompañará de una serie de ejemplos; algunos de ellos seleccionados por constituir una fiel ilustración de los principios generales, otros por ser objeto de estudio preferente y otros debido a que plantean misteriosos problemas que la biología celular todavía tiene que resolver. Finalmente abordaremos la cuestión que subyace en el actual interés por las células madres: ¿Cómo podemos utilizar nuestro saber sobre los procesos de diferenciación celular y renovación tisular para corregir las lesiones y fallos del cuerpo humano que hasta la fecha no han podido ser reparados?

En este capítulo

LA EPIDERMIS Y SU RENOVACIÓN MEDIANTE CÉLULAS MADRE 1417

LOS EPITELIOS SENSORIALES 1429

LAS VÍAS RESPIRATORIAS Y EL INTESTINO 1434

LOS VASOS SANGUÍNEOS, LOS VASOS LINFÁTICOS Y LAS CÉLULAS ENDOTELIALES 1445

RENOVACIÓN MEDIANTE CÉLULAS MADRES PLURIPOTENCIALES: FORMACIÓN DE CÉLULAS SANGUÍNEAS 1451

GÉNESIS, MODULACIÓN Y REGENERACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO 1463

LOS FIBROBLASTOS Y SUS TRANSFORMACIONES: LA FAMILIA DE LAS CÉLULAS DEL TEJIDO CONJUNTIVO 1468

INGENIERÍA DE LAS CÉLULAS MADRE 1477

LA EPIDERMIS Y SU RENOVACIÓN MEDIANTE CÉLULAS MADRE

Como ocurre en casi todos los órganos y tejidos, la piel es un conjunto formado por varios tipos celulares distintos. Para desempeñar su función básica como barrera, la cubierta externa de la piel depende de diversas estructuras y células de sostén, muchas de las cuales son necesarias también en la mayoría de los demás tejidos. El soporte mecánico que necesita, se halla ampliamente proporcionado por un entramado de matriz extracelular, segregado sobre todo por los *fibroblastos*. Necesita la irrigación sanguínea para que transporte nutrientes y oxígeno y para que elimine los productos de desecho y el dióxido de carbono, lo que requiere una red de vasos sanguíneos delimitados por *células endoteliales.* Dichos vasos también proporcionan vías de acceso a las células del sistema inmunitario para la defensa frente a la infección: los *macrófagos* y las *células dendríticas*, para fagocitar los patógenos invasores

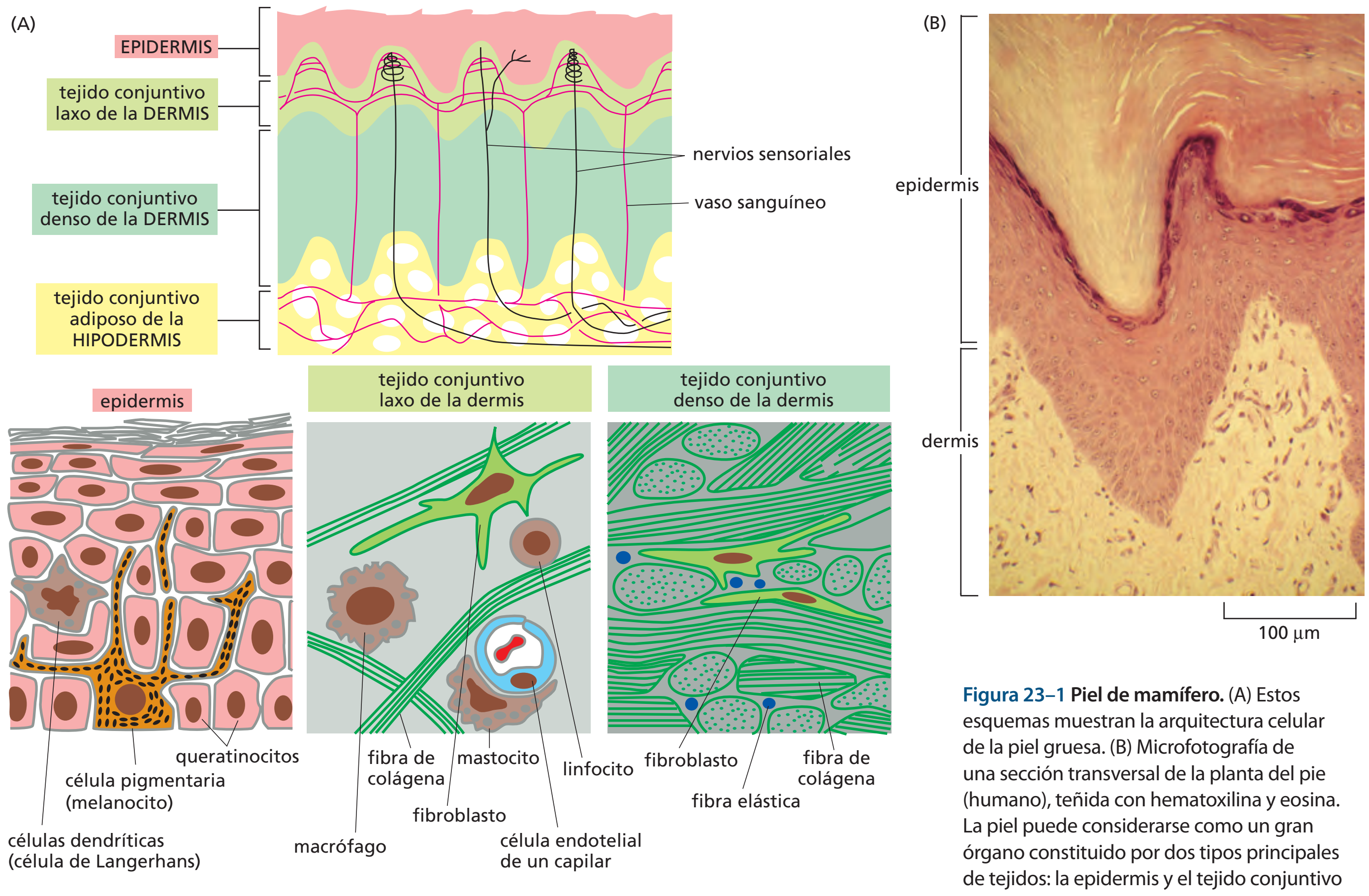


Figura 23–1 Piel de mamífero. (A) Estos esquemas muestran la arquitectura celular de la piel gruesa. (B) Microfotografía de una sección transversal de la planta del pie (humano), teñida con hematoxilina y eosina. La piel puede considerarse como un gran órgano constituido por dos tipos principales de tejidos: la epidermis y el tejido conjuntivo subyacente, que consiste en la dermis y la hipodermis. Cada tejido está compuesto por varias clases distintas de células. Una gran cantidad de vasos sanguíneos y nervios abastecen la dermis y la hipodermis. Algunas fibras nerviosas se extienden por la epidermis.

y colaborar en la activación de los *linfocitos* y los propios linfocitos para dar lugar a las respuestas adaptativas del sistema inmunitario más sofisticadas (tratado en el Capítulo 24). Las *fibras nerviosas* también son necesarias para transmitir información sensorial desde los tejidos hasta el sistema nervioso central y para distribuir señales en sentido opuesto, para la secreción de las glándulas y la contracción del músculo liso.

La **Figura 23–1** ilustra la arquitectura de la piel y muestra cómo cumple todos estos requisitos. Un epitelio, la **epidermis**, forma la capa externa, que constituye una barrera impermeable que se autorrepara y renueva de forma continua. Por debajo de ella se extiende una capa de tejido conjuntivo relativamente gruesa y consistente, que constituye la **dermis**, rica en colágena (de la cual se fabrican las pieles comerciales) y la *capa subcutánea* subyacente de grasa o *hipodermis.* En la piel, el tejido conjuntivo con los vasos y nervios que lo atraviesan, es el responsable de la mayoría de las funciones de soporte a las que nos hemos referido. Sin embargo, la epidermis es el componente fundamental de la piel, es decir, el tejido más característico de este órgano, aunque no constituye la mayor parte de su volumen. Se desarrollan formaciones especializadas de la epidermis, como los pelos, uñas, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas (**Figura 23–2**). La distribución de dichas estructuras y de sus patrones característicos de crecimiento y renovación están reguladas por complejos mecanismos. Las regiones de epitelio más o menos grueso y poco especializado que recubren la superficie del cuerpo, entre los folículos pilosos y otros apéndices, reciben el nombre de *epidermis interfolicular.* Presenta una organización sencilla, y constituye una buena introducción a la forma en que los tejidos del organismo adulto se renuevan continuamente.

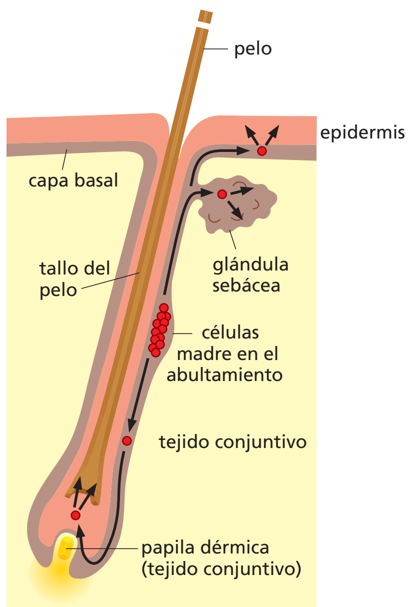


Figura 23–2 Folículo piloso y una glándula sebácea asociada. Estas estructuras constituyen especializaciones de la epidermis. El pelo crece desde la papila de la base hacia arriba. La glándula sebácea contiene células cargadas de lípidos que son segregados manteniendo el pelo lubrificado. La estructura completa sigue ciclos de crecimiento, regresión (cuando se cae el pelo) y reconstrucción. Como en el resto de la epidermis, su crecimiento y reconstrucción en cada ciclo depende de las células madre. Justo debajo de la glándula sebácea, un grupo considerable de células madre (*rojo*), en forma de abultamiento, pueden llegar a formar tanto folículos pilosos como epidermis interfolicular.

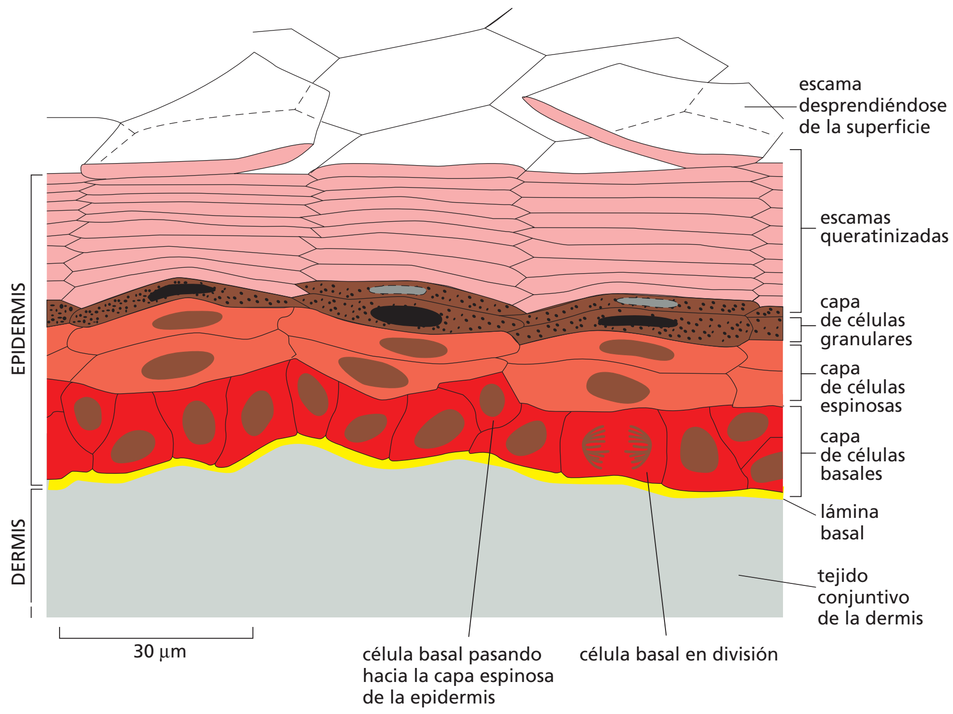


Figura 23–3 Estructura pluriestratificada de la epidermis, tal como se observa en un ratón. Se pueden visualizar los contornos de las escamas queratinizadas hinchándolas con una solución de hidróxido sódico. La disposición hexagonal muy ordenada, de columnas de células entrelazadas que aquí se presentan, sólo se encuentra en algunos lugares en los que la epidermis es delgada. En la piel humana, normalmente la pila de escamas es mucho mayor y menos regular, y en los lugares en los que la piel es muy gruesa, las células mitóticas no sólo se observan en la capa basal sino también en las primeras capas de células por encima de ella. Además de las células destinadas a la queratinización, las capas profundas de la epidermis incluyen pequeñas cantidades de células distintas, tal como se indicaba en la Figura 23–1, incluidas las células dendríticas, denominadas células de Langerhans, procedentes de la médula ósea; los melanocitos (células pigmentadas), que tienen su origen en la cresta neural, y las células de Merkel, que están asociadas con las terminaciones nerviosas de la epidermis.

Las células epidérmicas forman una barrera impermeable de varias capas

La epidermis interfolicular es un epitelio de varias capas de células (*pluriestratificado*) compuesto mayoritariamente por *queratinocitos* (denominados así porque su principal actividad es la síntesis de las proteínas queratinas, que forman los filamentos intermedios y que proporcionan a la epidermis su dureza) (**Figura 23–3**) Estas células varían de aspecto de una capa a otra. Las de la capa más interna, adheridas a la lámina basal subyacente, se denominan *células basales*, y habitualmente son las únicas que se dividen. Por encima de las células basales se encuentran varias capas de grandes *células espinosas* (**Figura 23–4**), cuyos numerosos desmosomas –los lugares de adhesión de los haces de filamentos de queratina– sólo son visibles con el microscopio óptico como finas espinas en la periferia de la superficie celular (de ahí el nombre de las células). Junto a las células espinosas se halla otra fina capa de células granulares intensamente teñidas (véase Figura 23–3). A este nivel las células se encuentran unidas con fuerza entre sí formando una barrera impermeable. Ratones que debido a alteraciones genéticas no llegan a formar esta barrera impermeable, mueren poco después de nacer debido a una rápida pérdida de fluido, a pesar de que su piel tiene un aspecto normal desde otros puntos de vista.

La capa granular, que es la barrera al desplazamiento del agua y de solutos, marca el límite entre el estrato interno, metabólicamente activo, y la capa externa de la epidermis, formada por células muertas cuyos orgánulos intracelulares han desaparecido. Estas células más externas se hallan reducidas a láminas aplanadas, o *escamas*, embebidas en queratina densamente empaquetada. La cara citoplasmática de la membrana plasmática, tanto de las escamas como de las células granulares exteriores, está reforzada por una capa de proteínas fina (12 nm), dura y entrecruzada, que contiene involucrina, una proteína citoplasmática. Por lo general, las escamas están tan comprimidas y son tan finas que con el microscopio electrónico resulta difícil reconocer los límites de cada una de ellas. Sin embargo, empapándolas en una solución de hidróxido sódico (o en un baño templado en un tubo) se hinchan de forma progresiva y se pueden observar sus bordes (véase la Figura 23–3).

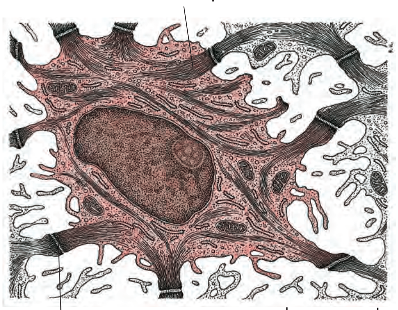


Figura 23–4 Una célula espinosa. Esquema de una electromicrografía de una sección de la epidermis, mostrando los haces de filamentos de queratina que atraviesan el citoplasma y se insertan en los desmosomas que unen las células espinosas (en *rojo*) entre sí. Los nutrientes y el agua difunden con facilidad por los espacios intercelulares de las capas de epidermis metabólicamente activas que ocupan las células espinosas. Además, en el nivel de las células granulares, hay una barrera impermeable que se cree que está formada por un material cementante que segregan las células granulares. (De R.V. Krstić, Ultrastructure of the Mammalian Cell: an Atlas. Berlin: Springer-Verlag, 1979.)

A medida que van madurando, las células epidérmicas en diferenciación expresan una secuencia de genes diferentes

Si se pasa de la imagen estática funcional a un punto de vista dinámico, donde la epidermis se renueva continuamente, se puede observar que mientras algunas células basales se divi-

den, incorporándose a la población celular de la capa basal, otras (sus hermanas o primas) salen de la capa celular basal y entran en la capa de células espinosas; se trata del primer paso de su desplazamiento ascendente. Cuando alcanzan la capa granular, las células empiezan a perder sus núcleos y orgánulos citoplasmáticos, mediante un mecanismo degradativo que implica una activación parcial de la maquinaria de la apoptosis; de este modo, las células se transforman en escamas queratinizadas de la capa queratinizada. Finalmente dichas células se descaman en la superficie de la piel (y son arrastradas en forma de polvo por el aire). El intervalo de tiempo que transcurre desde el momento en que se forma una célula en la capa basal de la piel humana, hasta que se pierde por desprendimiento de la superficie, es del orden de un mes, variable según la región del cuerpo de que se trate.

A medida que el nuevo queratinocito de la capa basal se va transformando en la escama de las capas más externas (véase Figura 23–4), pasa a través de una secuencia de distintos estadios de la expresión génica, sintetizándose una sucesión de distintos componentes de la familia de las queratinas. Simultáneamente, también empieza a sintetizarse otra de las proteínas características, como es la involucrina, como parte de un programa coordinado de **diferenciación celular terminal** –proceso por el que un precursor celular adquiere sus características especializadas definitivas y por lo general deja de forma permanente de dividirse. El programa completo se inicia en la capa basal. Es en esta zona donde se decide el destino de las células.

Las células madre de la capa basal permiten la renovación de la epidermis

En el hombre, las capas más externas de la epidermis se renuevan unas mil veces en el transcurso de la vida. En la capa basal tiene que haber células que puedan permanecer indiferenciadas y que puedan dividirse a lo largo de todo este tiempo, produciendo de forma continua descendientes destinados a la diferenciación, que abandonen la capa basal y finalmente se desprendan. El proceso sólo puede mantenerse si la población de células basales se autorrenueva. Por lo tanto debe contener algunas células que generen una descendencia mixta, incluyendo células hijas que permanezcan indiferenciadas como las células progenitoras y células hijas que se diferencien. Las células que poseen esta propiedad se denominan **células madre**. Ejercen un papel tan importante en gran diversidad de tejidos que resulta útil disponer de una definición formal.

Las propiedades que definen una célula madre son las siguientes:

1. No se diferencia de forma terminal (no se halla al final de una vía de diferenciación).
2. Puede dividirse sin límite (o por lo menos durante toda la vida del animal).
3. Cuando se divide, cada célula hija tiene una opción: puede permanecer como célula madre o puede emprender un trayecto que determina su diferenciación terminal (**Figura 23–5**).

Las células madre se requieren allí donde haya que reemplazar constantemente células diferenciadas que no pueden dividirse. La propia célula madre debe ser capaz de dividirse –esto forma parte de la definición– pero conviene resaltar que esta división no tiene por qué ser rápida; en realidad, por lo general las células madre se dividen lentamente.

La necesidad de células madre aparece en muchos tejidos distintos. Así pues, las células madre son muy distintas, especializadas en la génesis de distintas clases de células diferenciadas terminalmente: células madre epidérmicas en la epidermis, células madre intestinales en el epitelio intestinal, células madre hematopoyéticas en la sangre, etcétera. Sin embargo cada sistema de células madre plantea las mismas cuestiones fundamentales. ¿Cuáles son los rasgos diferenciales de las células madre en términos moleculares? ¿Qué factores determinan si la célula madre se divide o permanece quiescente? ¿Qué determina si una célula hija se diferencia o permanece como una célula madre? Y, por último, en los casos en los que la célula madre puede dar lugar a más de un tipo de célula diferenciada –como sucede a menudo– ¿qué es lo que determina la vía de diferenciación a seguir?

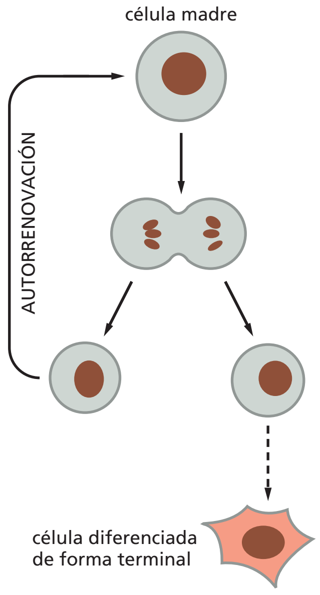


Figura 23–5 La definición de una célula madre. Cada célula hija producida por la división de una célula madre puede seguir siendo una célula madre o puede llegar a diferenciarse de forma terminal. En muchos casos, la célula hija que opta por la diferenciación terminal sufre divisiones celulares adicionales antes de que termine la diferenciación terminal.

Las dos células hijas de una célula madre no siempre tienen que llegar a ser distintas

En una situación de estado estacionario, para mantener una población estable de células madre, en cada generación celular exactamente el 50% de células hijas procedentes de célu-

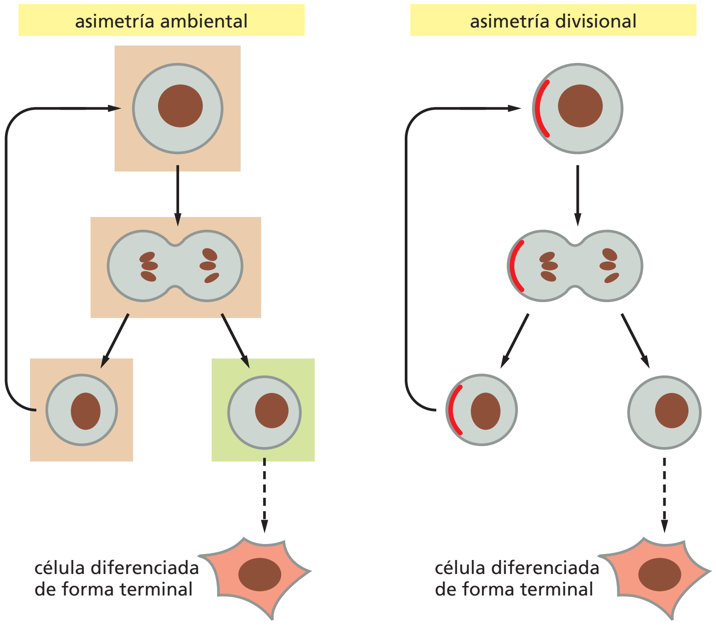


Figura 23–6 Dos maneras de producir células hijas con destinos diferentes a partir de una célula madre. En la estrategia basada en la asimetría ambiental, las células hijas de una célula madre inicialmente son parecidas, pero se dirigen por dos caminos distintos según las influencias medioambientales que actúan sobre ellas después de su nacimiento. El ambiente aparece *sombreado* alrededor de la célula. Con esta estrategia, el número de células madre puede aumentar o disminuir, ajustándose al nicho que tienen disponible. En la estrategia basada en la asimétrica divisional, la célula madre tiene una asimetría interna y se divide de tal manera que sus dos células hija ya están determinadas de forma diferente en el momento de su nacimiento. En algunos casos, las células hijas pueden elegir al azar entre destinos alternativos, pero con una probabilidad definida, como a cara o cruz, reflejando la variabilidad intrínseca o el "ruido" en todos los sistemas de control genético (descritos en el Capítulo 7).

las madre deben permanecer como células madre. En principio, esto debería lograrse de dos formas: mediante *asimetría ambiental* o mediante *asimetría divisional* (**Figura 23–6**). En la primera estrategia, la división de una célula madre debería generar dos células hijas inicialmente similares, pero cuyos destinos serían regidos por su entorno correspondiente; el 50% de la *población* de células hijas permanecería como células madre, pero podría darse el caso que a menudo las dos células hijas de una célula madre determinada, podrían tener el mismo destino. En el extremo opuesto, la división de cada célula madre siempre sería asimétrica, de forma que produciría una célula hija que heredase el carácter de célula madre y otra que heredase factores que la obligasen a seguir la vía de la diferenciación. Los neuroblastos del sistema nervioso central de *Drosophila*, estudiados en el Capítulo 22, constituyen un ejemplo de células que presentan esta asimetría divisional. Sin embargo, en su sentido más estricto, esta estrategia tiene una desventaja: significa que las células madre existentes nunca pueden aumentar de número y cualquier pérdida de células madre es irreparable, a menos que se produzca la incorporación de algún otro tipo celular que se convierta en célula madre. La estrategia de control mediante la asimetría ambiental es más flexible.

En realidad, si se destruye un fragmento de epidermis, la lesión se repara mediante las células epidérmicas de los alrededores, que proliferan recubriendo el área descubierta. Así se establece un nuevo fragmento reparado de epidermis, lo que implica que se han generado células madre adicionales. Estas células tienen que ser producidas mediante divisiones simétricas en las que una célula madre da lugar a otras dos células madre. De esta forma, la población de células madre ajusta su número total y ocupa el nicho disponible.

Este tipo de observaciones sugiere que el mantenimiento del carácter de célula madre en la epidermis debe ser controlado mediante el contacto con la lámina basal, de forma que una pérdida de contacto desencadena el inicio de la diferenciación terminal y el mantenimiento del contacto tiende a preservar el potencial de célula madre. Esta idea contiene algo de verdad, pero no la verdad completa. Tal como se explicará a continuación, no todas las células de la capa basal poseen la capacidad de funcionar como células madre.

La capa basal contiene tanto las células madre como las células amplificadoras transitorias

Los queratinocitos basales pueden disociarse a partir de la epidermis intacta y proliferar en una placa de cultivo, dando lugar a nuevas células basales y a células diferenciadas de forma terminal. Incluso en una población de queratinocitos basales en cultivo en la que todos parecen ser indiferenciados, se da una amplia variación en la capacidad de proliferación de cada uno de ellos. Cuando se valida la capacidad de cada uno de los queratinocitos humanos, individualmente, para formar nuevas colonias, se observa que algunas parecen totalmente incapaces de dividirse, otras sólo realizan unos cuantos ciclos de división y después se de-

tienen y otras se dividen el número suficiente de veces para formar grandes colonias. Este potencial proliferativo se correlaciona de forma directa con la expresión de la subunidad β1 de las integrinas, que actúan en la adhesión a la lámina basal. También se hallan grupos de células con niveles elevados de dicha molécula en la capa basal de la epidermis humana intacta y se cree que contienen las células madre (**Figura 23–7**). Todavía no se dispone de marcadores específicos para células madre y no comprendemos qué es lo que define esencialmente en términos moleculares el estado de células madre. Se trata de uno de los problemas clave de la biología de las células madre y se seguirá tratando de ello en las últimas secciones del capítulo.

De manera paradójica, parece que muchas, si no todas, las células epidérmicas que producen grandes colonias en los cultivos son células que, por norma, raras veces se dividen. Una evidencia en este sentido deriva de los experimentos en los que se aplica un pulso de un análogo de la timidina, la bromodeoxiuridina (BrdU) a un animal joven (en el que la epidermis está creciendo rápido) o a un animal adulto, en ambos casos después de una lesión que provoque una rápida reparación. Transcurridos unos cuantos días o semanas, se fija el tejido y se tiñe con un anticuerpo que reconoce el DNA al que se ha incorporado la BrdU. Todas aquellas células que se encontraban en la fase S en el momento del pulso inicial han captado la BrdU. Como se podría esperar que la BrdU se diluyera a la mitad en cada división celular, todas aquellas células que permanecen intensamente marcadas en el momento de la fijación indican que han sufrido pocas o ninguna división desde la duplicación de su DNA en el momento del pulso. Estas *células conservadoras de marca* pueden dispersarse entre las células no marcadas o débilmente marcadas de la capa basal de la epidermis, incluso después de un intervalo de varios meses, y puede observarse un número elevado de las mismas en los folículos pilosos, en una región denominada el abultamiento (véase Figura 23–2). Este ingenioso método de marcaje indica que las células conservadoras de marca, por lo menos en el folículo piloso, realmente son células madre: cuando se reanuda un nuevo ciclo de crecimiento de un pelo después de que se haya desprendido un pelo antiguo, finalmente las células conservadoras de marca del abultamiento se dividen y contribuyen así a la regeneración del folículo piloso. Aunque no es totalmente cierto que todas las células madre del folículo piloso tengan este carácter conservador de marca, algunas de ellas claramente sí que lo tienen, y esto mismo parece ser cierto para las células madre de la epidermis interfolicuar. Además, las células basales que expresan la integrina β1 en grandes cantidades –las células que pueden generar grandes colonias en cultivo– pocas veces se dividen.

Mezcladas con dichas células, existen otras que se dividen con mayor frecuencia, pero sólo durante un número limitado de ciclos de división, después de abandonar la capa basal

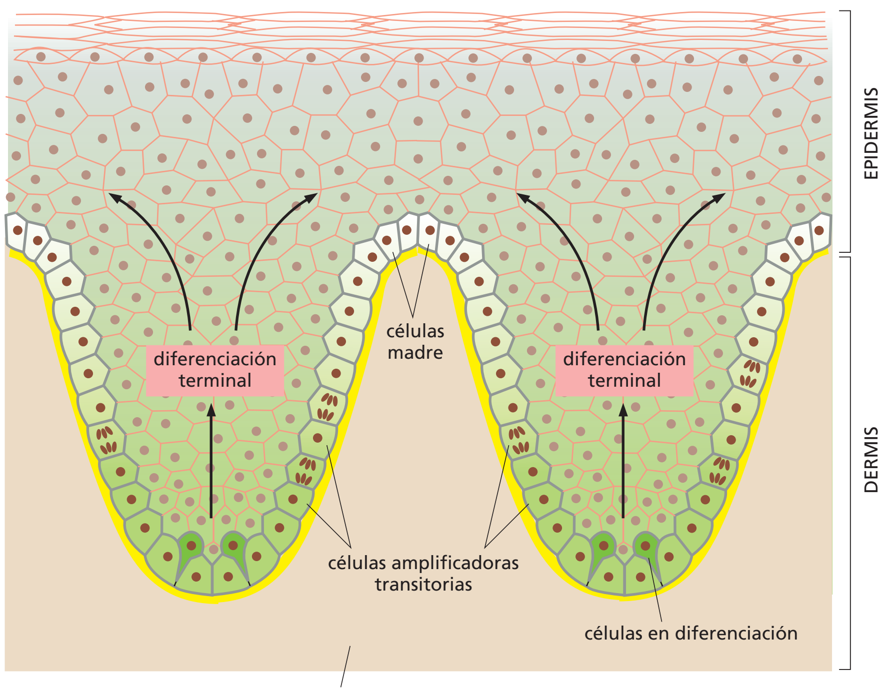


Figura 23–7 Distribución de células madre en la epidermis humana y modelo de producción de células epidérmicas. El diagrama se basa en muestras en las cuales la localización de las células madre fue identificada mediante una tinción de la integrina β1 y la de las células diferenciadas mediante una tinción de la queratina-10, un marcador de diferenciación del queratinocito; las células en división se identificaron mediante un marcaje con BrdU, un análogo de la timidina que se incorpora a las células durante la fase S del ciclo de división celular. Las células madre parecen agruparse cerca de los extremos de las papilas dérmicas. En pocas ocasiones se dividen, lo cual da lugar (a través de desplazamientos laterales) a las células amplificadoras transitorias, que ocupan las zonas intermedias. A menudo, las células amplificadoras transitorias se dividen, pero durante un número limitado de ciclos de división, al final de los cuales empiezan a diferenciarse y se desplazan hacia afuera de la capa basal. La distribución precisa de las células madre cambia de una zona de la epidermis a otra. (Adaptado de S. Lowell et al., *Curr. Biol.* 10:491-500, 2000). Con autorización de Elsevier.)

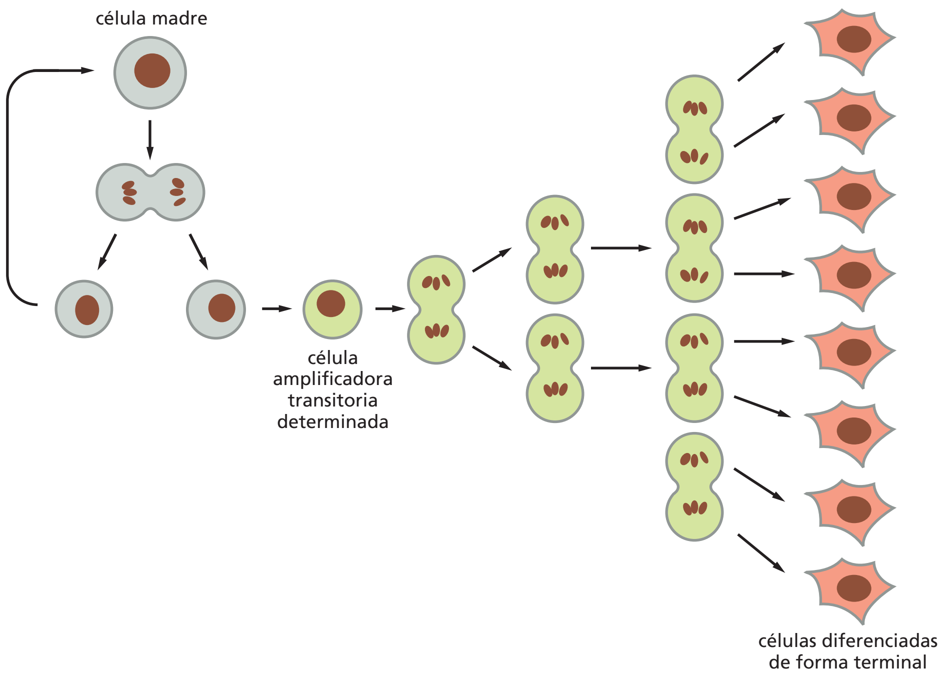


Figura 23–8 Células amplificadoras transitorias. En muchos tejidos las células madre no se dividen casi nunca, pero dan lugar a las células amplificadoras transitorias –células hijas comprometidas a diferenciarse, que atraviesan una sucesión limitada de divisiones más rápidas antes de terminar el proceso. En el ejemplo presentado, cada división de la célula madre da lugar a ocho células descendientes de forma terminal.

y diferenciarse. Estas últimas células se denominan **células amplificadoras transitorias**. Se denominan "transitorias" debido a que se encuentran en tránsito desde un carácter de célula madre a un carácter de célula diferenciada, y "amplificadoras" porque los ciclos de división ejercen un efecto de amplificación en el número de la progenie diferenciada resultante de una sola división de una célula madre (**Figura 23–8**). De este modo, una pequeña población de células madre que se dividen sólo raras veces puede generar un suministro abundante de nuevas células diferenciadas.

Las divisiones amplificadoras transitorias forman parte de la estrategia de control del crecimiento

Las células amplificadoras transitorias constituyen una característica común de todos los sistemas de células madre. Esto implica que en la mayor parte de tales sistemas existen unas cuantas células madre verdaderas, que se hallan mezcladas con un número mucho mayor de células progenitoras que solamente presentan una capacidad limitada para dividirse. Tal como se trató en el Capítulo 20, parece que sucede lo mismo no sólo en los tejidos con autorrenovación normal, sino también en muchos tipos de cáncer, en los que una pequeña proporción de la población de células tumorales son capaces de funcionar como células madre cancerígenas. ¿Por qué ocurre así? Hay varias respuestas, pero una parte de la explicación reside posiblemente en una estrategia que consiste en que los grandes organismos pluricelulares (como los mamíferos) controlan las dimensiones de sus poblaciones celulares.

La mayoría de las proporciones de las partes del cuerpo quedan determinadas durante una fase temprana del desarrollo, mediante señales que actúan en su mayoría a distancias de varios centenares de veces el diámetro celular: de esta forma queda delimitado un pequeño rudimento o población celular fundadora. Las poblaciones celulares fundadoras tienen que crecer, pero –por lo menos en los mamíferos– sólo hasta un cierto límite definido, y una vez alcanzado tienen que parar de crecer.

En el organismo adulto, una vez detenido el crecimiento en un tamaño determinado, funcionan señales de retroalimentación a distancias mucho mayores; este tipo de señales desempeñan un papel importante en el control del crecimiento en algunos tejidos. Sin embargo, otra estrategia consiste en dotar a cada célula fundadora de un programa interno de funcionamiento que le permita dividirse un número limitado de veces y detenerse. De esta forma, durante el desarrollo las señales de corto alcance pueden definir el tamaño final de grandes estructuras (**Figura 23–9**). Pero si ésta es la estrategia, ¿cómo pueden renovarse continuamente los tejidos adultos? Una solución consiste en especificar a las células fundadoras como células madre, para que sean capaces de continuar dividiéndose de forma indefinida:

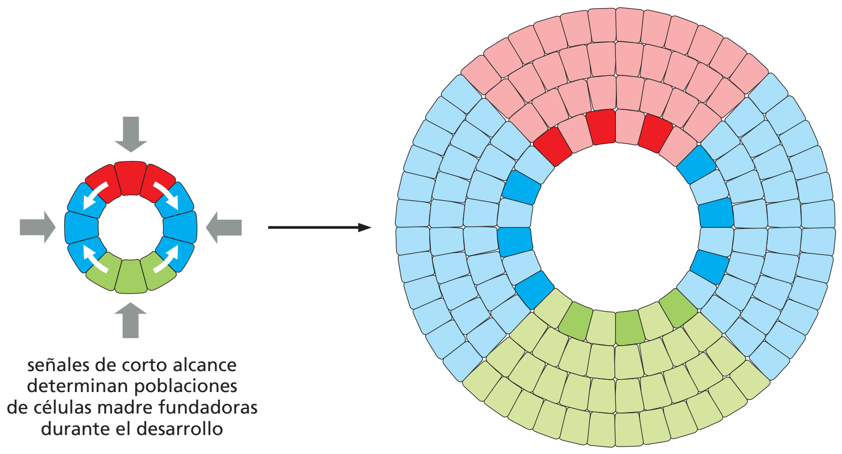


Figura 23–9 Una forma de definir el tamaño de un gran órgano. En el embrión, las señales de corto alcance determinan pequeños grupos de células como fundadoras de distintas poblaciones celulares. De este modo, cada célula fundadora puede estar programada para dividirse un determinado número de veces, dando lugar a un gran conjunto de células en el adulto. Si el órgano adulto tiene que renovarse, manteniendo su propio tamaño, las células fundadoras se pueden programar para dividirse como células madre, produciendo en cada división un promedio de una célula hija que permanece como célula madre y otra que está programada para seguir una serie de divisiones amplificadoras transitorias.

en cada división se producirá una célula hija que permanecerá como célula madre y otra que será programada para seguir un número limitado de divisiones amplificadoras transitorias hasta que se detenga.

Por supuesto esta es una explicación muy simplificada e incompleta del control del crecimiento y la renovación tisular, pero contribuye a explicar por qué células programadas para seguir largas secuencias de divisiones celulares, que luego se detienen, constituyen un rasgo común en el desarrollo animal y por qué la renovación tisular mediante células madre implica divisiones amplificadoras transitorias.

Las células madre de algunos tejidos conservan hebras del DNA inicial

Parece que las células madre de muchos tejidos son células conservadoras de marca. Tal como se ha descrito, se da por supuesto que una vez las células han incorporado un trazador como la BrdU en su DNA durante un intervalo de exposición, las células madre se dividen muy pocas veces, de forma que la marca se diluye lentamente con el DNA recién sintetizado. Sin embargo, existe otra interpretación posible: sin tener en cuenta si las células se dividen de forma rápida o lenta, las células madre podrían segregar sus hebras de DNA de forma asimétrica, de modo que en cada división, y para cada cromosoma, la hebra de DNA que se había marcado inicialmente queda retenida en la célula hija que continua como célula madre. Posiblemente, dicha hebra inicial tiene adquirir algún tipo de marca especial, que la señala como una hebra de célula madre, asegurando así una segregación asimétrica en la célula hija que continúa como célula madre (véase Figura 23–6), junto con todas las hebras de DNA marcadas de forma similar de los demás cromosomas; de este modo, las hebras antiguas marcadas podrían ser retenidas en las células madre de generación en generación. Por ejemplo, la marca podría adoptar la forma de alguna proteína específica del cinetocoro, que permanece asociada con la antigua hebra de DNA en el centrómero de cada cromosoma durante la replicación del DNA y después adopta algún tipo de asimetría en el huso mitótico asegurando que la célula hija reciba todos los cromosomas que llevan la marca. En cada generación de células madre, las mismas hebras de DNA iniciales marcadas podrían servir de molde para la producción de nuevos grupos de hebras de DNA que serían transferidas a las células amplificadoras transitorias durante la siguiente generación (**Figura 23–10**).

Esta hipótesis sobre la "hebra inmortal" puede parecer difícil de asumir, ya que no se ha identificado aún ningún mecanismo de marcaje y segregación de hebras individuales de DNA de este tipo. Todavía hacen falta más evidencias que validen como correcta la hipótesis de la hebra inmortal. El músculo (se describe más adelante en este capítulo) constituye un buen ejemplo. Cuando se administra BrdU durante un intervalo de formación de células madre musculares y se observan sus procesos de división y proliferación, es posible detectar pequeños clones de células, o parejas de células hermanas, en las que la marca de la BrdU se concentra en una sola célula, aun cuando todas las células comparten un origen común a

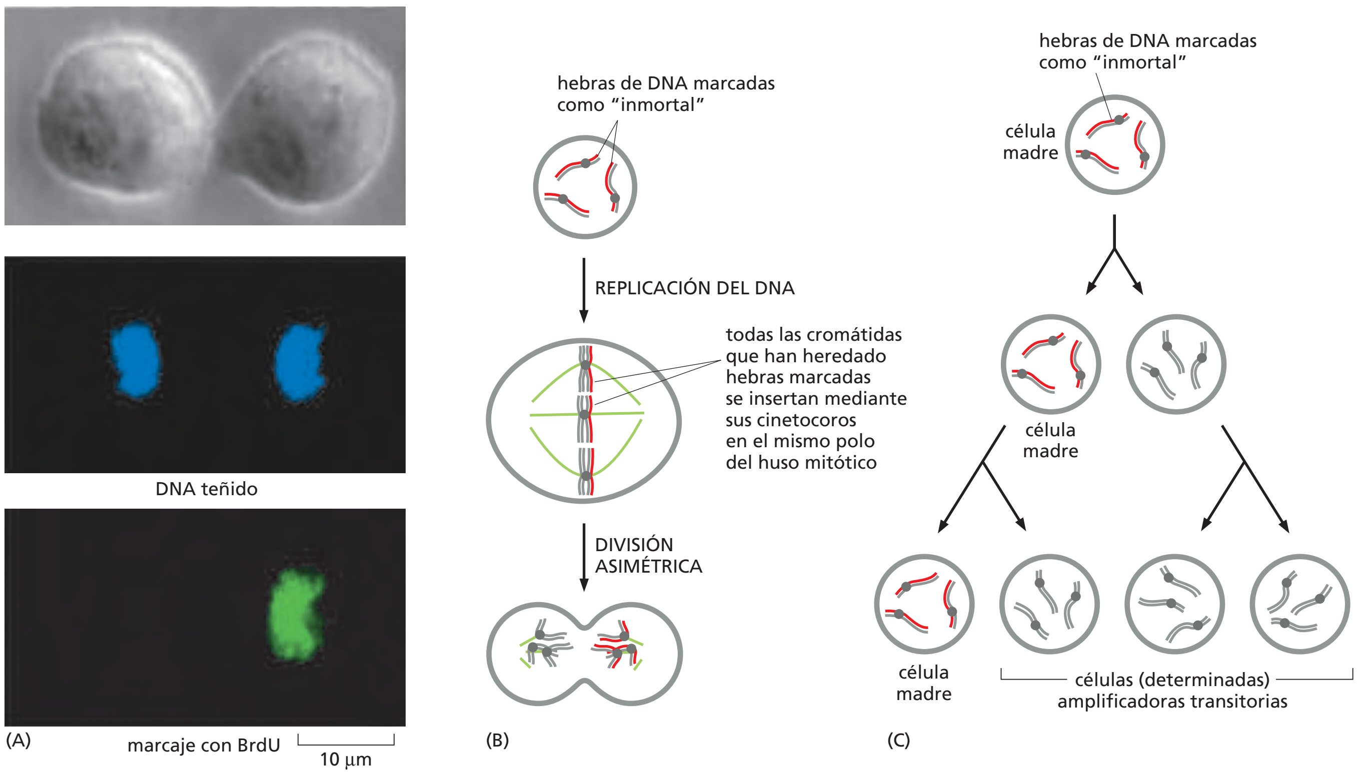


Figura 23–10 La hipótesis de la hebra inmortal. (A) Evidencias experimentales. Se han introducido células madre del músculo esquelético (de la población de células satélite musculares) en un cultivo dejando que se dividan durante 4 días en presencia de BrdU para marcar las hebras de DNA de nueva síntesis. Después se han dejado dividir las células durante 1 día en ausencia de BrdU. Las micrografías muestran un par de células hermanas al final de este proceso y sólo una ha incorporado la BrdU. Este hecho implica que todas las hebras de DNA de los cromosomas que se han sintetizado durante las divisiones celulares, transcurridas en presencia de la BrdU, las ha heredado una sola célula, mientras que todas las hebras de DNA preexistentes o sintetizadas después, las ha heredado la otra célula. Este mecanismo mediante el cual las hebras de DNA antiguas y nuevas se localizan de forma asimétrica en distintas células hijas, se ha observado sólo en poblaciones celulares que tienen células madre. (B) El patrón de herencia de las hebras de DNA en células madre según la hipótesis de la hebra inmortal. Una hebra de cada cromosoma de la célula madre queda marcada de algún modo como hebra inmortal y es retenida por la célula hija que se comporta como célula madre. (C) Esta hebra de DNA inicial permanece disponible durante las siguientes generaciones de células madre y actúa como molde en la formación de cromosomas de las células amplificadoras transitorias. (A, de V. Shinin, B. Gayraud-Morel, D. Gomès y S. Tajbakhsh, *Nat. Cell Biol.* 8: 677-687, 2006. Con autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

partir de una única célula antecesora que había quedado marcada inicialmente. Se han descrito observaciones similares en estudios sobre otros tipos de células madre y, lo que es más importante, no se ha detectado este comportamiento en poblaciones celulares que no poseen células madre. La hipótesis de la hebra inmortal podría explicar no sólo por qué las células madre conservan indefinidamente el DNA marcado, sino que también implica que la división asimétrica es una característica fundamental de las células madre, con el corolario de que cualquier aumento del número de células madre requiere condiciones especiales para conferir la marca de inmortalidad en las hebras de DNA que se sintetizan de nuevo. La hipótesis de la hebra inmortal se propuso inicialmente en la década de 1970 como un mecanismo utilizado por las células madre para evitar la acumulación de mutaciones inductoras de cáncer durante la replicación del DNA. Uno de sus beneficios podría ser la reducción del riesgo de cáncer.

Cuando se necesitan nuevas células con urgencia, la velocidad de división de las células madre puede aumentar considerablemente

Cualquiera que sea el mecanismo de mantenimiento de las células madre, la utilización de divisiones amplificadoras transitorias aporta ciertos beneficios. Primero, esto significa que el número de células madre puede ser reducido y su velocidad de división puede disminuir, incluso cuando tengan que formarse células diferenciadas terminales en grandes cantidades. Este hecho reduce una acumulación excesiva de alteraciones genéticas, ya que la mayor parte de mutaciones tienen lugar durante la replicación del DNA y la mitosis, y las mutaciones que se dan en células distintas de las células madre se eliminan durante la renovación de los tejidos. De este modo la posibilidad de cáncer queda reducida. Si la hipótesis de la hebra inmortal es correcta, de forma que las células madre siempre conservan los moldes de las hebras de DNA inmortales, el riesgo se reduce más todavía, ya que la mayor parte de la secuencia de errores introducidos durante la replicación del DNA se hallará en las hebras recién sintetizadas, que serán eliminadas finalmente en las células madre.

En segundo lugar, y quizás lo más importante, un índice bajo de divisiones de células madre en circunstancias normales puede dar paso a un aumento espectacular cuando se da una necesidad urgente, por ejemplo, en la reparación de heridas. En este caso, las células madre pueden ser estimuladas a dividirse con rapidez y los ciclos de división adicionales pueden amplificar la reserva de células madre y aumentar de forma considerable la produc-

ción de células comprometidas hacia la diferenciación terminal. Así, por ejemplo, cuando se produce una incisión en un fragmento de piel con pelos, las células madre que se dividen lentamente en la región del bulbo de los folículos pilosos supervivientes próximos a la herida se activan hacia una rápida proliferación y algunas de las células derivadas se convierten en nuevas células madre para formar nueva epidermis interfolicular que cubrirá la zona herida de la superficie del cuerpo.

Muchas señales que interaccionan entre sí dirigen la renovación de la epidermis

En la epidermis, la renovación celular parece una cuestión sencilla a primera vista, pero tal como acabamos de ver, esta sencillez es engañosa. Deben controlarse muchos aspectos del proceso de acuerdo con las circunstancias. La velocidad de división de las células madre, la probabilidad de que una célula hija con características de célula madre pueda permanecer como tal, el número de divisiones celulares de las células amplificadoras transitorias, el cronometraje de la salida de la capa basal y el tiempo que tarda la célula en completar su programa de diferenciación y desprenderse de la superficie. La regulación de estas etapas conferirá a la epidermis la capacidad de responder al rozamiento contra superficies rugosas, volviéndose gruesa y áspera, y la capacidad de reparar por sí misma las heridas. En regiones especializadas de la epidermis, como las que forman los folículos pilosos, en las que existen subtipos especializados de células madre, todavía son necesarios más controles.

Cada uno de los puntos de control tiene su importancia y se necesitan numerosas señales moleculares para regularlos, de forma que la superficie del cuerpo se mantenga siempre recubierta de manera apropiada. Tal como se explicó anteriormente, una influencia importante es el contacto con la lámina basal, señalizada a través de integrinas en la membrana plasmática de las células. Si se mantienen en suspensión queratinocitos procedentes de un cultivo, en lugar de empezar a adherirse al fondo de la placa, dejan de dividirse y se diferencian. Parece que para permanecer como célula epidérmica, es necesario (aunque no suficiente) adherirse a la lámina basal o a otra matriz extracelular. Este requisito contribuye a asegurar que el tamaño de la población de células madre no aumenta sin límite. Si se desplazan de su nicho habitual hacia la lámina basal, las células pierden su carácter de células madre. Cuando se rompe esta regla, como en algunos tipos de cáncer, el resultado puede ser un tumor en continuo crecimiento.

Tanto en la señalización entre las células dentro de la propia epidermis, como en la señalización entre la epidermis y la dermis se hallan implicados la mayor parte de los mecanismos de comunicación celular descritos en el Capítulo 15. Participan las vías de señalización de EGF, FGF, Wnt, Hedgehog, Notch, BMP/TGFβ y de las integrinas (lo cual, como se tratará más adelante, también ocurre en la mayor parte de los tejidos). Por ejemplo, una sobreactivación de la vía Hedgehog puede provocar que las células epidérmicas sigan dividiéndose una vez hayan abandonado la capa basal, y las mutaciones en los componentes de esta vía son responsables de muchos tipos de cáncer epidérmico. Al mismo tiempo, la señalización Hedgehog contribuye a seguir la opción de la vía diferenciada: una deficiencia en la señalización Hedgehog provoca la pérdida de glándulas sebáceas, mientras que un exceso puede provocar un desarrollo de dichas glándulas en zonas donde nunca se habían formado. De forma parecida, la pérdida de la señalización Wnt provoca el bloqueo del desarrollo del folículo piloso, mientras que una activación excesiva de esta vía conduce a la formación y crecimiento en exceso de dichos folículos dando lugar a tumores.

Por el contrario, la señalización Notch parece restringir el tamaño de la población de células madre, inhibiendo a las células adyacentes de células madre a que permanezcan como células madre e induciéndolas a convertirse en células amplificadoras transitorias. El TGFβ representa una función esencial en la señalización de la dermis, durante la reparación de las heridas cutáneas, y favorece la formación del tejido cicatricial rico en colágena. Las funciones exactas de cada uno de los distintos mecanismos de señalización en la epidermis solamente están empezando a clarificarse.

La glándula mamaria experimenta ciclos de desarrollo y regresión

En regiones especializadas de la superficie del cuerpo, a partir de la epidermis embrionaria, se desarrollan varios tipos de células. Concretamente, diferentes secreciones tales como el

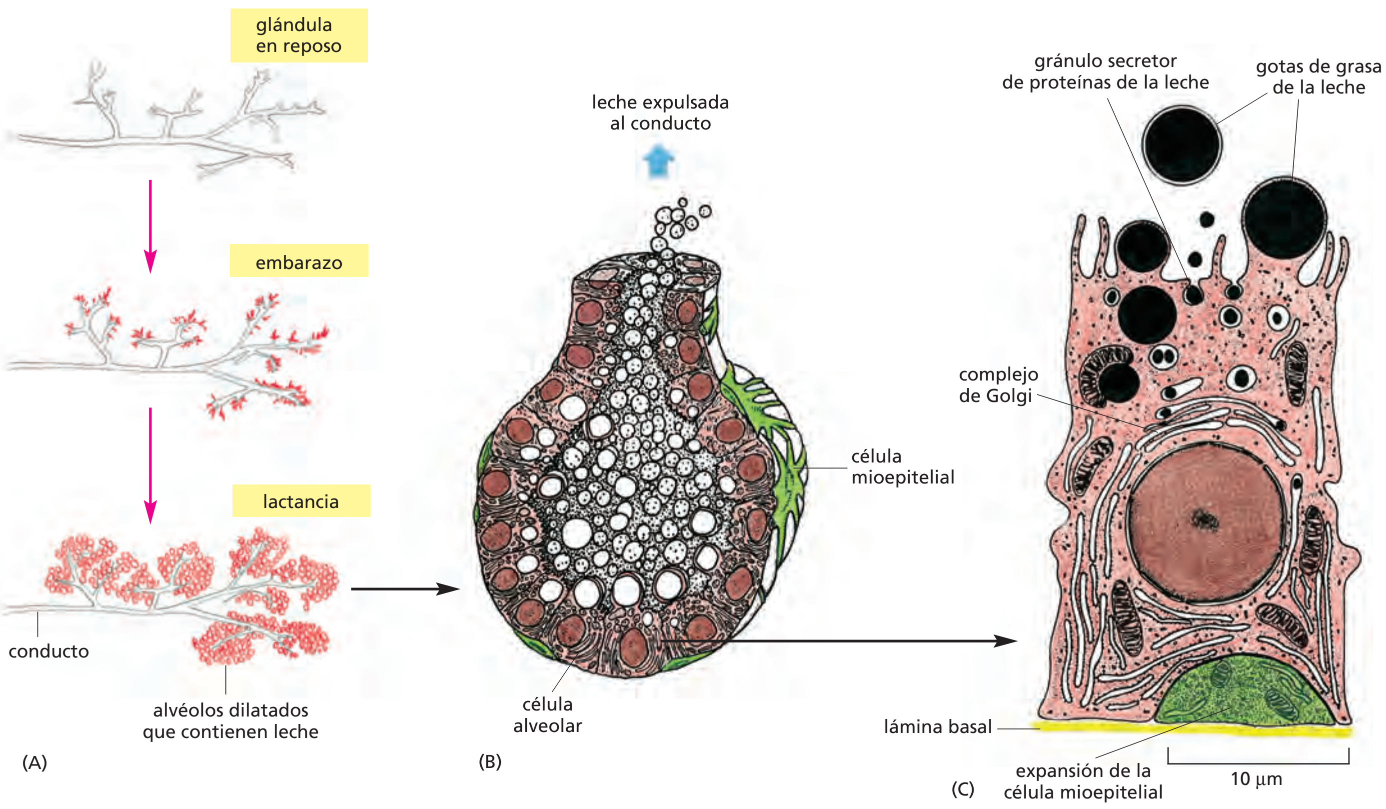


Figura 23–11 La glándula mamaria. (A) Crecimiento de los alvéolos a partir de los conductos de la glándula mamaria durante el embarazo y la lactancia. Sólo se muestra una pequeña parte de la glándula. La glándula "en estado de reposo" contiene una pequeña cantidad de tejido glandular inactivo envuelto por una gran cantidad de tejido conjuntivo adiposo. Durante el embarazo tiene lugar una intensa proliferación del tejido glandular a expensas del tejido conjuntivo adiposo y se desarrollan porciones secretoras de la glándula que generan alvéolos. (B) Uno de los alvéolos de la glándula mamaria secretores de leche con una red de células mioepiteliales contráctiles (*verde*) a su alrededor (véase también la Figura 23–47 E). (C) Una única clase de células alveolares secretoras producen tanto las proteínas como la grasa de la leche. Las proteínas se segregan por exocitosis, mientras que la grasa se libera en forma de gotitas rodeadas de membrana plasmática que se desprenden de la célula. (B, según R. Krstić, Die Gewebe des Menschen und der Säugetiere. Berlin: Springer-Verlag, 1978; C, de C.W. Fawcett, A Textbook of Histology, 12.ª ed. Nueva York: Chapman and Hall, 1994.)

sudor, las lágrimas, la saliva y la leche se producen en células situadas en glándulas profundas, que se originan como invaginaciones de la epidermis. Dichas estructuras epiteliales tienen patrones de renovación distintos a los de las regiones queratinizadas.

La glándula mamaria es las más grande y excepcional de los órganos de secreción. Constituye una característica esencial de los mamíferos y resulta importante desde muchos puntos de vista: no sólo en lo que se refiere a la alimentación de los bebés sino también como elemento básico de una gran industria –la industria láctica– y como la zona de algunas de las formas de cáncer más comunes. El tejido mamario ilustra de manera relevante el hecho de que los procesos de desarrollo continúan en el individuo adulto, y muestra cómo la muerte celular por apoptosis permite ciclos de crecimiento y regresión.

La producción de leche debe iniciarse cuando ha nacido un bebé y debe terminar cuando éste es destetado. Durante el embarazo, se generan las células productoras de la fabricación de la leche; en el momento del destete, se destruyen. Una glándula mamaria adulta "en reposo" está formada por un sistema ramificado de conductos excretores rodeados de tejido adiposo; éstos constituyen la futura red de conductos que transportan la leche hasta el pezón. Los conductos están revestidos por un epitelio que contiene una subpoblación de células madre de glándula mamaria. Estas células madre pueden identificarse mediante un test funcional, en el que se disocian las células del tejido mamario, se separan según los marcadores de superficie que expresan y se vuelven a transplantar en un tejido huésped apropiado (un sustrato de grasa mamaria). Este experimento demuestra que una pequeña parte del total de células epiteliales posee un potencial de células madre. Considerando una proporción de una de cada 5000 células del total de la población epitelial mamaria, y una mayor concentración en una población que exprese determinados marcadores, una sola de estas células puede proliferar de forma indefinida y dar lugar a una glándula mamaria completa con todos los tipos de células epiteliales. Esta glándula reconstituida es capaz de desarrollar por completo el programa de diferenciación necesario para la producción de leche. Como primer paso en la producción de leche, las hormonas esteroideas que circulan por la sangre durante el embarazo (estrógenos y progesterona) hacen que las células de los conductos proliferen, aumentando en número varios cientos de veces. Las porciones terminales de los conductos crecen y se ramifican, formando pequeñas bolsas dilatadas, o alvéolos, que contiene células secretoras (**Figura 23–11**), mediante un proceso que depende de la activación local de la vía de señalización Wnt. La secreción de leche se inicia sólo cuando, tras el naci-

miento del bebé, dichas células son estimuladas por distintas combinaciones de hormonas circulantes de la madre, especialmente prolactina de la glándula pituitaria. La prolactina se une a los receptores de superficie de las células epiteliales mamarias y de este modo activa una vía que desencadena la expresión de los genes que codifican las proteínas de la leche. Como ocurre en la epidermis, la señalización de la matriz extracelular mediada por integrinas también es esencial; las células productoras de leche únicamente responden a la prolactina si se hallan en contacto con la lámina basal. Otro nivel adicional de control hormonal dirige la secreción real de leche en la mama: el estímulo de la succión provoca que las células del hipotálamo (en el cerebro) liberen la hormona *oxitocina*, que circula por el torrente sanguíneo hasta llegar a las *células mioepiteliales*. Estas células, similares en su naturaleza a las células musculares, se forman a partir de la misma población epitelial precursora de las células secretoras de la mama y presentan delgadas expansiones que rodean los alvéolos. Como respuesta a la oxitocina se contraen y vierten así el contenido de los alvéolos hacia los conductos.

Finalmente, cuando el bebé es destetado y cesa la succión, las células secretoras mueren por apoptosis y la mayor parte de los alvéolos desaparecen. Rápidamente, los macrófagos limpian y extraen las células muertas, las metaloproteasas de la matriz extracelular degradan los excedentes de matriz extracelular y la glándula revierte a su estado de reposo. Este proceso de finalización de la lactancia parece que es inducido por la acumulación de leche, más que por un mecanismo hormonal. Si una parte de los conductos mamarios se obstruye de forma que no se puede segregar la leche, las células secretoras que la suministran se suicidan por apoptosis, mientras otras regiones de la glándula sobreviven y continúan su función. La apoptosis se desencadena por una compleja serie de factores que se acumulan donde la secreción de leche queda bloqueada.

En la glándula mamaria en crecimiento, la división celular viene regulada no sólo por hormonas sino también por señales locales que se transmiten en el interior del epitelio y entre las células epiteliales y el tejido conjuntivo, o *estroma*, donde se hallan inmersas las células epiteliales. Todas las señales que hemos descrito como importantes en el control de la renovación celular de la epidermis también se hallan implicadas en el control de estos procesos en la glándula mamaria. De nuevo, las señales emitidas vía integrinas desempeñan un papel crucial: las células epiteliales desprovistas de las adhesiones a la lámina basal que activan la señalización de las integrinas no llegan a responder normalmente frente a las señales de tipo hormonal. En las formas más comunes de cáncer subyacen defectos en estos sistemas de control de las interacciones, por lo que es necesario comprenderlos mejor.

Resumen

La piel está formada por un potente tejido conjuntivo, la dermis, cubierta por una serie de capas epiteliales impermeables, la epidermis. La epidermis se renueva continuamente a partir de las células madre, con un intervalo de renovación, en humanos, del orden de un mes. Las células madre, por definición, no están diferenciadas de forma terminal y tienen la capacidad de dividirse durante toda la vida del organismo. Parte de su descendencia se diferencia mientras que la otra parte de células permanecen como células madre. Las células madre epidérmicas se encuentran en la capa basal, adheridas a la lámina basal; en condiciones normales su velocidad de división es baja. La estirpe que queda destinada a la diferenciación sufre una serie de divisiones amplificadoras transitorias rápidas en la capa basal, y entonces cesa de dividirse y se desplaza hacia la superficie de la piel. Se diferencian de forma progresiva y expresan inicialmente un conjunto de queratinas que va variando hasta llegar a expresar otras queratinas diferentes. Finalmente, sus núcleos degeneran, produciendo una capa externa de células muertas queratinizadas que se descaman continuamente de la superficie.

El destino de las células derivadas de una célula madre está controlado en parte por las interacciones con la lámina basal mediada por integrinas y por señales de las células adyacentes. Algunos tipos de células madre también pueden estar programadas internamente para una división asimétrica dando lugar a una célula hija con características de célula madre y a una célula hija comprometida a una posterior diferenciación; este fenómeno puede implicar una segregación del molde "inmortal" inicial de las hebras de DNA en las células hijas que se comportan como células madre. Sin embargo, durante los procesos de reparación de heridas, los controles ambientales permiten la formación de dos células madre a partir de una sola y pueden desencadenar aumentos considerables en la división de las células madre. Los factores del tipo de las proteínas señalizadoras Wnt y Hedgehog no sólo regulan la velocidad de la división celular según se necesite, sino que tam-

bién dirigen la especialización de las células epidérmicas en la formación de estructuras como los folículos y las glándulas sebáceas. Estos y otros órganos conectados con la epidermis, como las glándulas mamarias, tienen sus propias células madre y sus propias pautas de renovación celular. En la mama, por ejemplo, las hormonas circulantes estimulan la proliferación celular, la diferenciación y la elaboración de leche; el cese de la succión desencadena la muerte por apoptosis de las células secretoras de leche, como respuesta a una combinación de factores que se acumulan en los lugares donde la leche debe ser expulsada al exterior.

LOS EPITELIOS SENSORIALES

Captamos los olores, los sonidos y la visión del mundo exterior gracias a otra clase de especializaciones del epitelio que recubre nuestra superficie corporal. Todos los tejidos sensoriales de la nariz, los oídos y los ojos– y de hecho el conjunto del sistema nervioso central si retrocedemos hacia el origen del embrión temprano– aparecen de una misma capa de células, el *ectodermo,* que da lugar a la epidermis. Estas estructuras tienen algunas características en común y su desarrollo está dirigido por sistemas relacionados de genes (descrito en el Capítulo 22). Todos ellos conservan una organización epitelial, aunque muy distinta a la de la epidermis ordinaria o a la de las glándulas que se derivan de ella.

La nariz, el oído y el ojo son órganos complejos, con mecanismos complejos que permiten captar señales del exterior y transferirlas, filtradas y concentradas, a los epitelios sensoriales, donde pueden actuar en el sistema nervioso. En cada órgano, el componente clave es el epitelio sensorial, a pesar de que es pequeño en relación a todo el aparato auxiliar. Es la parte que más se ha conservado durante la evolución, no sólo de unos vertebrados a otros, sino también entre vertebrados e invertebrados.

En cada epitelio sensorial existen células sensoriales que actúan como *transductores*, que convierten los estímulos procedentes del exterior en una señal eléctrica que puede ser interpretada por el sistema nervioso. En la nariz, los transductores sensoriales son *neuronas sensoriales olfatorias*; en el oído, *células ciliadas auditivas*, y en el ojo, *fotorreceptore*s. Todos estos tipos celulares son neuronas o células similares a neuronas. Cada una de ellas presenta en su extremo apical una estructura especializada que detecta el estímulo externo y lo convierte en un cambio del potencial de membrana. En su extremo basal, cada célula establece sinapsis con neuronas que transmiten la información sensorial a zonas específicas del cerebro.

Las neuronas olfatorias se reemplazan continuamente

En el epitelio olfatorio de la nariz (**Figura 23–12**A), se diferencia un subgrupo de células epiteliales formando las denominadas **neuronas sensitivas olfatorias**. Estas células están modificadas: presentan cilios inmóviles en las superficies libres (véase Figura 15–46), contienen proteínas receptoras olfativas y un único axón que se extiende desde su extremo basal hasta el cerebro (Figura 23–12B). Las *células de sostén,* que ocupan el epitelio engrosado y presentan propiedades parecidas a las de las células de la glía en el sistema nervioso central, mantienen las neuronas en su lugar y a la vez quedan separadas entre sí. Las áreas sensitivas se mantienen húmedas y protegidas por una capa de líquido segregado por unas células que se agrupan en glándulas y que se comunican con la superficie expuesta. A pesar

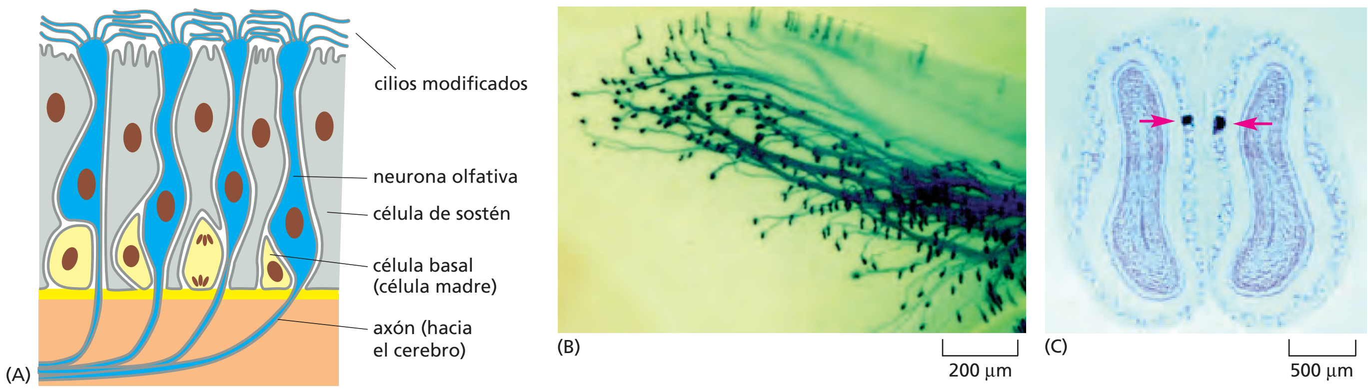


Figura 23–12 Epitelio olfativo y neuronas olfativas. (A) El epitelio olfativo está compuesto por células de soporte, células basales y neuronas sensoriales olfativas. Las células basales son las células madre que generan neuronas olfativas. Del extremo apical de cada neurona olfativa sobresalen entre seis y ocho cilios modificados, los cuales contienen los receptores del olfato. (B) Esta micrografía muestra neuronas olfativas en la nariz de un ratón modificado genéticamente: el gen que codifica LacZ se ha insertado en un locus del receptor olfativo de modo que todas las células que normalmente expresarían este receptor, ahora sintetizan la enzima β-galactosidasa. La β-galactosidasa se detecta por la formación de un producto azul de la reacción enzimática que cataliza. Los somas de las neuronas olfativas marcadas (*azul oscuro*), que se encuentran diseminados por todo el epitelio olfativo, envían sus axones (*azul claro*) hacia el cerebro (fuera de la imagen, a la derecha). (C) Corte transversal de los bulbos olfativos *izquierdo* y *derecho*, con una tinción de β-galactosidasa. Los axones de todas las neuronas olfativas que expresan el mismo receptor olfativo, convergen en el mismo glomérulo (*flechas rojas*) situado simétricamente en los bulbos de las regiones *derecha* e *izquierda* del cerebro. Otros glomérulos (no teñidos) reciben estímulos de las neuronas olfativas que expresan otros receptores olfativos (B y C, de P. Mombaerts et al., *Cell* 87:675-686, 1996. Con la autorización de Elsevier.)

de esta protección, cada neurona olfatoria solamente sobrevive uno o dos meses. Un tercer tipo de células –las *células basales*– se localizan en el epitelio y generan la sustitución de las neuronas olfatorias que se van perdiendo. La población de células basales que se hallan en contacto con la lámina basal contiene las células madre para la producción de nuevas neuronas.

Tal como se describió en el Capítulo 15, el genoma contiene un número considerable de genes receptores olfativos –alrededor de 1000 en el ratón o el perro, y unos 350 (y muchos más que han degenerado y no son funcionales) en el hombre. Lo más probable es que cada neurona olfatoria sólo exprese uno de estos genes, posibilitando que la célula pueda responder a un tipo concreto de olor producido por lo general por pequeñas moléculas orgánicas con alguna característica estructural en común, que es reconocida por la proteína receptora olfativa. Pero respecto al olor, cada neurona olfativa responde de la misma forma: envía una serie de potenciales de acción que, a lo largo del axón, van hasta el cerebro. No obstante, la sensibilidad de discriminación de cada neurona olfatoria sólo es útil si su axón manda sus mensajes a la estación transmisora adecuada del cerebro, la que está dedicada al rango de olores que capta la neurona. Estas estaciones transmisoras se denominan *glomérulos*. Están localizados en estructuras denominadas bulbos olfatorios (uno a cada lado del cerebro), cada uno de los cuales tiene unos 1800 glomérulos (en el ratón). Las neuronas olfatorias que expresan un mismo receptor de olor se hallan ampliamente distribuidas por todo el epitelio olfatorio, aunque todos sus axones convergen en el mismo glomérulo (Figura 23–12C). Cada una de las nuevas neuronas olfatorias generada para reemplazar otra neurona que muere, tiene que enviar su axón al glomérulo correcto. Las proteínas receptoras de olor tienen una segunda función: guían los conos de crecimiento de los nuevos axones a lo largo de vías específicas hacia los glomérulos diana apropiados del bulbo olfatorio. Si no fuera por la continua actuación de este sistema de guía, una rosa podría oler un mes a limón y al mes siguiente a pescado putrefacto.

Las células ciliadas del oído tienen que durar toda la vida

El epitelio sensitivo responsable de la audición es el tejido diseñado de forma más exacta y minuciosa de todos los del cuerpo (**Figura 23–13**). Sus células sensitivas, las **células ciliadas del oído**, están situadas en una rígida red de células de sostén y están recubiertas por una masa de matriz extracelular (la membrana tectorial) formando una estructura denominada el *órgano de Corti*. Las células ciliadas transforman los estímulos mecánicos en señales eléctricas. Cada célula tiene unos microvilli gigantes característicos (estereocilios) en forma de tubos de órgano que sobresalen de la superficie como bastones rígidos, y que presentan filamentos de actina interconectados en su interior y ordenados en hileras de altura escalonada. Las dimensiones de cada una de estas estructuras son extraordinariamente específicas, en función de la localización de cada célula ciliada en el oído y de la frecuencia del sonido a la que tiene que responder. Las vibraciones de sonido hacen vibrar el órgano de Corti provocando una inclinación de los estereocilios (**Figura 23–14**) y abriendo de forma mecánica los canales iónicos de las membranas de los estereocilios (**Figura 23–15**). El flujo de carga eléctrica que se transporta al interior de la célula en forma de iones, modifica el potencial de

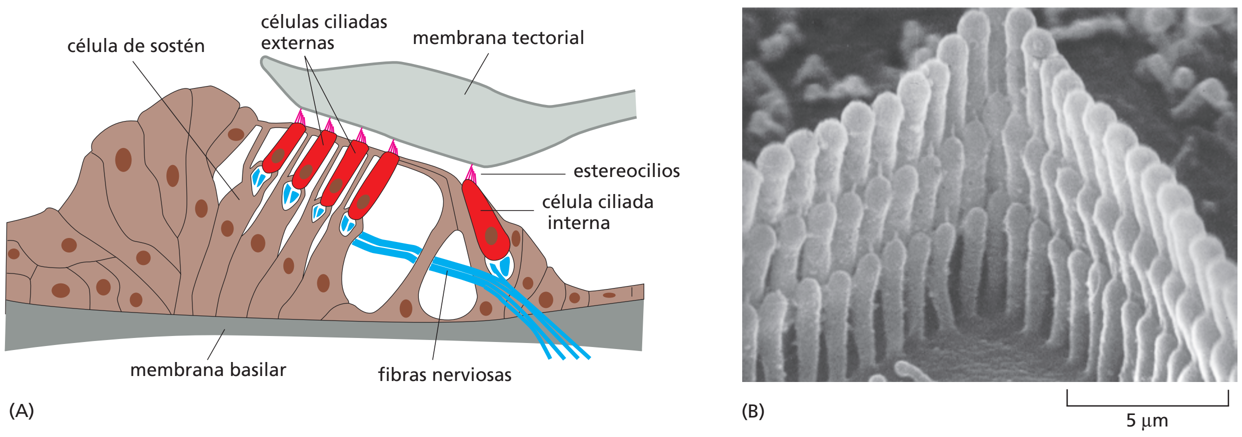


Figura 23–13 Células ciliadas del oído. (A) Esquema de la sección transversal del aparato auditivo (el órgano de Corti) en el oído interno de un mamífero, en el que se observan las células ciliadas auditivas situadas en una intrincada estructura epitelial de células de sostén y recubiertas por una masa de matriz extracelular (la membrana tectorial). El epitelio que tienen las células ciliadas se encuentra en la membrana basilar: una capa delgada y elástica de tejido que forma una separación larga y estrecha entre dos canales llenos de fluido. El sonido da lugar a oleadas de presión en estos canales y hace vibrar la membrana basilar hacia arriba y hacia abajo. (B) Esta electromicrografía de barrido muestra la superficie apical de una célula ciliada auditiva externa, con la ordenación característica en hileras de los microvilli gigantes (estereocilios). Las células ciliadas internas, de las cuales sólo existen 3500 en cada oído humano, son los principales receptores auditivos. Las células ciliadas externas, aproximadamente cuatro veces más numerosas, forman parte de un mecanismo retroactivo que regula el estímulo mecánico transferido a las células ciliadas internas. (B, de J.D. Pickles, *Prog. Neurobiol.* 24:1-42, 1985. Con la autorización de Elsevier.)

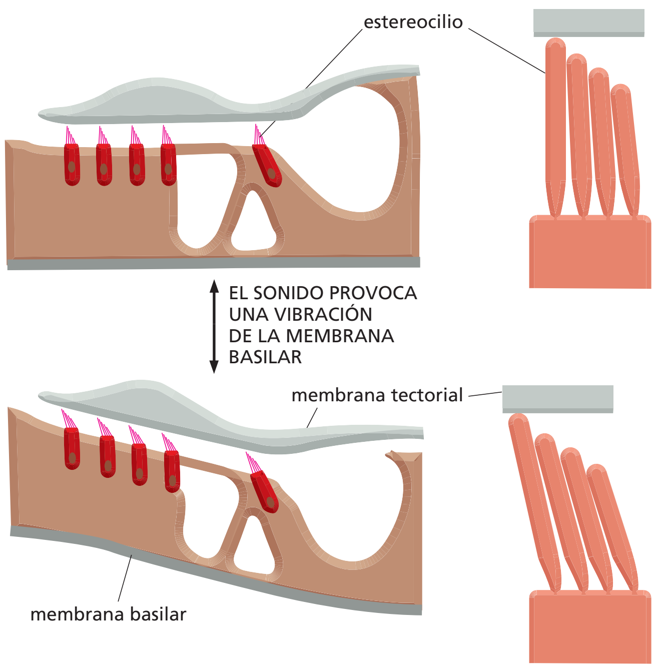


Figura 23–14 De qué forma un desplazamiento relativo de la matriz extracelular superpuesta (la membrana tectorial) inclina los estereocilios de las células ciliadas del oído en el órgano de Corti del oído interno de un mamífero. Los estereocilios actúan como bastones rígidos unidos, articulados en su base y agrupados en sus extremos.

membrana controlándose así a la liberación de neurotransmisor en el extremo basal de la célula, donde se establece sinapsis con una terminación nerviosa. <TCCA> <CATA>

En el hombre y en otros mamíferos las células ciliadas del oído, a diferencia de las neuronas olfatorias, tienen que durar toda la vida. Si se destruyen por alguna enfermedad, por toxinas o por ruido demasiado fuerte, no se regeneran, por lo que la pérdida de audición re-

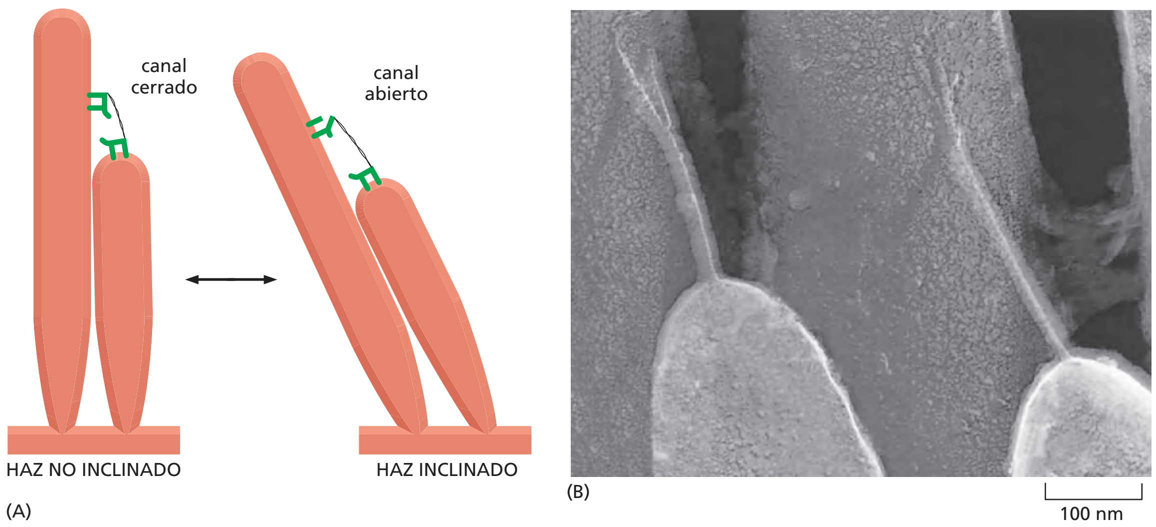


Figura 23–15 Cómo funciona una célula ciliada sensorial. (A) La célula actúa como un transductor, generando una señal eléctrica en respuesta a las vibraciones de sonido que hacen vibrar el órgano de Corti, lo que provoca la inclinación de los estereocilios. Un filamento delgado se eleva más o menos en vertical desde el extremo de cada estereocilio inferior y se adhiere a un punto más elevado en el cilio adyacente más alto. La inclinación del haz tensa los filamentos, que tiran mecánicamente de los canales iónicos cerrados de la membrana de los estereocilios. La apertura de estos canales permite un flujo de carga positiva, que despolariza la célula ciliada. (B) Electromicrografía de los filamentos que se extienden desde los extremos de dos estereocilios. Cada filamento consta, al menos en parte, de elementos de la superfamilia de las cadherinas, moléculas de adhesión célula-célula. Los individuos mutantes que no presentan estas cadherinas específicas, carecen de filamentos y son sordos.

Utilizando sistemas mecánicos de medida, extraordinariamente precisos, y grabaciones eléctricas de una sola célula ciliada al desviarse el haz de estereocilios por el efecto de la presión de una sonda de vidrio flexible, es posible detectar una variación de la inclinación del haz al ceder los canales cerrados de forma mecánica a la fuerza aplicada y abrirse por la presión. De este modo se puede mostrar que la fuerza necesaria para abrir uno solo de los canales hipotéticos es aproximadamente de 2×10^{-13} newtons y que al abrirse deja una distancia de unos 4 nm. El mecanismo es sorprendentemente sensible: se ha estimado que el sonido más leve que podemos oír, que pueda extender los filamentos, tiene como promedio 0,04 nm, lo cual está justo por debajo de la mitad del diámetro de un átomo de hidrógeno. (B, de B. Kachar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 97: 13336-13341, 2000. Con la autorización de National Academy of Sciences.)

sultante es permanente. Sin embargo, en otros vertebrados la destrucción de las células ciliadas del oído desencadena la división de las células de soporte que se comportan como células madre, generando una estirpe que se puede diferenciar, reemplazando las células ciliadas que se han perdido. Si algún día llegamos a comprender mejor cómo se regula este proceso de regeneración, también conseguiremos inducir en los humanos la autorreparación del epitelio del oído.

En la actualidad se conoce un tratamiento que puede incidir en la regeneración parcial de las células ciliadas del oído en mamíferos adultos. La técnica utiliza un virus (un adenovirus) manipulado para que contenga una copia del gen *Atoh 1*, que codifica una proteína reguladora génica, la cual dirige la diferenciación de las células ciliadas durante el desarrollo. Cobayas que se han vuelto sordas por exposición a una toxina, que destruye las células ciliadas, pueden tratarse mediante una inyección de esta construcción vírica en el oído dañado. Muchas de las células de sostén supervivientes quedan así infectadas por el virus y expresan *Atoh1*. Este hecho las transforma en células ciliadas funcionales y el animal recupera parcialmente la audición en el oído tratado.

La mayoría de las células permanentes renuevan sus componentes: las células fotorreceptoras de la retina

La retina neural es el más complejo de los epitelios sensoriales. Comprende una serie de capas de células organizadas de una forma aparentemente perversa. Las neuronas que transmiten señales desde el ojo hasta el cerebro (denominadas *células ganglionares de la retina*) se localizan cercanas al exterior, de forma que la luz, concentrada por el cristalino, tiene que pasar a través de ellas hasta alcanzar las células fotorreceptoras. Los **fotorreceptores**, que se clasifican según su forma en *conos* y *bastones*, mantienen sus extremos fotorreceptores, o segmentos externos, parcialmente inmersos en el *epitelio pigmentario* (**Figura 23–16**). Los conos y bastones contienen distintos *pigmentos visuales* –complejos fotosensibles formados por la proteína *opsina* y la pequeña molécula que absorbe la luz *retinal*. Los bastones, cuyo pigmento visual es la *rodopsina*, son especialmente sensibles a los niveles bajos de luz, mientras que los conos (de los cuales en el hombre existen tres tipos, cada uno de ellos con

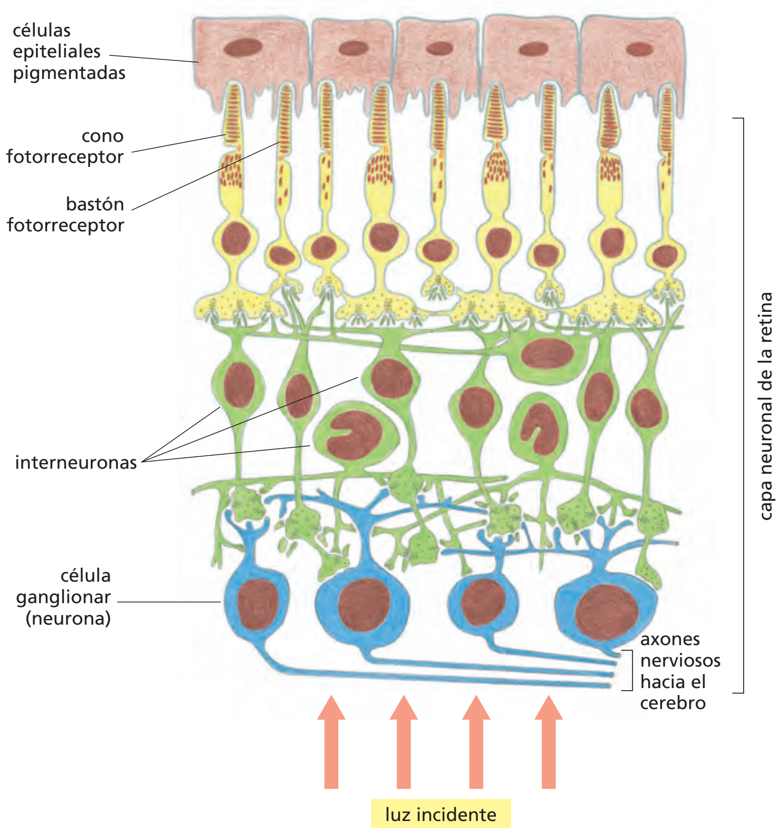


Figura 23–16 Estructura de la retina. Cuando la luz estimula los fotorreceptores, la señal eléctrica resultante se transmite por medio de las interneuronas hacia las células ganglionares, que envían la señal al cerebro. Una población de células de sostén especializadas (que no aparecen en la figura) ocupa los espacios entre las neuronas y los fotorreceptores en la retina neuronal. (Modificado a partir de J.E. Dowling y B.B. Boycott, *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 166:80-111, 1966. Con autorización de Royal Society).

una opsina distinta, lo que proporciona una respuesta espectral diferente) detectan los colores y los detalles más pequeños.

Al parecer el segmento externo de un fotorreceptor es un cilio modificado, que presenta una ordenación característica de microtúbulos similar a la de los cilios en la zona de conexión de dicho segmento externo al resto de la célula (**Figura 23–17**). El resto del segmento externo está casi completamente ocupado por un denso apilamiento de membranas en el que se encuentran los complejos fotosensibles; la luz absorbida en dicha zona produce una respuesta eléctrica, tal como se describió en el Capítulo 15. En el extremo opuesto, las células fotorreceptoras forman sinapsis con las interneuronas retinianas, que propagan la señal hasta las células ganglionares de la retina (véase Figura 23–16).

En la especie humana, los fotorreceptores, como ocurre con las células ciliadas del oído, son células permanentes que no se dividen, por lo que si se destruyen por una enfermedad o por un rayo láser mal dirigido, no son reemplazadas. Sin embargo, las moléculas de pigmento visual no son permanentes, sino que se degradan y renuevan de forma continua. En los bastones (aunque curiosamente no en los conos), este recambio se organiza en una secuencia ordenada de producción, que puede analizarse en el interior de las células, siguiendo el trayecto de una serie de moléculas proteicas marcadas radiactivamente después de un breve pulso con un aminoácido radiactivo (**Figura 23–18**). Las proteínas marcadas radiactivamente pueden trazar desde el complejo de Golgi en el segmento interno de la célula, hasta la base de la pila de membranas que ocupa el segmento externo. Desde allí se desplazan de modo gradual hacia el extremo opuesto, a medida que se va incorporando nuevo material en la base de la pila. Por último, una vez alcanzado el extremo del segmento externo (en la rata, al cabo de unos 10 días), las proteínas marcadas y las membranas a las que se han incorporado son fagocitadas (engullidas y digeridas) por las células del epitelio pigmentario.

Este ejemplo ilustra un aspecto general: a pesar de que unas células de un tipo determinado persistan en el tiempo, solamente una parte muy pequeña del organismo adulto está formada por las mismas moléculas que se encontraban en el embrión.

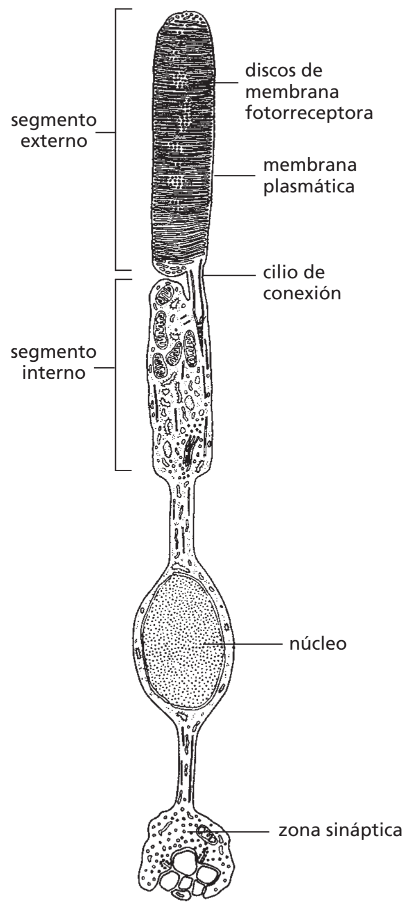


Figura 23–17 Un bastón fotorreceptor.

Resumen

La mayor parte de las células receptoras sensoriales, igual que las células epidérmicas y las células nerviosas, derivan del epitelio que constituye la superficie externa del embrión. Transducen los estímulos externos a señales eléctricas, las cuales transmiten a las neuronas a través de sinapsis químicas. Las células receptoras olfatorias de la nariz son auténticas neuronas, que envían sus axones hasta el cerebro. Tienen una vida media de sólo uno o dos meses, de forma que continuamente son reemplazadas por nuevas células derivadas de las células madre del epitelio olfatorio. Cada neuro-

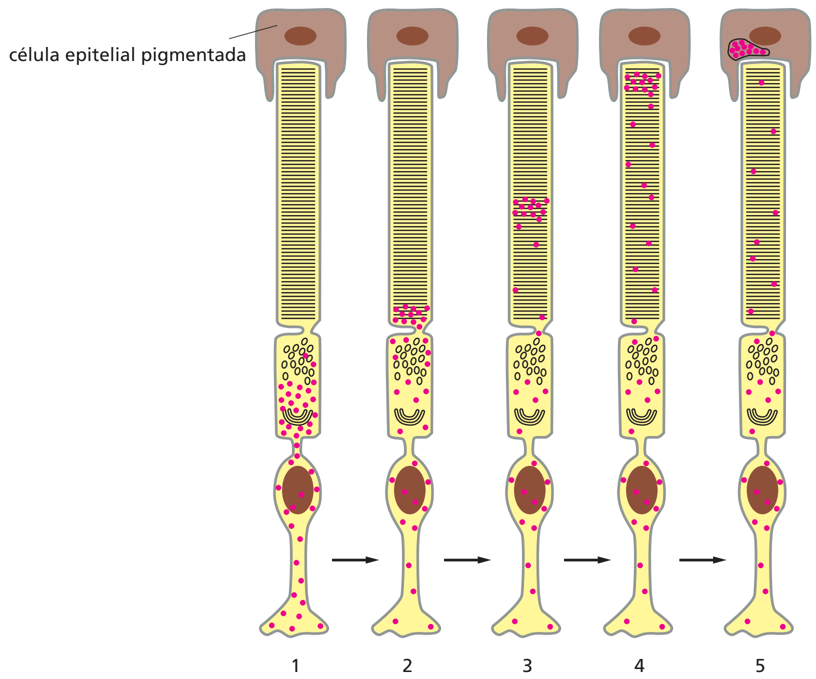


Figura 23–18 Recambio de la proteína de membrana en un bastón. Se administra un pulso de ^{3}H-leucina y se sigue la circulación de las proteínas marcadas a través de la célula, mediante autorradiografía. Los *puntos rojos* indican zonas de radiactividad. El método sólo muestra la ^{3}H-leucina que se ha incorporado a proteínas; el resto desaparece durante la preparación del tejido. (1) La leucina incorporada se concentra primero en la zona del complejo de Golgi. (2) Desde allí pasa a la base del segmento externo, a un disco recién sintetizado de membrana fotorreceptora. (3–5) Los nuevos discos se forman a una velocidad de tres o cuatro por hora (en un mamífero) y desplazan los discos viejos hacia el epitelio pigmentado.

na olfatoria expresa una sola de los cientos de proteínas receptoras olfatorias distintas codificadas por los genes correspondientes. Los axones de todas las neuronas olfatorias que expresan la misma proteína olfatoria se dirigen al mismo glomérulo en el bulbo olfatorio del cerebro.

Las células ciliadas del oído –las células receptoras del sonido– a diferencia de las células receptoras olfatorias, duran toda la vida, al menos en los mamíferos, si bien la expresión artificial de un gen de diferenciación en las células ciliadas, Atoh 1, puede convertir las células de sostén en células ciliadas donde éstas hayan sido destruidas. Las células ciliadas no presentan axón, pero establecen contactos con los nervios terminales en el epitelio del oído. Su nombre viene de los haces de esterocilios (microvilli gigantes) que se hallan en su superficie externa. Las vibraciones de sonido hacen que el haz se incline, lo cual provoca la abertura mecánica de los canales iónicos de los estereocilios. Dicha configuración abierta excita eléctricamente a la célula.

En el ojo, las células fotorreceptoras de la retina absorben fotones en las moléculas del pigmento visual (proteína opsina y retinal) contenidas en las pilas de membranas de los segmentos externos del fotorreceptor, iniciando una excitación eléctrica mediante una vía más indirecta de señalización intracelular. Aunque las células receptoras son permanentes y no se renuevan, las cisternas de membrana ricas en opsina contenidas en dichas células sufren una renovación continua.

LAS VÍAS RESPIRATORIAS Y EL INTESTINO

Los ejemplos descritos representan una pequeña selección de los tejidos y de los tipos celulares que derivan de la capa más externa del embrión: el ectodermo. Sin embargo, son suficientes para ilustrar las diferencias que existen entre todas estas células en cuanto a forma, función, modo de vida y patrón de renovación. La capa más interna del embrión –el *endodermo,* que forma el primitivo tubo digestivo– da lugar a otro conjunto de tipos celulares que tapizan el tubo digestivo y sus derivados. Vamos a empezar con los pulmones.

En los alvéolos de los pulmones, los tipos celulares adyacentes actúan de forma conjunta

Como se describió en el Capítulo 22 (véase Figura 22–92), las vías respiratorias de los pulmones están formadas por ramificaciones repetidas de un sistema de tubos originados en el embrión a partir de una evaginación del revestimiento del intestino. Hileras repetidas de ramificaciones terminan en centenares de millones de sacos llenos de aire: los **alvéolos**. Éstos tienen unas paredes muy finas y adosadas a las paredes de los capilares sanguíneos, lo que facilita el intercambio de O_2 y de CO_2 con el flujo sanguíneo (**Figura 23–19**).

Para sobrevivir, las células que tapizan los alvéolos deben permanecer húmedas. Al mismo tiempo, tienen que actuar como depósitos de gas, de forma que puedan expandirse y contraerse en cada inspiración y expiración. Esta necesidad genera un problema. Cuando dos superficies húmedas se ponen en contacto, quedan adheridas debido a la tensión superficial de la capa de agua que hay entre ambas –efecto que es mucho más intenso cuanto menor es la estructura. De este modo, se corre el riesgo de que los alvéolos se colapsen y sea imposible que se dilaten de nuevo. Para evitarlo, en el revestimiento alveolar se encuentran dos tipos de celulares. Las *células alveolares de tipo I* recubren la mayor parte de la pared: son planas y finas (*escamas*) permitiendo el intercambio de gases. Entre ellas se hallan esparcidas las *células alveolares de tipo II*. Contienen y segregan *surfactante,* un material rico en fosfolípidos que forma una película en las superficies acuosas y reduce su tensión superficial, haciendo que resulte sencillo que los alvéolos se dilaten, incluso cuando se colapsan. La producción en el feto de cantidades adecuadas de surfactante, que en la especie humana empieza a los 5 meses de embarazo, marca el inicio de la posibilidad de vida independiente. Los bebés prematuros que nacen antes de esta etapa no consiguen dilatar sus pulmones y respirar; los que nacen más adelante consiguen hacerlo y bajo cuidados intensivos, sobreviven.

Las células caliciformes, las células ciliadas y los macrófagos colaboran manteniendo limpias las vías respiratorias

En las vías respiratorias superiores encontramos distintas combinaciones de tipos celulares que llevan a cabo distintas funciones. El aire que respiramos está lleno de polvo, suciedad y

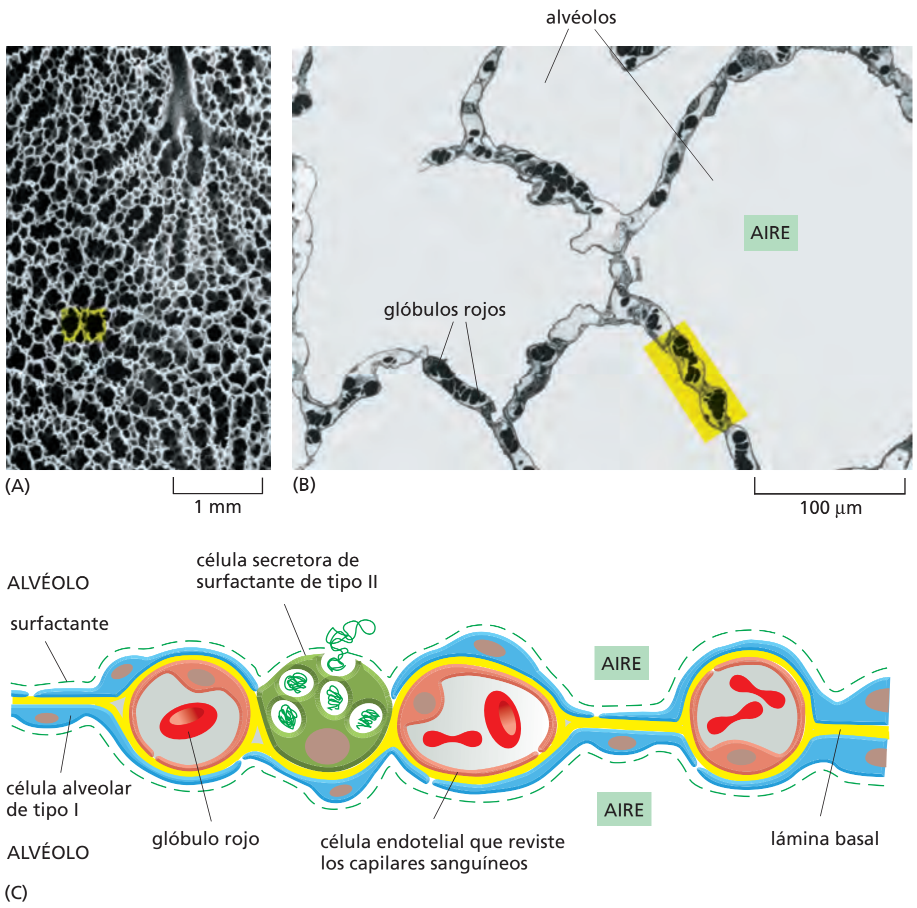


Figura 23–19 Los alvéolos del pulmón. (A) Electromicrografía de barrido a pocos aumentos, en la que se observa la textura esponjosa debido a los numerosos alvéolos llenos de aire. En la parte superior se observa un bronquiolo (una vía respiratoria tubular pequeña), que comunica con los alvéolos. (B) Electromicrografía de transmisión de una sección del pulmón, que contiene una región correspondiente al recuadro en *amarillo* en (A), en el que se observan las paredes alveolares donde tiene lugar el intercambio de gases. (C) Esquema de la arquitectura celular de un fragmento de la pared alveolar, que corresponde al recuadro *amarillo* en (B). (A, de P. Gehr et al., *Resp. Physiol.* 44:61-86, 1981. Con autorización de Elsevier; B, cortesía de Peter Gehr, a partir de D.W. Fawcett, A Textbook of Histology, 12.ª ed. Nueva York: Chapman y Hall, 1994.)

microorganismos. Para mantener los pulmones limpios y sanos deben barrerse de forma constante los deshechos. Para realizar esta tarea, un *epitelio respiratorio* relativamente grueso recubre las vías respiratorias principales (**Figura 23–20**). Este epitelio consiste en tres tipos de células diferenciadas: las *células caliciformes* (denominadas así debido a su forma), que segregan mucus, las *células ciliadas,* con cilios que baten, y un reducido número de *células endocrinas,* que segregan serotonina y péptidos que actúan como mensajeros locales. Estas moléculas señalizadoras llegan hasta las terminaciones nerviosas y otras células adyacentes del tracto respiratorio, de forma que ayudan a regular la velocidad de secreción de mucus y el movimiento ciliar, la contracción de las células musculares vecinas que pueden estrechar las vías respiratorias y otras funciones. También se localizan las células basales, que actúan como células madre en la renovación del epitelio.

El mucus que segregan las células caliciformes forma una funda viscoelástica de unos 5 µm de grosor por encima de los cilios. Los cilios, que baten todos en el mismo sentido a una velocidad de unos 12 golpes por segundo, barren el mucus hacia afuera de los pulmones, transportando los residuos que han quedado pegados a él. Esta cinta transportadora para la extracción de los deshechos del interior de los pulmones se denomina *escalera mucociliada*. Inevitablemente, algunas de las partículas inhaladas alcanzan por sí mismas los alvéolos, donde no hay escalera. En esta zona, las partículas superfluas se extraen mediante otro tipo de células especializadas, los *macrófagos,* que recorren los pulmones engullendo partículas extrañas y eliminando y digiriendo las bacterias. Cada hora, la escalera mucociliada barre fuera de los pulmones varios millones de macrófagos cargados de deshechos.

En el extremo superior del tracto respiratorio, el epitelio respiratorio húmedo cubierto de moco cambia bruscamente a epitelio escamoso pluriestratificado. Dicha capa de células confiere resistencia mecánica y protección y, como en la epidermis, está formada por numerosas capas de células planas densamente empaquetadas que contienen queratina. Se diferencia de la epidermis en que se mantiene húmeda y en que sus células conservan el núcleo incluso en las capas más externas. En otras partes del cuerpo también se localizan cambios bruscos en la especialización de las células epiteliales, como el que existe entre el

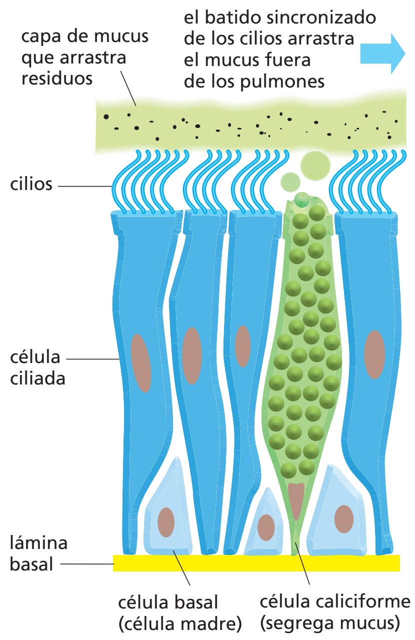


Figura 23–20 Epitelio respiratorio. Células caliciformes secretoras de mucus, que forman una cubierta sobre las células ciliadas. El movimiento regular y sincronizado de los cilios arrastra la mucosidad hacia arriba y al exterior de las vías respiratorias, arrastrando también cualquier residuo que se le adhiera. El mecanismo que coordina el movimiento constituye un misterio pero, al parecer, refleja una polaridad intrínseca en el epitelio. Si a un conejo se le invierte quirúrgicamente un fragmento de tráquea, sigue arrastrando mucus, pero en sentido equivocado, hacia el pulmón, opuesto al de las zonas de la tráquea contiguas que no han sido invertidas.

epitelio escamoso pluriestratificado y el mucoso del tracto respiratorio, pero se sabe muy poco acerca de cómo se forman y cómo se mantienen.

El revestimiento del intestino delgado se renueva más deprisa que cualquier otro tejido

Sólo presentan pulmones los vertebrados de respiración aérea, mientras que todos los vertebrados, y casi todos los invertebrados tienen un intestino, es decir, un tubo digestivo revestido con células especializadas para la digestión del alimento y la absorción de moléculas nutrientes producidas por la digestión. Estas dos funciones son difíciles de llevar a cabo al mismo tiempo, ya que los procesos que intervienen en la digestión de los alimentos en la luz del intestino también son capaces de digerir las células que lo recubren, incluyendo las células que absorben los nutrientes. El intestino utiliza distintas estrategias para resolver este problema.

Los procesos digestivos más violentos, que incluyen la hidrólisis ácida y la actividad enzimática, se desarrollan en un compartimiento separado, el estómago. Los productos resultantes pasan al intestino delgado, donde se absorben los nutrientes y continua la digestión enzimática, aunque a un pH neutro. El revestimiento de las distintas regiones del intestino está constituido por distintas proporciones de tipos celulares. El epitelio del estómago está formado por células que segregan ácido y otras células que segregan enzimas digestivas que actúan a pH ácido. A la inversa, las glándulas (el páncreas en particular) que desemboca en el tramo inicial del intestino delgado contienen células que segregan bicarbonato que neutraliza la acidez, así como otras células que segregan enzimas digestivas que actúan a pH neutro. El revestimiento del intestino, desde la salida del estómago hacia adelante, contiene tanto células absorbentes como células especializadas en la secreción de mucus, que recubre el epitelio con una cubierta protectora. En el estómago, las células mucosas también revisten las superficies más expuestas. En el caso que estas medidas no sean suficientes, el conjunto del revestimiento del estómago y del intestino se renueva continuamente y es reemplazado por células recién formadas, con un intervalo de recambio de una semana o menos.

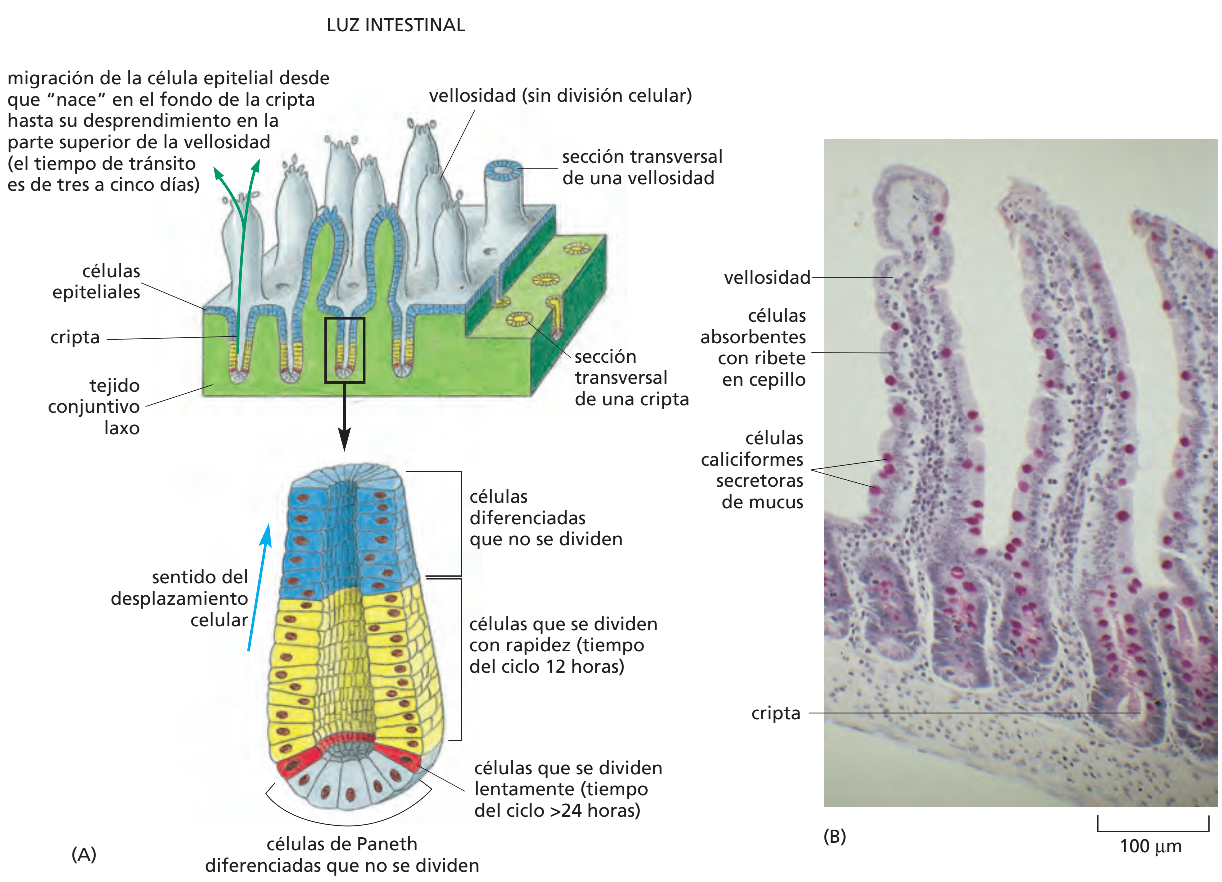


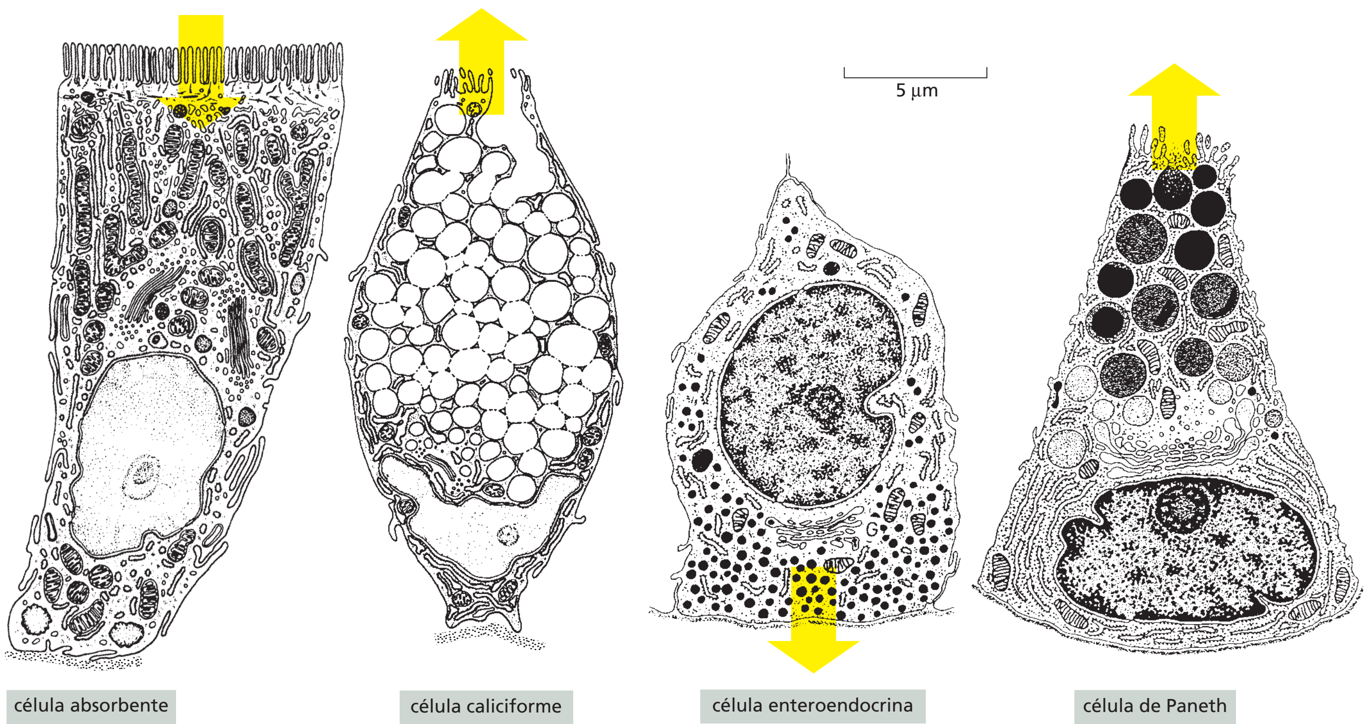
Figura 23–21 Renovación del revestimiento del intestino. (A) Modelo de renovación y proliferación de las células madre del epitelio que forman las paredes del intestino delgado. La *flecha de color* muestra el sentido por lo general ascendente del movimiento celular en la vellosidad, pero algunas células, incluidas algunas de las células caliciformes y enteroendocrinas, quedan al margen y se diferencian mientras todavía están en las criptas. Las células diferenciadas que no se dividen (células de Paneth), situadas en la parte más profunda de las criptas, también tiene una vida limitada y continuamente son sustituidas por la estirpe de las células madre. (B) Fotografía de una sección de una parte de las paredes del intestino delgado, en la que se muestran las vellosidades y las criptas. Véase cómo las células caliciformes secretoras de mucus (teñidas de *rojo*) están intercaladas entre otras clases de células. Las células enteroendocrinas son menos numerosas y más difíciles de identificar sin tinciones especiales. Véase la Figura 23–22 para la estructura de estas células.

El proceso de renovación ha sido mejor estudiado en el intestino delgado (**Figura 23–21**). El revestimiento del intestino delgado (y de otras regiones del intestino) consiste en una capa de epitelio sencillo. Dicho epitelio recubre las superficies de las *vellosidades* que se proyectan hacia la luz del tubo y reviste las *criptas* que se adentran en el tejido conjuntivo subyacente. Las células madre que se dividen se hallan en una zona protegida en el interior de las criptas. Dichas células generan cuatro tipos de estirpes (**Figura 23–22**):

1. Las *células absorbentes* (también denominadas *células con borde en cepillo* o *enterocitos*) presentan microvilli densamente empaquetados en su superficie libre que aumentan el área de superficie activa en la captación de nutrientes. Absorben nutrientes y segregan (o transportan a las superficies externas) enzimas hidrolíticas que llevan a cabo alguna de las etapas finales de la digestión extracelular, disgregando las moléculas de alimento como preparación para su transporte a través de la membrana.
2. Las *células caliciformes* (como en el epitelio respiratorio) segregan mucus.
3. Las *células de Paneth* forman parte del sistema innato de defensa inmune (descrito en el Capítulo 24) y segregan (junto con algunos factores de crecimiento) *criptidinas* –proteínas de la familia de las defensinas que eliminan bacterias (véase Figura 24–46).
4. *Células enteroendocrinas*, con más de 15 subtipos distintos, que segregan serotonina y hormonas peptídicas, como la colecistoquinina (CCK: ***cholecystokinin***), que actúa sobre neuronas y otros tipos celulares del intestino y otros tejidos. Por ejemplo, la colecistoquinina es segregada por las células enteroendocrinas como respuesta a la presencia de nutrientes en el intestino y se une a los receptores de las terminaciones nerviosas sensoriales cercanas, que emiten una señal al cerebro para detener la sensación de hambre después de haber comido lo suficiente.

Las células absorbentes, las caliciformes y las enteroendocrinas se trasladan mayoritariamente por encima de la región de las células basales, mediante un movimiento de deslizamiento en el plano de la capa epitelial, recubriendo las superficies de las vellosidades. De forma análoga a la epidermis, se cree que las células precursoras de la cripta que proliferan más rápido están en una fase amplificadora transitoria, una vez comprometidas para la diferenciación, pero experimentando varias divisiones en su camino hacia el exterior de la cripta antes de cesar de dividirse y diferenciarse de forma terminal. A los 2–5 días (en el ratón) de emerger de las criptas, las células alcanzan los extremos de las vellosidades, donde sufren los estadios iniciales de la apoptosis y finalmente se desprenden hacia la luz del conducto. Las células de Paneth se generan en cantidades mucho más pequeñas y presentan un

Figura 23–22 Los cuatro tipos principales de células en diferenciación que se encuentran en la pared epitelial del intestino delgado. Los cuatro tipos se generan a partir de las células madre pluripotenciales no diferenciadas que se encuentran en la parte inferior de las criptas (véase la Figura 23–21). Los microvilli de la superficie apical de la célula absorbente (con el ribete en cepillo) hacen que la superficie de la zona se multiplique por treinta, no sólo en cuanto a la internalización de nutrientes sino también en el anclaje de las enzimas que intervienen en las fases finales de la digestión extracelular, fragmentando los péptidos pequeños y los disacáridos en monómeros que pueden ser transportados a través de la membrana celular. Las flechas anchas *amarillas* indican el sentido de la secreción o de la captación de productos en cada tipo celular. (A partir de T.L. Lentz, Cell Fine Structure. Philadelphia: Saunders, 1971; R. Krstić, Illustrated Encyclopedia of Human Histology. Berlin: Springer-Verlag, 1984.)



patrón de migración distinto. Se localizan en el fondo de las criptas, donde también se renuevan continuamente, aunque no tan rápido y permanecen allí unos 20 días (en el ratón) antes de sufrir apoptosis y ser fagocitadas por células adyacentes. Las células madre también permanecen cerca o en el interior de las criptas. ¿Qué es lo que las retiene allí y restringe las divisiones celulares al interior de las criptas? ¿Cómo se regulan las migraciones de forma que algunas células se desplazan y otras permanecen quietas? ¿Cuáles son las señales moleculares que organizan el conjunto del sistema de células madre y cómo funcionan?

La señalización Wnt mantiene el compartimiento de células madre del intestino

El inicio de la respuesta a todas estas cuestiones surgió del estudio sobre el cáncer de colon y de recto (la porción terminal del intestino). Tal como se indicó en el Capítulo 20, algunas personas tienen una predisposición hereditaria a esta enfermedad y, previamente al cáncer, desarrollan gran cantidad de pequeños tumores precancerosos (adenomas) en el revestimiento del intestino grueso (**Figura 23–23**). El aspecto de dichos tumores sugiere una formación a partir de las células de las criptas intestinales que no han conseguido detener su proliferación por la vía normal y, como consecuencia, han dado lugar a estructuras similares a criptas excesivamente grandes. La causa puede ser atribuida a las mutaciones en el gen *Apc* (***a**denomatous **p**olyposis **c**oli)*. Las mutaciones proceden de las células que han perdido las dos copias génicas. *Apc* codifica una proteína que impide la activación inadecuada de la vía de señalización Wnt, de forma que la pérdida de *Apc* posiblemente mimetiza el efecto

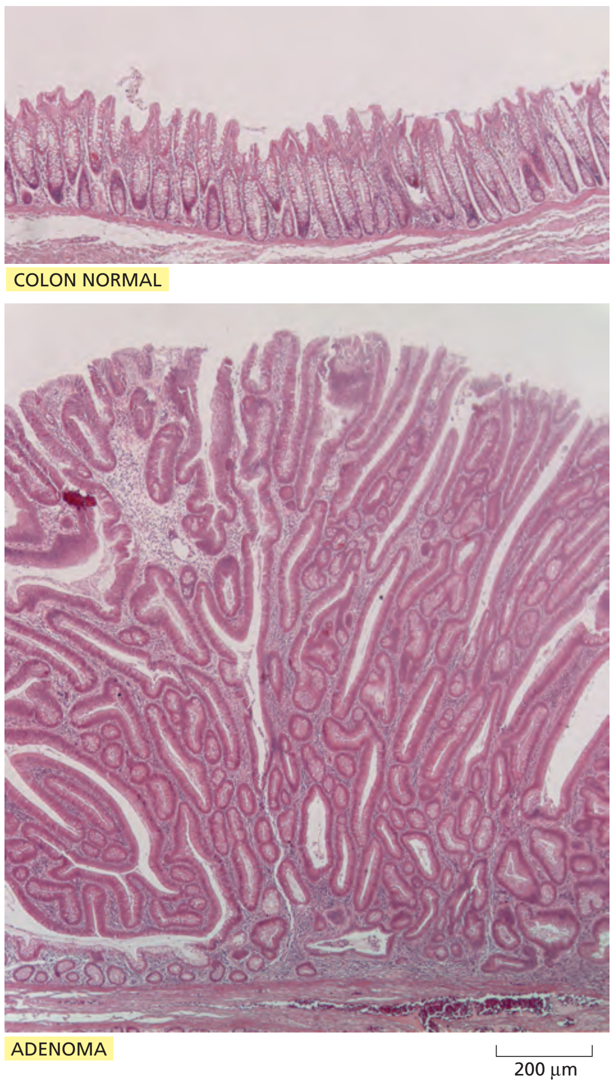


Figura 23–23 Un adenoma de colon humano comparado con el tejido normal de una región adyacente del colon de la misma persona. La muestra procede de un paciente con una mutación hereditaria en una de las dos copias del gen *Apc*. Una mutación en la otra copia del gen *Apc*, localizada en una célula epitelial del colon durante la vida adulta, ha dado lugar a un clon de células que se comportan como si la vía de señalización Wnt estuviera activada de forma permanente. Como resultado de ello las células de este clon forman un adenoma –una enorme masa de estructuras similares a las criptas, que se expande de forma continua.

de una exposición continua a la señal Wnt. Por consiguiente, la propuesta es que por lo general la señalización Wnt mantiene las células de las criptas en un estado proliferativo y, a medida que abandonan la cripta, el cese de la exposición a la señalización Wnt normalmente produce la detención de las divisiones. En efecto, los ratones homocigotos para una mutación que anula el gen *Tcf4*, codifican una proteína reguladora necesaria como efectora de la señalización Wnt en el intestino, no forman criptas, se bloquea la renovación de su epitelio intestinal y mueren poco después del nacimiento.

Experimentos con ratones transgénicos confirman la importancia de la señalización Wnt y revelan otros reguladores que actúan junto con Wnt organizando la línea de producción de las células intestinales manteniéndolas en funcionamiento correctamente. Utilizando la técnica de funcionamiento de Cre/lox con un promotor inducible para Cre (tal como se describió en el Capítulo 8, p. 567) es posible silenciar bruscamente el gen de las células epiteliales del intestino en cualquier momento de la vida del ratón. En unos pocos días, la estructura del intestino se transforma: las regiones con células proliferativas similares a las criptas se amplían de forma considerable, los microvilli se reducen y el número de células diferenciadas terminal disminuyen de forma drástica. A la inversa, se puede generar un ratón transgénico en el que las células del epitelio intestinal secreten un inhibidor soluble de la señalización Wnt. Estos animales en los que se ha bloqueado la señalización Wnt, apenas forman unas cuantas criptas y en su epitelio intestinal tienen muy pocas células proliferativas. En cambio, casi todas las células que revisten el intestino son células absorbentes que no se dividen y que están totalmente diferenciadas, pero se han perdido las células caliciformes, las enteroendocrinas y las de Paneth. Así la señalización Wnt no sólo mantiene las células en un estado proliferativo sino que es necesaria para hacerlas competentes para alcanzar la serie completa de los tipos celulares diferenciados.

La señalización Notch controla la diversificación de las células intestinales

¿Qué es lo que induce a las células a diversificarse? La señalización Notch realiza esta función en muchos otros sistemas, en los que interviene en la inhibición lateral –una interacción competitiva que dirige a las células adyacentes hacia diferentes destinos (véase Capítulo 15 y 22, Figuras 15–75 y 22–60). En las criptas se expresan todos los componentes esenciales de la vía Notch; es donde parece que la señalización Wnt inicia su expresión. Cuando se bloquea bruscamente la señalización Notch, en unos cuantos días todas las células de las criptas se diferencian como células caliciformes y cesan de dividirse; a la inversa, cuando se activa de manera artificial la señalización Notch en todas las células, no se producen células caliciformes y las zonas de proliferación celular similares a las criptas se amplían.

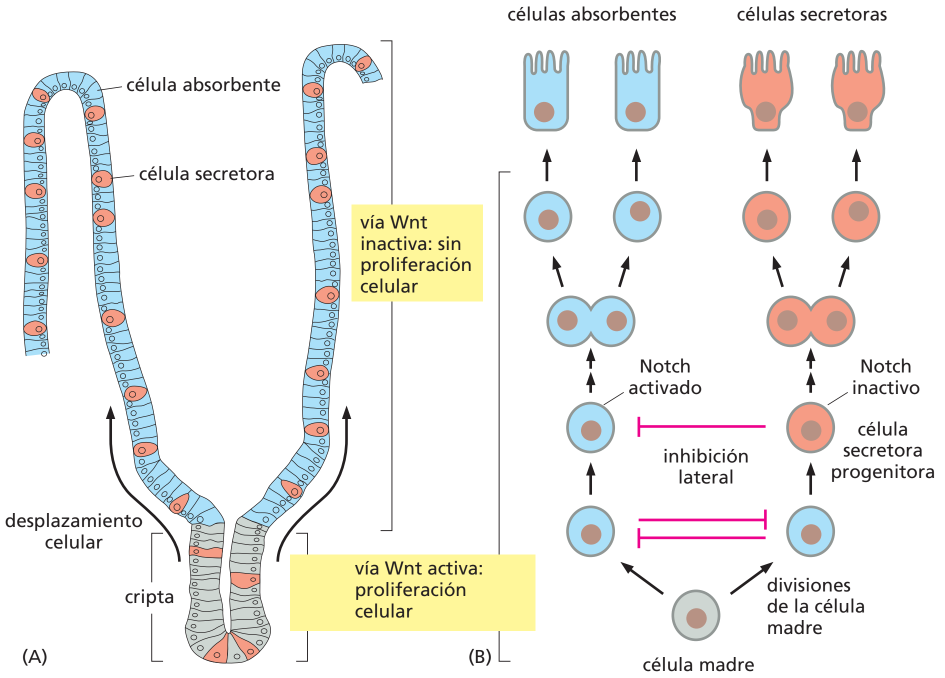


Figura 23–24 Cómo se combinan las vías de señalización Notch y Wnt en el intestino controlando la producción de células diferenciadas a partir de células madre. (A) La señalización Wnt mantiene la proliferación en la cripta, donde residen las células madre, y su estirpe pasa a estar determinada hacia distintos destinos. (B) La señalización Wnt en la cripta dirige la expresión de los componentes de la vía de señalización Notch en esta zona; de este modo, la señalización Notch es activa en la cripta y, mediante la inhibición lateral, obliga a las células a diversificarse. Para que una célula se mantenga como célula madre, ambas vías deben encontrarse activadas en dicha célula. La estirpe derivada de esta célula madre continúa dividiéndose bajo la influencia de Wnt, incluso después de comprometerse hacia un destino diferenciado específico, si bien las etapas de estas divisiones amplificadoras transitorias en relación a la determinación no se comprenden todavía con detalle.

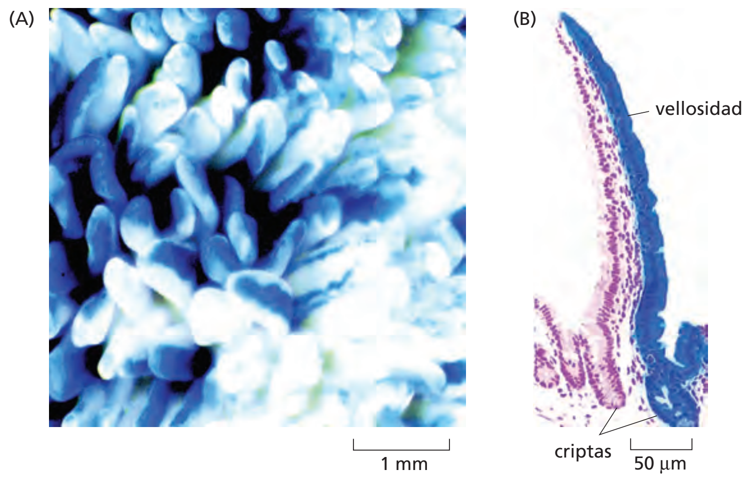


Figura 23–25 Migración de las células desde las criptas hacia la vellosidad. En este intestino de ratón, un grupo aleatorio de células epiteliales fue inducido a experimentar una mutación hacia el final de su periodo fetal, provocando en las células mutantes la expresión de un transgén *LacZ,* que codifica una enzima detectable mediante el producto azul de la reacción que cataliza. Seis semanas después del nacimiento, cada cripta se había poblado a partir de la estirpe de una sola célula madre, de forma que se observaba totalmente azul o totalmente blanca, según la célula madre hubiera quedado o no genéticamente marcada de esta forma. Varias criptas confluyen en una sola vellosidad y envían cada una un flujo de células diferenciadas a lo largo de la vellosidad. (A) Imagen superficial a bajo aumento de una parte del revestimiento intestinal, donde se muestran muchas vellosidades, cada una de las cuales recibe un flujo de células a partir de distintas criptas. (B) Detalle de una sola vellosidad y de las criptas adyacentes en una sección transversal. En el ejemplo, los flujos celulares de distintas criptas han quedado separados, de forma que una cara de la vellosidad aparece azul y la otra cara blanca; por lo general, quedan algo mezclados y muestran un resultado menos ordenado. (De M.H. Wong, J.R. Saam, T.S. Stappenbeck, C.H. Rexer y J.I. Gordon, *Proc Natl Acad. Sci. USA* 97:12601-12606, 2000. Con la autorización de National Academy of Sciences.)

A partir de los efectos producidos por todas estas manipulaciones en la señalizaciones Wnt y Notch, podemos ilustrar de forma sencilla cómo se combinan las dos vías dirigiendo la producción de células diferenciadas a partir de células madre intestinales (**Figura 23–24**). La señalización Wnt activa la proliferación celular y confiere competencia para la serie completa de los tipos de diferenciación, aunque impide que dicha diferenciación ocurra de forma inmediata; de esta forma queda definida la cripta y se mantienen las células madre. Pero al mismo tiempo, la señalización Wnt también activa la expresión de los componentes de la vía Notch y dicha señalización entre las células de la cripta activa la inhibición lateral, con lo que las células se ven obligadas a diversificarse, de tal forma que algunas de ellas quedan señaladas para distribuir la inhibición lateral, mientras otras la reciben. Las células del primer grupo expresan ligandos de Notch y activan Notch en las células adyacentes, pero evitan la propia activación por Notch; como resultado, se convierten en células comprometidas a diferenciarse como células secretoras. Las células del segundo grupo –la mayoría– se mantienen en un estado opuesto, con Notch activado y la expresión de su ligando inhibida; como resultado de ello mantienen la competencia para diferenciarse en una de las diversas vías y para implicarse en la competición por la inhibición lateral con las células adyacentes. Ambos tipos de células (con la excepción de algunos subtipos de células secretoras) continúan dividiéndose mientras permanecen en la cripta, bajo la influencia de Wnt. Pero cuando las células abandonan la cripta y pierden la exposición a la señalización Wnt, la competición se detiene, dejan de dividirse y las células se diferencian según sus estadios individuales de activación Notch en aquel momento; si Notch se encuentra todavía activado, se diferencian en células absorbentes y, en caso contrario, en células secretoras.

Por supuesto esta no es la historia completa de los acontecimientos que tienen lugar en la cripta. Este mecanismo no explica, por ejemplo, cómo las diferentes subclases de células secretoras (caliciformes, enteroendocrinas y de Paneth) llegan a ser diferentes. Ni tampoco nos dice nada sobre la distinción que muchos expertos creen que existe entre las células madre verdaderas y las células amplificadoras transitorias que se dividen más rápido en el interior de la cripta. Algunos de los distintos miembros de las familias de componentes de las vías Wnt y Notch se expresan en el epitelio de la cripta y en el tejido conjuntivo que rodea la base de las criptas, donde posiblemente ejercen efectos distintos. Por otro lado, otras vías de señalización también ejercen funciones esenciales en la organización del sistema.

La señalización Efrina-Eph controla las migraciones de las células del epitelio intestinal

Una de las características más relevantes del conjunto de células madre intestinales es la migración selectiva, ordenada y constante de las células desde la cripta hacia la vellosidad. Las células enteroendocrinas, caliciformes y absorbentes que se diferencian salen del fondo de las criptas hacia el extremo de la vellosidad. (**Figura 23–25**); las células madre permanecen en el fondo de las criptas y las células de Paneth migran hasta el fondo de las criptas. Este patrón de desplazamiento, que segrega los diferentes grupos de células, depende además de otra vía de señalización entre células. La señalización Wnt estimula la expresión de los re-

ceptores de superficie celular de la familia EphB (descrito en el Capítulo 15) de las células de la cripta; sin embargo, como células diferenciadas, activan la expresión de estos receptores y en lugar de expresarse los ligandos, inician la expresión de proteínas de superficie de la familia efrina B (**Figura 23–26**A). Existe una excepción: las células de Paneth conservan la expresión de las proteínas EphB. La expresión de EphB es característica de las células que permanecen en las criptas; la expresión de la efrina B, de las que se desplazan hacia la vellosidad. En otros tipos de tejidos, las células de Paneth que expresan proteínas Eph son repelidas mediante contactos con las células que expresan efrinas (véase capítulo 22, Figura 22–106). Al parecer, este proceso ocurre en todo el revestimiento intestinal, y este mecanismo sirve para mantener las células en el sitio apropiado. En los mutantes carentes de EphB, las poblaciones terminan por mezclarse, de forma que, por ejemplo, las células de Paneth deambulan por la vellosidad (Figura 23–26C). La pérdida de los genes EphB se halla correlacionada con la aparición del comportamiento invasivo en las células tumorales.

Las vías de señalización Wnt, Hedgehog, PDGF y BMP se combinan delimitando el nicho de las células madre

Está claro que las células madre intestinales no pueden existir sin el entorno especial que les aporta la cripta. Este **nicho de células madre** es tan esencial como las propias células madre. ¿Cómo se genera y se mantiene? Al parecer los mecanismos dependen de una compleja interacción de señales entre el epitelio y el tejido conjuntivo adyacente. El intercambio de señales Wnt, Hedgehog y PDGF entre los dos tejidos y las distintas regiones del eje vellosidad-cripta, conduce a la restricción de la señalización Wnt hacia las células adyacentes de la cripta. Las células epiteliales de la cripta producen tanto proteína Wnt como receptores que interaccionan con dicha proteína, generando un bucle de retroalimentación positiva que posiblemente contribuye a que la activación de la vía Wnt se mantenga por sí misma en esta zona. A su vez, las señales que se intercambian con el tejido conjuntivo provocan la expre-

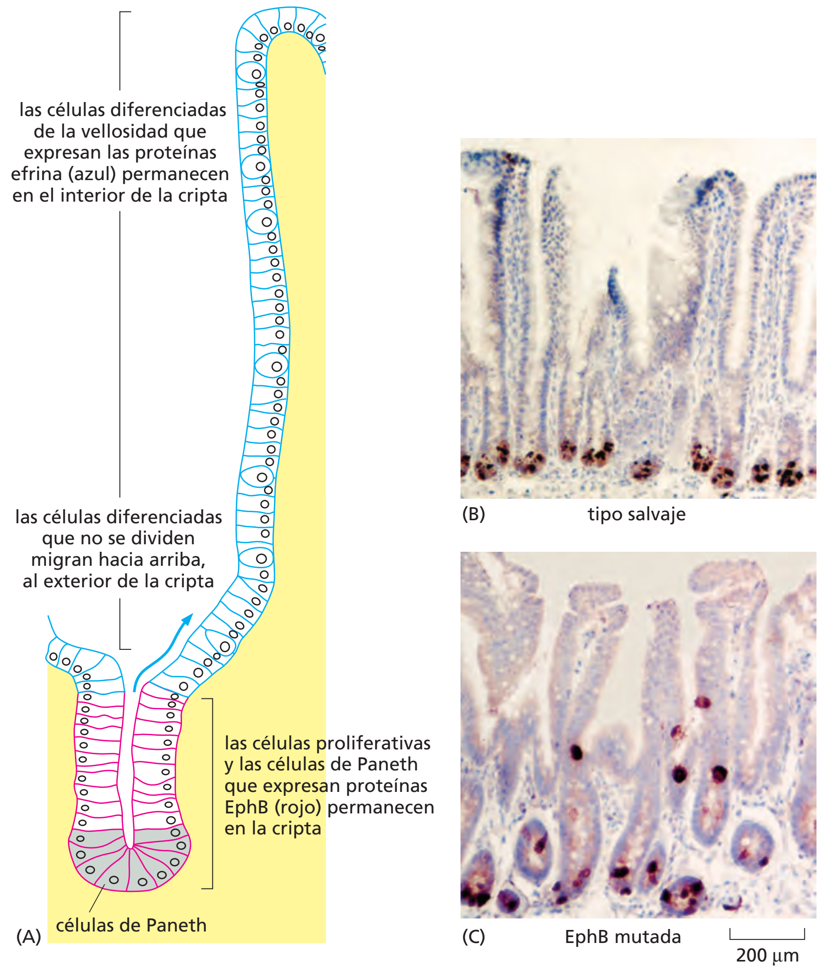
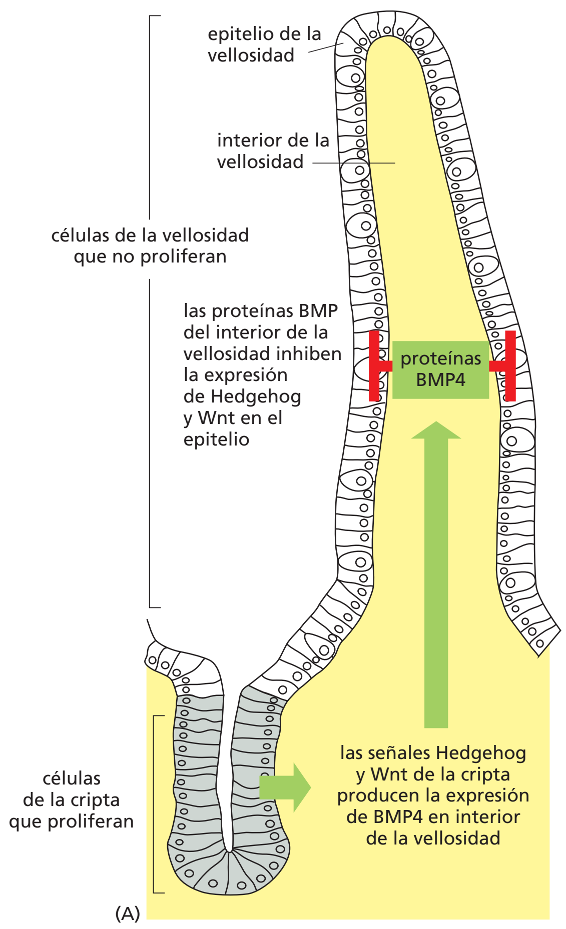


Figura 23–26 La señalización Efrina-Eph controla la segregación que se produce entre las criptas y las vellosidades. (A) Las células proliferativas (incluidas las células madre) y las células de Paneth expresan proteínas EphB, mientras que las células diferenciadas, que revisten las vellosidades y no se dividen, expresan proteínas efrina B. La interacción repulsiva celular producida mediante conexiones entre estos dos tipos de moléculas de superficie mantiene segregados los dos tipos celulares. (B) Como resultado, en un intestino normal, las células de Paneth (teñidas de *marrón*) y las células que se dividen permanecen confinadas en el fondo de las criptas. (C) En un mutante que carece de las proteínas EphB, las células que deberían permanecer en las criptas se localizan a lo largo de las vellosidades. (Adaptado de E. Batlle et al., *Cell* 111: 251-263, 2002. Con la autorización de Elsevier)



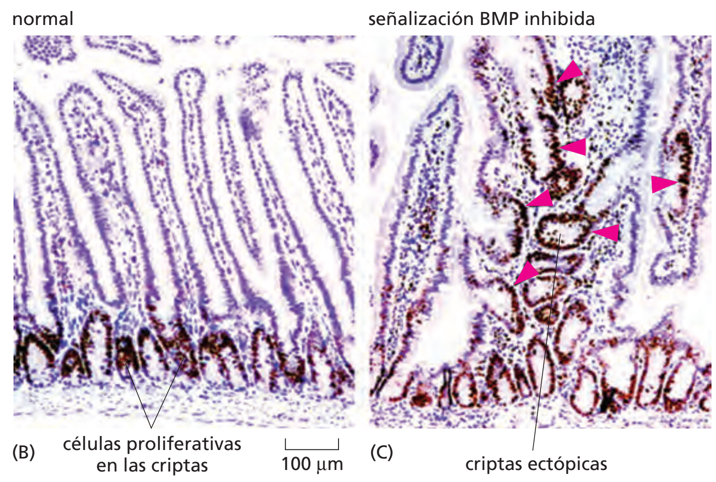


Figura 23–27 Las señales que definen el nicho de las células madre intestinales. (A) Esquema del sistema de señalización. Las células epiteliales del fondo de cada cripta, expresan las proteínas señal de las familias Hedgehog y Wnt, junto con los receptores Wnt, expresando niveles elevados en la activación de la vía Wnt. Las células de tejido conjuntivo de la base del epitelio expresan tanto receptores Hedgehog como receptores Wnt. El efecto combinado de dichas señales en la base de la cripta, posiblemente conjugándose con otras señales, da lugar a que las células del tejido conjuntivo que se hallan en el centro de cada vellosidad expresen proteínas BMP. Las proteínas BMP actúan sobre el epitelio de la vellosidad, impidiendo a las células que formen criptas. (B) Sección transversal de una zona del epitelio intestinal normal. Las células proliferativas, que se hallan concentradas en las criptas, quedan teñidas de marrón. (C) Sección del intestino de un ratón transgénico que expresa un inhibidor de la señalización BMP y se tiñe de forma similar. A los lados de las vellosidades deformadas, se han desarrollado criptas ectópicas que contienen células en división. (B y C, por cortesía de A. Haramis et al., *Science* 303: 1684-1686, 2004. Con la autorización de AAAS).

sión de proteínas BMP en las células del tejido conjuntivo que se hallan en el interior de la vellosidad (**Figura 23–27**). Estas células transmiten la señal al epitelio más próximo de la vellosidad a fin de inhibir el desarrollo de criptas mal situadas: si se bloquea la señalización BMP se disgrega toda la organización y se producen criptas mal situadas, formándose invaginaciones de epitelio proliferativo a ambos lados de la vellosidad.

El hígado funciona como una interfase entre el tracto digestivo y la sangre

Como se acaba de describir, las funciones del intestino las realizan diversos tipos celulares. Algunas células se especializan en la secreción de ácido clorhídrico, otras en la secreción de enzimas, otras en la absorción de nutrientes, y así sucesivamente. Algunos de estos tipos celulares están estrechamente intercalados en la pared intestinal, otros se hallan agrupados formando grandes glándulas que comunican con el intestino y que en el embrión se forman a modo de brotes del epitelio intestinal. El hígado es la mayor de estas glándulas. Se desarrolla como una región en la que discurre una vena principal junto a la pared del tubo digestivo primitivo y en el adulto es un órgano que mantiene una estrecha relación con la sangre. Las células del hígado que derivan del primitivo epitelio intestina –los **hepatocitos**– están dispuestas en láminas y cordones interconectados, con espacios llenos de sangre entre ellos, denominados sinusoides (**Figura 23–28**). La sangre queda separada de la superficie de los hepatocitos por una única capa de células endoteliales aplanadas que recubre las caras expuestas de los hepatocitos. Esta estructura facilita las funciones principales del hígado, que dependen del intercambio de metabolitos entre los hepatocitos y la sangre.

El hígado es el lugar principal en el que los nutrientes, que se han absorbido en el intestino y luego se han transferido a la sangre, se procesan para su utilización por otras células del cuerpo. El mayor aporte sanguíneo que recibe procede directamente del tracto intestinal (por la vena porta). Los hepatocitos sintetizan, degradan y almacenan un gran número de sustancias. Tienen un papel fundamental en el metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos de

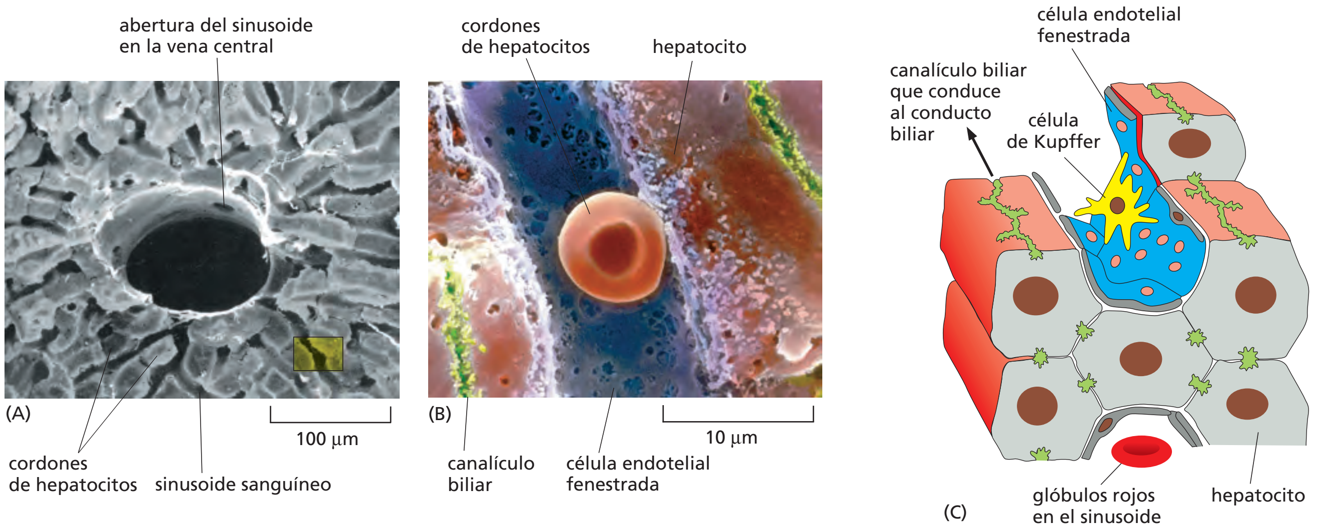


Figura 23–28 La estructura del hígado. (A) Electromicrografía de barrido de una región del hígado, que muestra las capas y las trabéculas irregulares que forman los hepatocitos y los múltiples canales diminutos, o sinusoides, para la circulación de la sangre. Los canales mayores son vasos que distribuyen y recogen la sangre que circula a través de los sinusoides. (B) Detalle de un sinusoide (ampliación de la región parecida a la que está marcada en un rectángulo amarillo en la parte inferior derecha de la foto [A]). (C) Esquema de la estructura microscópica del hígado. Una sola capa delgada de células endoteliales, que están intercaladas con células Kupffer similares a los macrófagos, separa a los hepatocitos de la circulación sanguínea. Pequeños orificios en la capa endotelial, denominados fenestraciones, que en latín significa "ventanas", permiten el intercambio de moléculas y pequeñas partículas entre los hepatocitos y la circulación sanguínea. Además del intercambio de materiales con la sangre, los hepatocitos forman un sistema de finos canalículos biliares en el interior de los cuales segregan bilis, que al final se vierte al intestino a través de los conductos biliares. La estructura real es menos regular de lo que sugiere este esquema. (A y B, cortesía de Pietro M. Motta, Universidad de Roma "La Sapienza".)

todo el cuerpo y segregan la mayoría de las proteínas del plasma sanguíneo. Al mismo tiempo, los hepatocitos permanecen conectados a la luz intestinal mediante un sistema de conductos diminutos (o canalículos) y conductos mayores (véase Figura 23–28B, C) y, a través de ellos, segregan hacia el intestino productos residuales de su metabolismo y un agente emulsionante, la *bilis,* que interviene en la absorción de las grasas. Los hepatocitos son células grandes y un 50% de ellas (en los humanos adultos) son poliploides, con una cantidad de DNA dos, cuatro, ocho o incluso más veces mayor que la cantidad diploide normal por célula.

A diferencia de lo que sucede con el resto del tracto digestivo, parece que en la población de hepatocitos existe muy poca distribución de funciones. Cada hepatocito parece ser capaz de realizar la amplia gama de funciones metabólicas y secretoras. Estas células, completamente diferenciadas, también pueden dividirse de forma repetida cuando es necesario.

La pérdida de células hepáticas estimula su proliferación

El hígado ilustra uno de los grandes problemas no resueltos del desarrollo y de la biología de los tejidos: ¿qué es lo que determina el tamaño de un órgano del cuerpo, o la cantidad de un tipo de tejido respecto a otro? Casi seguro que las respuestas son diferentes para distintos órganos, aunque el funcionamiento se conoce escasamente en algún caso.

Los hepatocitos viven por lo general un año o más y se renuevan a una velocidad lenta. Pero, incluso en los tejidos que presentan una renovación lenta de sus células, un pequeño pero persistente desequilibrio entre la velocidad de producción y la velocidad de muerte celular conduciría al desastre. Si cada semana se dividieran un 2% de las células hepáticas de un ser humano y sólo se perdiera un 1%, el hígado crecería hasta sobrepasar, en 8 años, el peso del resto del cuerpo. Así pues, tiene que existir algún mecanismo homeostático que ajuste la velocidad de proliferación celular o la velocidad de muerte celular, o ambas para mantener el tamaño normal de cada órgano. Por otro lado, este tamaño necesita armonizarse con el del resto del cuerpo. Cuando el hígado de un perro pequeño se trasplanta a uno grande, crece rápidamente hasta alcanzar el tamaño apropiado al huésped, y a la inversa, cuando se trasplanta el hígado de un perro grande a uno pequeño, disminuye de tamaño.

La prueba directa del control homeostático de la proliferación de las células hepáticas surge de experimentos en los que se extirpan mediante cirugía un número elevado de hepatocitos o se destruyen de forma intencionada por medio de tetracloruro de carbono. Al cabo de un día aproximadamente de efectuar cualquiera de estas lesiones, se observa un aumento brusco de la división celular entre los hepatocitos supervivientes, que sustituyen rápidamente el tejido perdido. (Si los hepatocitos se eliminan por completo, pueden actuar como células madre en la génesis de nuevos hepatocitos otra clase de células, localizadas en los conductos biliares, aunque habitualmente esto no es necesario.) Si, por ejemplo, se extirpan los dos tercios del hígado de una rata, a partir del tercio restante se puede regenerar en unas dos semanas un hígado casi normal por proliferación de los hepatocitos. Aunque se han implicado diversas moléculas en el inicio de esta reacción, una de las más importantes es una proteína denominada *factor de crecimiento de hepatocitos*. Dicho factor estimula la división de los hepatocitos en cultivo y su producción aumenta de forma súbita (por mecanismos poco conocidos) como respuesta a la lesión del hígado.

El equilibrio entre formación y muerte celular en el hígado adulto (cómo en otros órganos) no depende sólo de la regulación de la proliferación celular: parece ser que intervienen controles de supervivencia celular. Por ejemplo, si una rata adulta se trata con la droga fenobarbital, se estimula a los hepatocitos a dividirse y, en consecuencia, se agranda el hígado. Cuando se interrumpe el tratamiento con fenobarbital aumenta considerablemente la muerte celular de los hepatocitos hasta que el hígado recupera su tamaño original, por lo general al cabo de una semana poco más o menos. Se desconoce cuál es el mecanismo de este tipo de control de supervivencia celular, aunque se ha sugerido que los hepatocitos, igual que la mayoría de células de los vertebrados, dependen de señales emitidas por otras células para su supervivencia y de que el nivel normal de dichas señales puede mantener solamente un número determinado de hepatocitos. Si el número de hepatocitos supera esta cantidad (p. ej. como resultado de un tratamiento con fenobarbital), la muerte celular se incrementará de manera automática volviendo a rebajar el número de células. Todavía se desconoce de qué forma se mantienen los niveles de los factores de supervivencia.

La renovación del tejido no tiene que depender de las células madre: las células secretoras de insulina en el páncreas

La mayor parte de los órganos del tracto digestivo y respiratorio, incluyendo los pulmones, el estómago y el páncreas, contienen una subpoblación de células endocrinas similar a las células enteroendocrinas del intestino y, como éstas, se forman en el epitelio bajo el control de la vía de señalización Notch. Las *células secretoras de insulina (células β)* del páncreas pertenecen a esta categoría. Su mecanismo de renovación tiene especial importancia, ya que la pérdida de estas células (debido a un mecanismo autoinmune) es la causa de la diabetes de Tipo I (forma juvenil) y también es un factor significativo en la forma de Tipo II (forma adulta). En un páncreas normal, estas células β están acumuladas en agregados celulares denominados *islotes de Langerhans* (**Figura 23–29**) donde se agrupan con las células enteroendocrinas relacionadas, que segregan otras hormonas. Los islotes contienen un subconjunto no bien definido de células especializadas que funcionan como células madre, ya que producen de forma continua nuevas células β. ¿De dónde proceden estas células nuevas?

La respuesta a esta cuestión se ha encontrado en el estudio sobre ratones transgénicos en los que se ha utilizado una ingeniosa variante de la técnica de Cre-Lox (descrita en el Capítulo 8) para producir una mutación marcadora sólo en aquellas células que expresan el gen de la insulina en el momento en que se introduce un fármaco para activar Cre. De esta forma, las únicas células que quedan marcadas y transmiten la marca a su estirpe son aquellas que ya se habían diferenciado en células β durante el periodo del tratamiento. Cuando se analizan los ratones al cabo de poco más de un año, todas las nuevas células β llevan la marca, lo cual implica que son descendientes de las células β ya diferenciadas y no de algunas células madre no diferenciadas. Igual que en el hígado, parece que la población de células diferenciadas se ha renovado y ampliado por simple duplicación de las células diferenciadas existentes y no por intervención de las células madre.

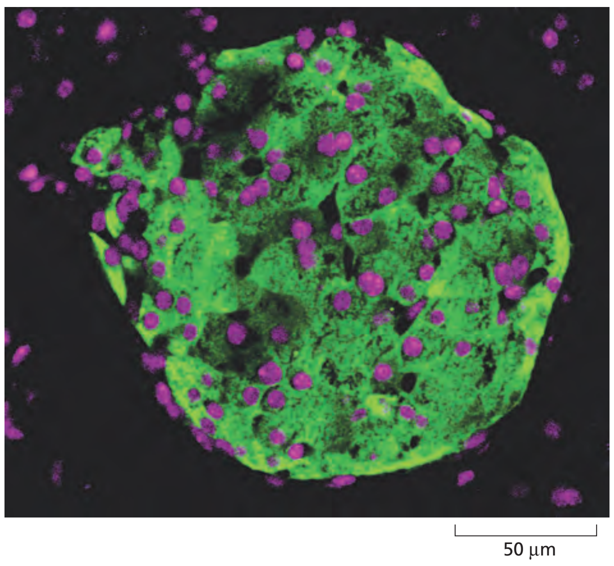


Figura 23–29 Un islote de Langerhans del páncreas. Las células secretoras de insulina (células β) presentan inmunofluorescencia *verde*. Los núcleos de las células quedan teñidos de *púrpura* con un colorante del DNA. Las células exocrinas de alrededor (que segregan enzimas digestivas y bicarbonato a través de los conductos hacia el intestino) no quedan teñidas, excepto los núcleos. En el interior del islote, cerca de la superficie, hay pequeños grupos de células (no teñidas) que segregan hormonas como el glucagón. Las células secretoras de insulina se renuevan por duplicación sencilla, sin necesidad de células madre especializadas. (Adaptado de una fotografía por cortesía de Yuval Dor. © 2004 Yuval Dor, The Hebrew University, Jerusalem.)

Resumen

El pulmón realiza una función sencilla pero sus sistemas de organización son complejos. Las células secretoras de surfactante impiden el colapso de los alvéolos. Los macrófagos eliminan la suciedad y los microorganismos de los alvéolos. Una escalera mucociliada formada por células caliciformes secretoras de mucus y células ciliadas barren los detritus hacia fuera de las vías respiratorias.

En el intestino, donde tienen lugar los procesos químicos en potencia más agresivos, una rápida y constante renovación celular mantiene en buen estado el epitelio absorbente. En el intestino delgado, las células madre de las criptas generan nuevas células absorbentes, caliciformes, enteroendocrinas y de Paneth, reemplazando cada semana la mayor parte del revestimiento epitelial del intestino. En las criptas, la señalización Wnt mantiene la población de células madre, mientras que la señalización Notch dirige la diversificación de la estirpe de células madre y limita el número que queda designado hacia el destino secretor. En el epitelio, las interacciones célula-célula mediadas por la señalización efrina-Eph controlan la migración selectiva de células desde las criptas hasta el extremo de las vellosidades. Las interacciones entre el epitelio y el estroma que implican a las vías Wnt, Hedgehog, PDGF y BMP organizan el patrón de las criptas y las vellosidades, generando así los nichos donde se encuentran las células madre.

El hígado es un órgano que está más protegido, pero también puede adaptar rápidamente su tamaño mediante la proliferación celular o la muerte celular cuando surge la necesidad. Los hepatocitos diferenciados conservan a lo largo de toda la vida la capacidad de dividirse, demostrando que para la renovación de un tejido no siempre es necesario un tipo determinado de células madre. De forma parecida, en el páncreas la población de células productoras de insulina se amplía y renueva por simple duplicación de las células productoras de insulina.

LOS VASOS SANGUÍNEOS, LOS VASOS LINFÁTICOS Y LAS CÉLULAS ENDOTELIALES

Después de describir los tejidos que derivan del ectodermo y del endodermo embrionario, se analizará los derivados del *mesodermo*. Esta capa intermedia de células, comprendida entre el ectodermo y el endodermo, crece y se diversifica proporcionando muchos tipos de funciones de mantenimiento. Da lugar a los tejidos conjuntivos del cuerpo, a las células sanguíneas y a los vasos sanguíneos y linfáticos, así como al músculo, al riñón y a muchos otros órganos y tipos celulares. Se analizarán con los vasos sanguíneos.

Casi todos los tejidos dependen de un aporte sanguíneo y dicho aporte depende de las **células endoteliales**, que revisten los vasos sanguíneos. Las células endoteliales tienen una notable capacidad para ajustar su número y su ordenación a las necesidades locales. Forman un sistema de mantenimiento vital adaptable y se extienden por casi todo el cuerpo mediante migración celular. Si no fuera por las células endoteliales, que extienden y remodelan la red de vasos sanguíneos, el crecimiento y la reparación de los tejidos sería imposible. El tejido cancerígeno es tan dependiente del aporte sanguíneo como el tejido normal, lo que ha generado un gran interés por la biología de la célula endotelial. Mediante el bloqueo de la formación de nuevos vasos sanguíneos con fármacos que actúan sobre las células endoteliales, es posible bloquear el crecimiento de tumores (descrito en el Capítulo 20).

Las células endoteliales revisten todos los vasos sanguíneos y linfáticos

Los vasos sanguíneos más grandes son las arterias y las venas, que tienen una gruesa y resistente pared de tejido conjuntivo y varias capas de fibras musculares lisas (**Figura 23–30**). La pared está revestida por una sola capa finísima de células endoteliales, el *endotelio*, separada de las capas más externas por una lámina basal. La cantidad de tejido conjuntivo y de musculatura lisa de la pared del vaso varía según su diámetro y su función, pero siempre está presente el revestimiento epitelial. En las ramas vasculares más finas –los capilares y los sinusoides– las paredes están formadas exclusivamente por una sola capa de células endoteliales y por una lámina basal (**Figura 23–31**) junto con algunos –aunque funcionalmente importantes– *pericitos* dispersos. Estas células de la familia del tejido conjuntivo, relacionadas con las fibras musculares lisas de los vasos, rodean los vasos más delgados (**Figura 23–32**).

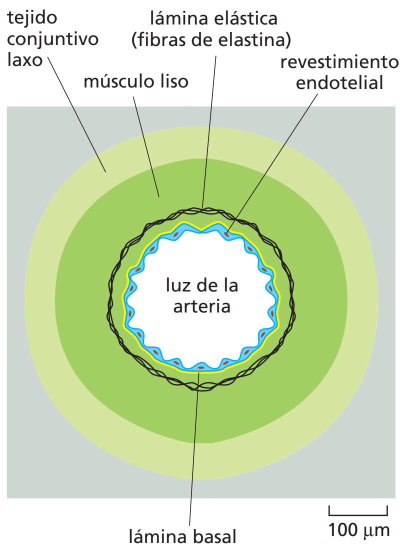


Figura 23–30 Esquema de un corte transversal de una arteria pequeña. Las células endoteliales, aunque pasan desapercibidas, son el componente fundamental. Compárese con el capilar de la Figura 23–31.

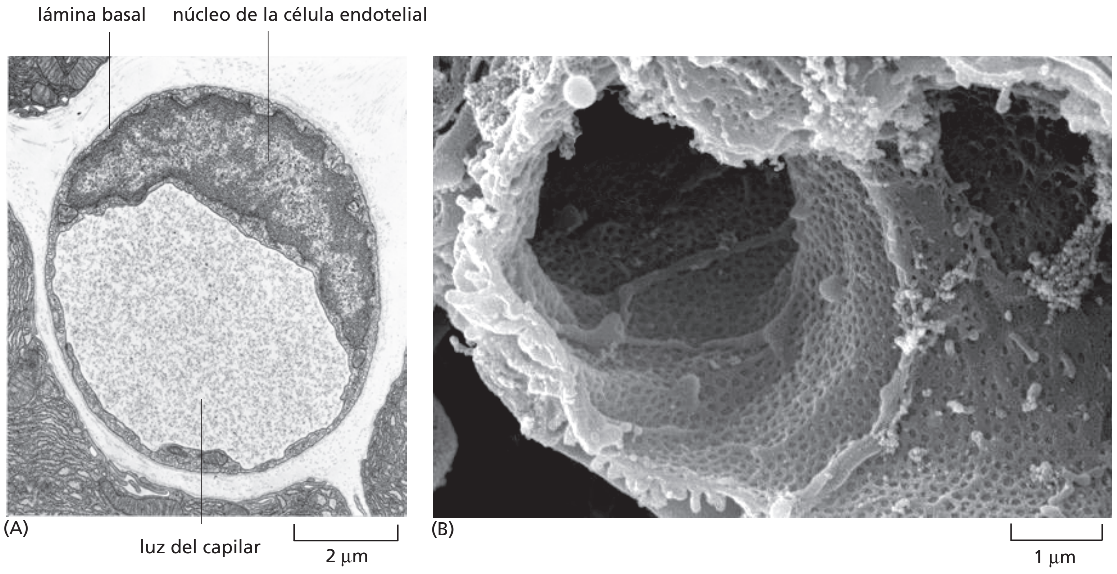


Figura 23–31 Capilares. (A) Electromicrografía de un corte transversal de un pequeño capilar del páncreas. La pared está formada por una sola célula endotelial recubierta de una lámina basal. (B) Elecromicrografía de barrido del interior de un capilar en un glomérulo del riñón, donde tiene lugar la filtración de la sangre produciendo la orina. Aquí, como en el hígado (véase la Figura 23–28), las células endoteliales están especializadas para formar una estructura similar a la de un colador, con fenestraciones, estructuradas de forma parecidas a los poros nucleares de las células eucariotas, que permite al agua y a la mayoría de moléculas salir libremente de la circulación sanguínea. (A, a partir de R.P. Bolender, *J. Cell Biol*. 61:269-287, 1974. Con la autorización de The Rockefeller University Press; B, cortesía de Steve Gschmeissner y David Shima.)

En los vasos linfáticos no está tan claro como en los vasos sanguíneos. Los vasos linfáticos no transportan sangre y son mucho más finos y permeables que los vasos sanguíneos. Proporcionan un sistema de drenaje de los fluidos (linfa) que se filtran hacia el exterior de los vasos sanguíneos, así como una ruta para los glóbulos blancos de la sangre que han migrado desde los vasos sanguíneos hacia los tejidos. Por desgracia, con frecuencia también proporcionan una vía por la que las células cancerígenas escapan de un tumor primario e invaden otros tejidos. Los vasos linfáticos forman un sistema ramificado de afluentes que descargan finalmente en un gran vaso linfático, el conducto torácico que se abre dentro de una gran vena junto al corazón. Igual que los vasos sanguíneos, los vasos linfáticos están revestidos por células endoteliales.

De esta forma, las células endoteliales revisten todo el sistema vascular, desde el corazón hasta los capilares más finos, y controlan el paso de materiales –y el tránsito de glóbulos blancos– hacia el interior y el exterior de la corriente sanguínea. Las arterias, las venas y los vasos linfáticos se desarrollan a partir de pequeños y sencillos vasos formados sobre todo por células endoteliales y una lámina basal; el tejido conjuntivo y la musculatura lisa se forman más adelante bajo la influencia de señales producidas por las células endoteliales.

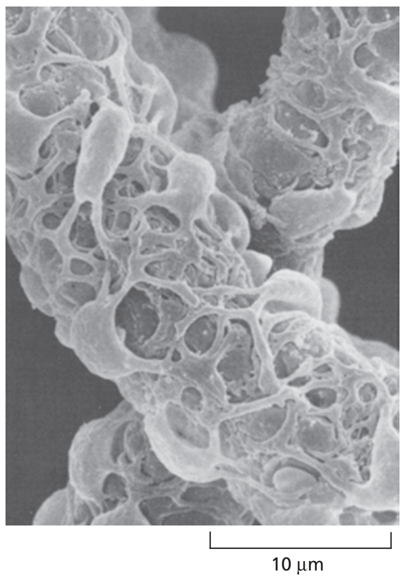


Figura 23–32 Pericitos. La electromicrografía de barrido muestra pericitos que extienden sus expansiones alrededor de un vaso sanguíneo pequeño (una vénula postcapilar) de la glándula mamaria de un gato. Los pericitos se localizan también alrededor de los capilares, pero distribuidos de forma mucho menos densa que éstos. (De T. Fujiwara e Y. Uehara, *Am. J. Anat*. 170:39-54, 1984. Con la autorización de Wiley-Liss.)

Las células endoteliales estrelladas promueven la angiogénesis

Para comprender cómo se organiza el sistema vascular y cómo se adapta a las distintas necesidades de los tejidos, tenemos que entender las células endoteliales. ¿Cómo logran estar tan ampliamente distribuidas y cómo forman los conductos, que conectan de la forma más adecuada, para que la sangre que circula a través de los tejidos y hacia la linfa pueda ser filtrada de nuevo a la circulación sanguínea?

Las células endoteliales se forman en regiones específicas del embrión temprano, a partir de células precursoras que también dan lugar a las células sanguíneas. A partir de estas regiones, las células endoteliales embrionarias migran, proliferan y se diferencian formando los primeros rudimentos de los vasos sanguíneos; este proceso se denomina *vasculogénesis*. El crecimiento posterior y la ramificación de los vasos a través del cuerpo se producen principalmente por proliferación y desplazamiento de las células endoteliales de estos primeros vasos, un proceso denominado **angiogénesis**.

En líneas generales, la angiogénesis se produce de forma similar tanto en el organismo joven como cuando se da en el adulto durante el remodelado y la reparación de los tejidos.

Podemos observar el comportamiento de las células en estructuras de por sí transparentes, como la córnea del ojo o la aleta de un renacuajo, en un cultivo celular o en el embrión. La retina embrionaria, cuyos vasos sanguíneos invasivos siguen un programa definido, constituye un buen ejemplo para un estudio experimental. Cada nuevo vaso se forma como un capilar que emerge por gemación del margen de un pequeño vaso ya existente o de una pequeña vénula (**Figura 23–33**A). En el extremo del brote, se halla una célula endotelial específica, que marca la ruta. La *célula endotelial estrellada* presenta un patrón de expresión génica algo distinto al de las células endoteliales del tallo que se hallan junto a ella y tienen la capacidad de dividirse, mientras que dicha célula no se divide; pero la característica más destacable de la célula endotelial estrellada es que extiende largos y numerosos filopodios, muy parecidos a los de un cono de crecimiento neuronal (Figura 23–33B). Mientras tanto, las células del tallo quedan perforadas formando un espacio (véase Figura 23–33A). Este proceso puede observarse en el embrión transparente del pez cebra: cada una de las células desarrolla vacuolas internas que se fusionan con las de las células adyacentes construyendo un tubo continuo pluricelular. <GTTG>

Las células endoteliales del extremo que dirigen el crecimiento de capilares normales, no sólo se parecen a los conos de crecimiento neuronal, sino que también responden de forma similar a las señales del entorno. De hecho, se encuentran implicadas varias de las mismas moléculas señalizadoras, como las semaforinas, las netrinas, las eslits y las efrinas con sus receptores correspondientes, que se expresan en las células endoteliales estrelladas y que en el embrión conducen los brotes vasculares a lo largo de vías específicas, con frecuencia paralelas a los nervios. Sin embargo, quizá la más importante de las moléculas guía en las células endoteliales sea la que controla específicamente el desarrollo vascular: el *factor de crecimiento endotelial vascular* o *VEGF.* Tendremos ocasión de explicarlo más adelante.

Diferentes células endoteliales forman tipos de vasos diferentes

Para formar un nuevo circuito para la circulación sanguínea, un brote vascular tiene que continuar creciendo hasta que encuentra otro brote o vaso con el que pueda conectar. Probablemente las condiciones de conexión son selectivas, para impedir la formación de cortocircuitos no aconsejables y para mantener los sistemas linfático y sanguíneo convenientemente separados. De hecho, las células endoteliales de los vasos linfáticos, venas y arterias en desarrollo expresan distintos genes y tienen distintas características de superficie. Como es evidente estas diferencias contribuyen a guiar los distintos tipos de vasos a lo

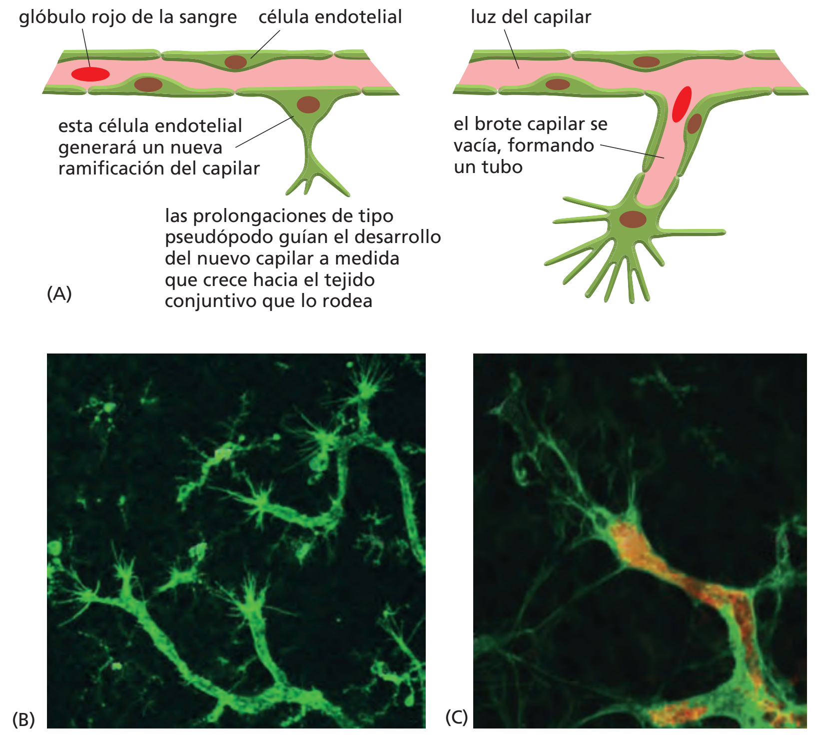


Figura 23–33 Angiogénesis. (A) Se forma un nuevo capilar sanguíneo como un brote a partir de una célula endotelial de la pared de un pequeño vaso ya existente. Una célula endotelial estrellada con numerosos filopodios guía el avance de cada brote del capilar. Las células del tallo endotelial que siguen tras la célula endotelial estrellada se vacían formando la luz del capilar. (B) Capilares sanguíneos formando nuevos brotes en la retina de un embrión de ratón. (C) En una región similar, en que se ha inyectado un colorante rojo en la circulación sanguínea, se observa la luz del capilar abriéndose paso detrás de la célula endotelial estrellada. (B y C, de H. Gerhardt et al., *J. Cell Biol.* 161:1163-1177, 2003. Con la autorización de The Rockefeller University Press.)

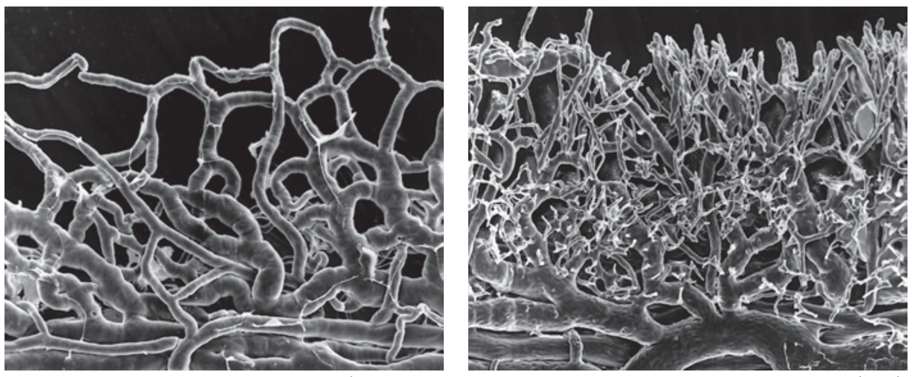


Figura 23–34 La formación de nuevos capilares en respuesta a una lesión. Las electromicrografías de barrido de moldes del sistema de vasos sanguíneos, alrededor del borde de la córnea, muestran la reacción a una lesión. Los moldes se realizan inyectando una resina en los vasos y dejando que esta resina polimerice, lo que pone de manifiesto la forma de la luz del capilar, complementaria a la forma de las células. Sesenta horas después de la lesión, empiezan a brotar numerosos capilares nuevos hacia el área lesionada, que se encuentra justo encima de la parte superior de la fotografía. El crecimiento orientado de los vasos refleja una respuesta quimiotáctica de las células endoteliales hacia un factor angiogénico liberado en la herida. (Cortesía de Peter C. Burger.)

largo de distintas vías, controlan la formación selectiva de conexiones y dirigen el desarrollo de los distintos tipos de paredes a medida que el vaso se ensancha. Por ejemplo, las células endoteliales arteriales, por lo menos en el embrión, expresan la proteína transmembrana efrinaB2 mientras que las células arteriales expresan la proteína receptora correspondiente EphB4 (descrito en el Capítulo 15). Estas moléculas intervienen en la señalización en las zonas de contacto célula-célula y son esenciales para el desarrollo de una red de vasos organizada de forma apropiada.

La expresión de la proteína reguladora génica Prox1 diferencia a las células endoteliales de los vasos linfáticos de las células endoteliales arteriales y venosas. Este gen activa un subgrupo de células endoteliales en la pared de una vena de gran calibre (la vena cardíaca) del embrión, convirtiendo dichas células en progenitoras linfáticas. A partir de ellas, se forma por gemación el conjunto de los vasos linfáticos tal como se acaba de describir. Prox1 induce en las células linfáticas la expresión de receptores para distintos miembros de la familia de moléculas guía VEGF, así como proteínas que impiden la formación de conexiones entre las células linfáticas y los vasos sanguíneos.

Los tejidos que necesitan irrigación sanguínea producen VEGF; la señalización Notch entre las células endoteliales regula la respuesta

En los vertebrados casi cada una de las células de cada tejido está situada a unos 50-100 μm de un capilar. ¿Qué tipo de mecanismo garantiza que el sistema vascular sanguíneo se ramifique en cada rincón y en cada ranura? ¿Cómo llega a ajustarse de forma tan perfecta a las necesidades locales de los tejidos, no sólo durante el desarrollo normal, sino también en cualquier tipo de situaciones patológicas? Por ejemplo, una herida induce un brote de crecimiento capilar en la proximidad de la lesión para responder a los elevados requerimientos metabólicos del proceso de reparación (**Figura 23–34**). Los irritantes locales y las infecciones también provocan una proliferación de nuevos capilares, la mayoría de los cuales entran en regresión y desaparecen cuando la inflamación se atenúa. De forma menos benigna, un pequeño fragmento de tumor de tejido implantado en la córnea, que normalmente carece de vasos sanguíneos, provoca un rápido crecimiento vascular desde el margen vascular de la córnea hasta la zona del implante; la velocidad de crecimiento del tumor aumenta bruscamente en el momento en que es alcanzado por los vasos.

En todos estos casos, las células endoteliales invasoras responden a señales producidas por el tejido que invaden. Las señales son complejas, pero existe una proteína denominada **factor de crecimiento endotelial vascular** (**VEGF**: ***v**ascular **e**ndothelial **g**rowth **f**actor*), que desempeña un papel esencial. Es una proteína relacionada con el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF: ***p**latelet-**d**erived **g**rowth **f**actor*). La regulación del crecimiento del vaso de sanguíneo para atender las necesidades del tejido depende del control de la producción de VEGF, a través de cambios de la estabilidad de su mRNA y de la velocidad de su transcripción. Este último control se conoce bastante bien. En prácticamente cualquier tipo celular, la falta de oxígeno provoca un aumento de concentración intracelular de la forma activa de una proteína reguladora génica denominada **factor 1α inducible por hipoxia** (**HIF1α**: ***h**ypoxia-**i**nducible **f**actor **1α***). HIF1α estimula la transcripción del gen *Vegf* (y de otros genes cuyos productos son necesarios cuando se produce un aporte escaso de oxíge-

no). La proteína VEGF se segrega, difunde a través del tejido (con distintas isoformas de VEGF que difunden a distintas distancias) y actúa en la proximidad de las células endoteliales, estimulándolas a proliferar, a producir proteasas que contribuyen a digerir la pared vascular a través de la lámina basal y a formar brotes vasculares. Las células endoteliales estrelladas de los brotes detectan el gradiente de VEGF y se desplazan hacia su origen. (Otros factores de crecimiento, incluidos algunos miembros de la familia de los factores de crecimiento de fibroblastos, también pueden estimular la angiogénesis y generar reacciones frente a otras condiciones como en el caso de la inflamación.)

A medida que se van formando los nuevos vasos y van aportando sangre al tejido, la concentración de oxígeno aumenta, la actividad de HIF-1α disminuye y se interrumpe la producción de VEGF, con lo que la angiogénesis se detiene (**Figura 23–35**). Como en todos los sistemas de señalización, es tan importante interrumpir la señal correctamente como iniciarla de forma correcta. En un tejido oxigenado con normalidad, la continua degradación de la proteína HIF1α mantiene una baja concentración de dicha proteína: en presencia de oxígeno, una enzima que requiere oxígeno modifica HIF1α de forma que pueda ser degradada. A su vez, la degradación requiere el producto de otro gen, que codifica una subunidad de la ligasa de ubicuitina E3, que es defectuoso en la enfermedad denominada *síndrome de **v**on **H**ippel-**L**indau (VHL).* Las personas afectadas nacen con una sola copia funcional del gen *Vhl*; las mutaciones se producen al azar en todo el cuerpo afectando a todas aquellas células en las que dos copias del gen son defectuosas. Estas células contienen grandes cantidades de HIF1, independientemente de la disponibilidad de oxígeno, lo cual desencadena la sobreproducción continuada de VEGF. Como resultado de ello se desarrollan los *hemangioblastomas*, tumores que contienen densas masas de vasos sanguíneos. Las células mutantes que producen el VEGF se ven impulsadas a proliferar, debido al grado elevado de nutrición que proporciona el exceso de vasos sanguíneos y se genera un círculo vicioso que estimula el crecimiento del tumor. La pérdida del gen VHL también da lugar a otros tipos de tumores además de los hemangioblastomas, por mecanismos que pueden ser independientes de los efectos de la angiogénesis.

Sin embargo, el control de la angiogénesis también implica, aparte del VEGF y otros factores del tejido diana, esenciales para estimular y guiar la angiogénesis, las interacciones entre las células endoteliales, activadas por la vía de señalización Notch, que desempeñan una función crítica. Estas interacciones controlan a las células que quedarán señaladas para comportarse como células endoteliales estrelladas, extendiendo sus filopodios y avanzando para generar nuevos brotes vasculares y también se requieren para detener esta motilidad en el momento preciso. De este modo, normalmente cuando se encuentran los brotes endoteliales y se fusionan formando un circuito vascular, se activan reduciendo la actividad de gemación. El efecto depende de un ligando específico de Notch, denominado Delta4, que se expresa en las células endoteliales estrelladas activando Notch en las células adyacentes; di-

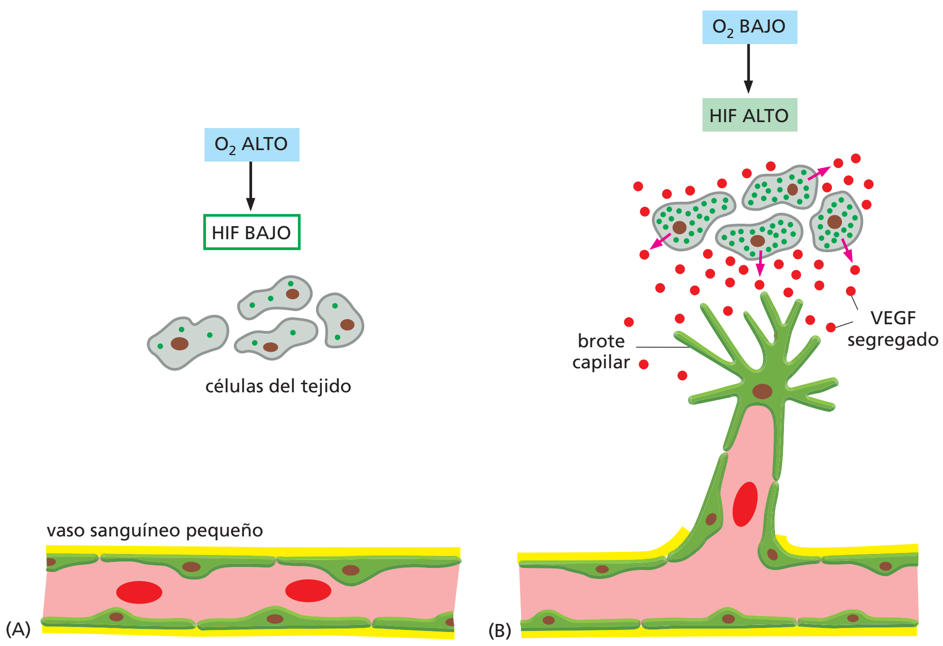


Figura 23–35 El mecanismo regulador que controla el crecimiento de los vasos sanguíneos responde a las necesidades de oxígeno de un tejido. La falta de oxígeno provoca la segregación de VEGF, que estimula la angiogénesis.

cha activación da lugar a la expresión reducida de los receptores VEGF y se produce una falta de respuesta a VEGF en las células adyacentes a la célula endotelial estrellada. En mutantes defectuosos en la señalización Notch, el comportamiento de gemación continúa de forma irregular y queda restringido a las células endoteliales estrelladas. Este hecho da como resultado una red demasiado densa de vasos no funcionales, desorganizados, que no transportan o transportan muy poca sangre.

Las señales de las células endoteliales controlan la incorporación de los pericitos y de células musculares lisas formando la pared del vaso

A medida que crece y se adapta, la red vascular se remodela de forma continua. Un vaso recién formado puede ensancharse, producir ramificaciones laterales por gemación o retraerse. El músculo liso y otras células del tejido conjuntivo que se autoensamblan alrededor del endotelio (véase Figura 23–32) contribuyen a estabilizar los vasos cuando éstos se ensanchan. Este proceso de formación de la pared de los vasos empieza con la incorporación de los pericitos. Un número reducido de dichas células se desplazan acompañadas de las células del tallo de cada brote endotelial. La incorporación y proliferación de pericitos y de células musculares lisas para formar la pared de un vaso depende del PDGF-B segregado por las células endoteliales y de los receptores de PDGF de los pericitos y de las células musculares lisas. En mutantes defectuosos de esta proteína señalizadora o de su receptor, estas células de las paredes de los vasos no se localizan en muchas zonas. Como resultado, los vasos sanguíneos embrionarios desarrollan microaneurismas –dilataciones patológicas microscópicas– que ocasionalmente pueden romperse, así como otras alteraciones que reflejan la importancia del intercambio de señales en ambos sentidos entre las células externas del vaso y las células endoteliales.

Cuando un vaso ha madurado, las señales que van desde las células endoteliales hasta el tejido conjuntivo periférico subyacente y la musculatura lisa continúan regulando la estructura y la función vascular. Por ejemplo, las células endoteliales tienen mecanorreceptores en su superficie que les permiten detectar las variaciones de tensión debidas al flujo sanguíneo. Las células reaccionan generando y desprendiendo el gas NO, señalizando así a las células periféricas e induciendo cambios en el diámetro de los vasos y en el grosor de las paredes para adaptarse al flujo sanguíneo. Las células endoteliales también median respuestas rápidas a señales neurales para la dilatación de los vasos sanguíneos, liberando NO que relaja la musculatura lisa de las paredes de estos vasos, como se describe en el Capítulo 15.

Resumen

Las células endoteliales son los elementos fundamentales del sistema vascular. Forman una sola capa de células que reviste todos los vasos sanguíneos y linfáticos y regula los intercambios entre el flujo sanguíneo y los tejidos circundantes. Los nuevos vasos se desarrollan como brotes endoteliales a partir de las paredes de los pequeños vasos preexistentes. Una célula endotelial estrellada en el extremo terminal de cada brote extiende los filopodios que reaccionan frente a los gradientes de moléculas señalizadoras en el entorno, produciendo el crecimiento del brote de forma similar al cono de crecimiento de una neurona. Las células endoteliales del tallo, localizadas a continuación, quedan huecas y forman un capilar. Las células endoteliales de las arterias, las venas y los vasos linfáticos en desarrollo expresan distintas proteínas de superficie, que pueden controlar la forma en que deben encajar dando lugar a una red de capilares. Las señales que emiten las células endoteliales organizan el crecimiento y desarrollo de las células del tejido conjuntivo que forman las capas periféricas de la pared del vaso.

Un mecanismo homeostático garantiza que los vasos sanguíneos penetren en todas y cada una de las regiones del cuerpo. Las células que disponen de poco oxígeno aumentan la concentración de factor 1 inducible por hipoxia (HIF1α), el cual estimula la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). VEGF actúa sobre las células endoteliales provocando su proliferación y la invasión del tejido hipóxico proporcionando nuevos vasos sanguíneos. Las células endoteliales también interactúan entre sí a través de la vía Notch. Este intercambio de señales Notch es necesario para limitar el número de células que se comportan como células endoteliales estrelladas y detener su comportamiento angiogénico.

RENOVACIÓN MEDIANTE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENCIALES: FORMACIÓN DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

La sangre contiene muchos tipos celulares con funciones que abarcan desde el transporte de oxígeno hasta la producción de anticuerpos. Algunas de estas células se encuentran en el sistema vascular, mientras que otras sólo utilizan este sistema vascular como medio de transporte, ya que actúan en otros lugares. Sin embargo, todas las células sanguíneas presentan similitudes en su ciclo vital. Todas ellas tienen una vida de duración limitada y se reproducen de forma continua a lo largo de toda la vida del animal. La característica más notable, sin embargo, es que todas ellas se generan, en último término, a partir de una célula madre común de la médula ósea roja. Por lo tanto, esta *célula madre hemopoyética* (formadora de sangre, también denominada *hematopoyética*) es pluripotencial ya que da lugar a todos los tipos de células sanguíneas diferenciadas así como a otros tipos celulares como los osteoclastos del hueso, que se describirán más adelante.

Las células sanguíneas se pueden clasificar en rojas y blancas (**Figura 23–36**). Los **glóbulos rojos** o **eritrocitos** permanecen en el interior de los vasos sanguíneos y transportan O_2 y CO_2 unidos a la hemoglobina. Los **glóbulos blancos** o **leucocitos** combaten las infecciones y, en algunos casos, fagocitan y digieren sustancias residuales. Los leucocitos, a diferencia de los eritrocitos, para llevar a cabo sus funciones deben abrirse paso a través de las paredes de los vasos sanguíneos de pequeño calibre y deben migrar hacia los tejidos. Además la sangre presenta un gran número de **plaquetas**, que no son células completas sino pequeños fragmentos de células o "minicélulas", que derivan del citoplasma cortical de grandes células denominadas *megacariocitos*. Las plaquetas se adhieren de forma específica a las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos lesionados e intervienen en la reparación de las roturas y brechas, así como en la coagulación de la sangre.

Los tres tipos principales de glóbulos blancos son granulocitos, monocitos y linfocitos

Todos los glóbulos rojos corresponden a un solo tipo de células en función de su línea de desarrollo durante la maduración, y lo mismo ocurre con las plaquetas; sin embargo existen tipos celulares distintos de glóbulos blancos. Clásicamente, los glóbulos blancos se agrupan en tres categorías principales, en función de su aspecto al microscopio óptico: granulocitos, monocitos y linfocitos.

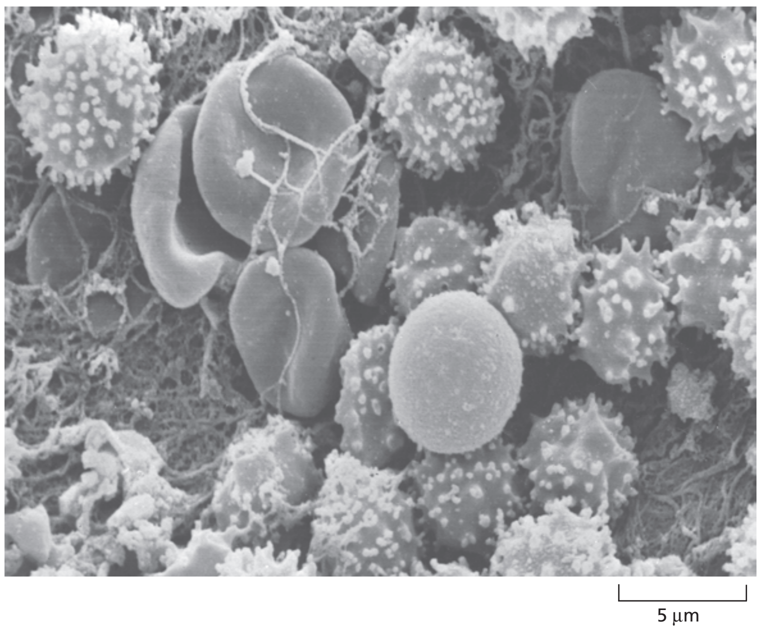
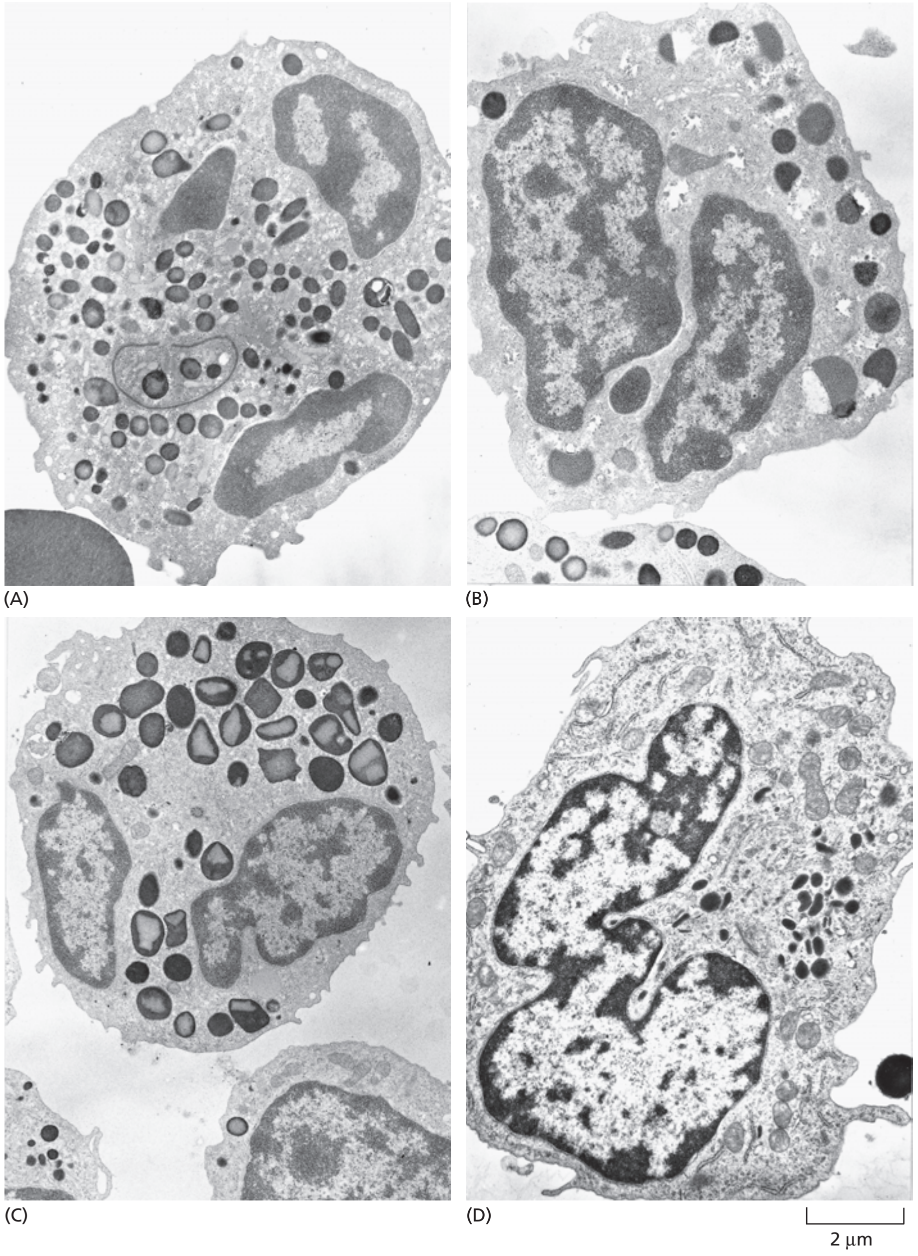


Figura 23–36 Electromicrografía de barrido de células sanguíneas de un mamífero atrapadas en un coágulo de sangre. Las células más grandes y esféricas y con una superficie rugosa son los glóbulos blancos; las células más lisas y aplanadas son los glóbulos rojos. (Cortesía de Ray Moss.)



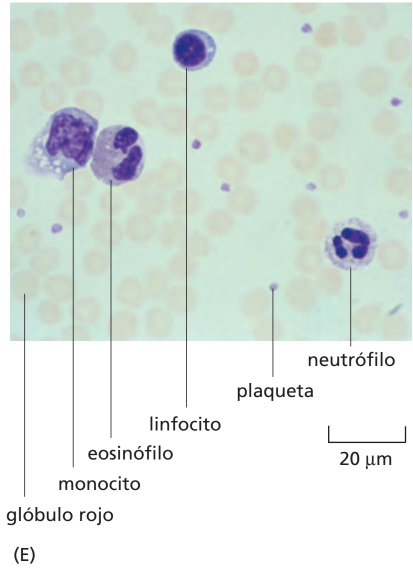


Figura 23–37 Los glóbulos blancos de la sangre. (A-D) Estas electromicrografías muestran (A) un neutrófilo, (B) un basófilo, (C) un eosinófilo y (D) un monocito. En la Figura 25–7 se presentan electromicrografías de linfocitos. Cada uno de los tipos celulares representados tienen una función diferente, que se refleja en los tipos característicos de gránulos de secreción y de lisosomas que contiene. Cada célula tiene un solo núcleo, aunque éste tiene una forma lobulada irregular y en (A), (B) y (C) las conexiones entre los lóbulos se encuentran fuera del plano de la sección. (E) Micrografía de un frotis sanguíneo teñido con la técnica de Romanowsky, que colorea intensamente los glóbulos blancos de la sangre. (A-D, a partir de B.A. Nichols et al., *J. Cell Biol*. 50:498-515, 1971. Con la autorización de The Rockefeller University Press; E, cortesía de David Mason.)

Los **granulocitos** contienen numerosos lisosomas y vesículas secretoras (o gránulos) y se subdividen en tres clases según la morfología y las propiedades tintoriales de estos orgánulos (**Figura 23–37**). Las características tintoriales reflejan diferencias importantes en cuanto a sus propiedades químicas y a su función. Los *neutrófilos* (también denominados *leucocitos polimorfonucleares* debido a su núcleo multilobulado) constituyen el tipo de granulocitos más numeroso; al fagocitar y destruir pequeños organismos, especialmente bacterias, desempeñan un papel esencial en la inmunidad innata frente a la infección bacteriana, como se tratará en el Capítulo 25. Los *basófilos* segregan histamina (y en algunas especies, serotonina) que actúa en las reacciones inflamatorias, y están estrechamente relacionados con los *mastocitos*, que se encuentran en los tejidos conjuntivos y que también se originan a partir de las células madre hematopoyéticas. Los *eosinófilos* intervienen en la destrucción de parásitos y modulan las respuestas inflamatorias de tipo alérgico.

Una vez han abandonado la circulación sanguínea, los **monocitos** (véase Figura 23–37D) se transforman en **macrófagos**, que junto con los neutrófilos son los principales "fagocitos profesionales" del organismo. Como se describe en el Capítulo 13, los distintos tipos de células fagocíticas contienen lisosomas que se fusionan con las vesículas fagocíticas

(fagosomas) recién formadas, exponiendo los microorganismos fagocitados a la acción de complejos enzimáticos, a moléculas altamente reactivas de superóxido (O_2^-) y a hipoclorito (HOCl, el ingrediente activo de la lejía), así como al ataque por una mezcla concentrada de hidrolasas lisosómicas. Los macrófagos, sin embargo, son mucho más grandes y tienen una vida más larga que los neutrófilos. Reconocen y eliminan las células alteradas, envejecidas y muertas de muchos tejidos y son los únicos capaces de ingerir grandes microorganismos como los protozoos.

Los monocitos también dan lugar a las *células dendríticas*, como las *células de Langerhans* descamadas de la epidermis. Como los macrófagos, las células dendríticas son células migratorias que pueden ingerir sustancias y organismos extraños, pero no tienen la misma capacidad de fagocitosis. Sin embargo, se especializan como presentadoras de antígenos a los linfocitos desencadenando la respuesta inmunitaria. Las células de Langerhans, por ejemplo, ingieren antígenos extraños en la epidermis y transportan estos trofeos hasta los nódulos linfáticos, presentándolos a los linfocitos.

Existen dos tipos principales de **linfocitos**, ambos implicados en el funcionamiento de las respuestas inmunitarias: los *linfocitos B* fabrican anticuerpos, mientras que los *linfocitos T* eliminan células infectadas por virus y regulan la actividad de otros glóbulos blancos. Además existen células de carácter linfocitario denominadas *células citotóxicas naturales* o *células NK* (***n**atural **k**iller **c**ells*) que destruyen ciertos tipos específicos de células tumorales y de células infectadas por virus. La producción de linfocitos es un tema especializado que será descrito con más detalle en el Capítulo 25. Ahora vamos a centrarnos principalmente en el proceso de formación de los otros glóbulos blancos, también denominados, en conjunto, **células mieloides.**

La **Tabla 23–1** resume los diferentes tipos de células sanguíneas y sus funciones.

Tabla 23–1 Células sanguíneas

TIPO CELULAR	FUNCIONES PRINCIPALES	CONCENTRACIONES CARACTERÍSTICAS EN SANGRE HUMANA (CÉLULAS/LITRO)
Glóbulos rojos (eritrocitos)	transportan O_2 y CO_2	5×10^{12}
Glóbulos blancos (leucocitos)		
Granulocitos		
Neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares)	fagocitan y destruyen bacterias invasoras	5×10^9
Eosinófilos	destruyen parásitos y modulan respuestas inflamatorias de tipo alérgico	2×10^8
Basófilos	liberan histamina (y en algunas especies, serotonina) en ciertas reacciones inmunitarias	4×10^7
Monocitos	se convierten en macrófagos y pueden fagocitar y digerir microorganismos invasores, cuerpos extraños y células envejecidas	4×10^8
Linfocitos		
células B	fabrican anticuerpos	2×10^9
células T	eliminan células infectadas por virus y regulan la actividad de otros leucocitos	1×10^9
Células citotóxicas naturales (NK)	eliminan células infectadas por virus y algunas células tumorales	1×10^8
Plaquetas (fragmentos celulares procedentes de *megacariocitos* de la médula ósea)	inician el proceso de coagulación	3×10^{11}

El cuerpo humano contiene alrededor de 5 litros de sangre, que supone un 7% del peso corporal. Los glóbulos rojos constituyen alrededor de un 45% de este volumen y los glóbulos blancos alrededor de un 1%, el resto es el plasma sanguíneo líquido.

La producción de los distintos tipos de células sanguíneas en la médula ósea roja está controlada individualmente

La mayor parte de los glóbulos blancos no actúa en la sangre sino en otros tejidos; la sangre únicamente los transporta a los lugares donde se necesitan. Una infección localizada o una herida en algún tejido atrae rápido a los glóbulos blancos hacia la región afectada, como parte de una respuesta inflamatoria que actúa contra la infección o reparando la herida.

La respuesta inflamatoria es compleja y se transmite mediante distintas moléculas señal producidas de forma local por mastocitos, terminaciones nerviosas, plaquetas y glóbulos blancos, así como por la activación del complemento (descrito en los Capítulos 24 y 25). Algunas de estas moléculas señal actúan cerca de los capilares y provocan una disminución de la adhesión entre las células endoteliales pero incrementan la adherencia de la superficie de estas células a los glóbulos blancos circulantes. Así, los glóbulos blancos quedan atrapados en la superficie interna del vaso como mariposas en un cazamariposas, de donde pueden escapar deslizándose entre las células endoteliales y atravesando la lámina basal. <ACCG> Como se describió en el Capítulo 19, los receptores de migración denominados *selectinas* realizan la unión inicial con las células endoteliales, mientras que las *integrinas* llevan a cabo la unión más estrecha que requieren los glóbulos blancos para atravesar la pared de los vasos sanguíneos (véase Figura 19–19). Los tejidos lesionados o inflamados y las células endoteliales segregan otras moléculas denominadas *quimioquinas*, que actúan como agentes quimiotácticos para distintos tipos de glóbulos blancos, provocando la polarización de estas células, que las hace avanzar hacia el lugar de origen del agente quimiotáctico. Como resultado de de este proceso, un gran número de glóbulos blancos penetran en el tejido afectado (**Figura 23–38**).

Otras moléculas señalizadoras producidas durante una respuesta inflamatoria escapan de la sangre y estimulan a la médula ósea roja a que produzca más leucocitos, liberándolos hacia la circulación sanguínea. La médula ósea roja constituye el objetivo principal de esta regulación ya que, con excepción de los linfocitos y de algunos macrófagos, en los mamíferos adultos la mayoría de tipos de glóbulos blancos sólo se generan en la médula ósea. La regulación tiende a ser específica para cada tipo celular: algunas infecciones bacterianas, por ejemplo, provocan un aumento selectivo de neutrófilos, mientras que las infecciones por protozoos y por otros parásitos provocan un incremento selectivo de eosinófilos. (Por este motivo se realizan recuentos diferenciales rutinarios de glóbulos blancos para emitir el diagnóstico de infecciones y de otras enfermedades inflamatorias.)

En otras circunstancias, se incrementa selectivamente la producción de eritrocitos, por ejemplo, en el proceso de aclimatación de individuos que viven en altitudes elevadas, donde el oxígeno es más escaso. Esta formación de células sanguíneas, o *hemopoyesis (*también denominada *hematopoyesis*), implica necesariamente controles complejos que regulan de forma individual la producción de cada uno de los tipos de células sanguíneas de forma que pueden variar de acuerdo con las necesidades. Comprender cómo actúan dichos controles constituye un problema de gran importancia médica.

En animales intactos, la hematopoyesis es más difícil de analizar que la renovación celular en un tejido como la epidermis o el revestimiento intestinal, donde una organización espacial regular facilita el seguimiento del proceso de renovación y la localización de las células madre. Los tejidos hematopoyéticos no están tan ordenados. Sin embargo, las células hematopoyéticas tienen una forma de vida nómada que las hace más accesibles a otros tipos de estudios experimentales. Las células hematopoyéticas dispersas se pueden obtener y transferir fácilmente, sin alteraciones, de un animal a otro. Además, en estas células mantenidas en cultivo, se puede observar y analizar la proliferación y la diferenciación de células individuales y de su descendencia. Además, existen numerosos marcadores moleculares que caracterizan los diferentes estadios de la diferenciación. Por este motivo, se dispone de más datos sobre las moléculas que controlan la producción de células sanguíneas que sobre los mecanismos de control de la producción celular en otros tejidos de mamíferos. Los estudios sobre hematopoyesis están muy influenciados por los conocimientos actuales sobre los sistemas de células madre en general.

La médula ósea roja contiene las células madre hematopoyéticas

En la médula ósea roja se pueden distinguir los diferentes tipos de células sanguíneas y sus precursores inmediatos mediante técnicas de tinción rutinarias (**Figura 23–39**). Todas ellas

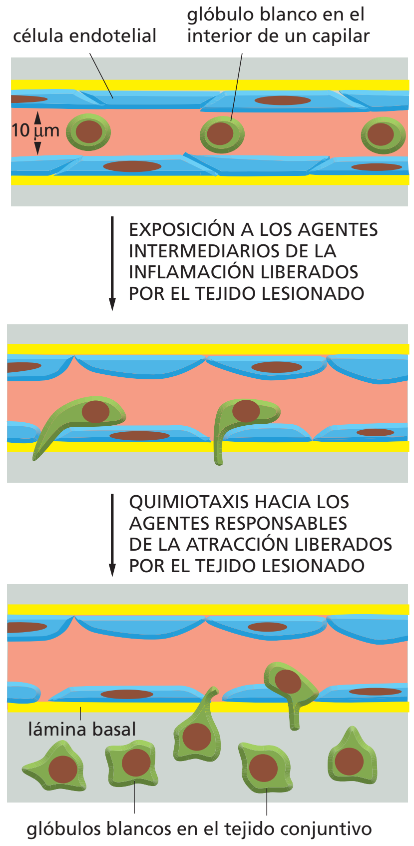


Figura 23–38 Migración de los glóbulos blancos de la sangre desde el torrente sanguíneo durante una respuesta inflamatoria. La respuesta se inicia a través de moléculas señalizadoras producidas localmente por células próximas (sobre todo del tejido conjuntivo) o por activación del complemento. Algunos de estos agentes intermediarios actúan en las células endoteliales de los capilares y provocan la pérdida de su adhesión a las células próximas de modo que los capilares se vuelven más permeables. También se estimulan las células endoteliales a expresar selectinas, moléculas de la superficie celular que reconocen de forma específica algunos carbohidratos, localizados en la superficie de los leucocitos de la sangre, y provocan su adhesión al endotelio. Los tejidos inflamados y las células endoteliales locales segregan agentes intermediarios denominados quimioquinas, que actúan como factores quimiotácticos dirigiendo el avance de los leucocitos que penetran entre las células endoteliales de los capilares hacia el interior del tejido.

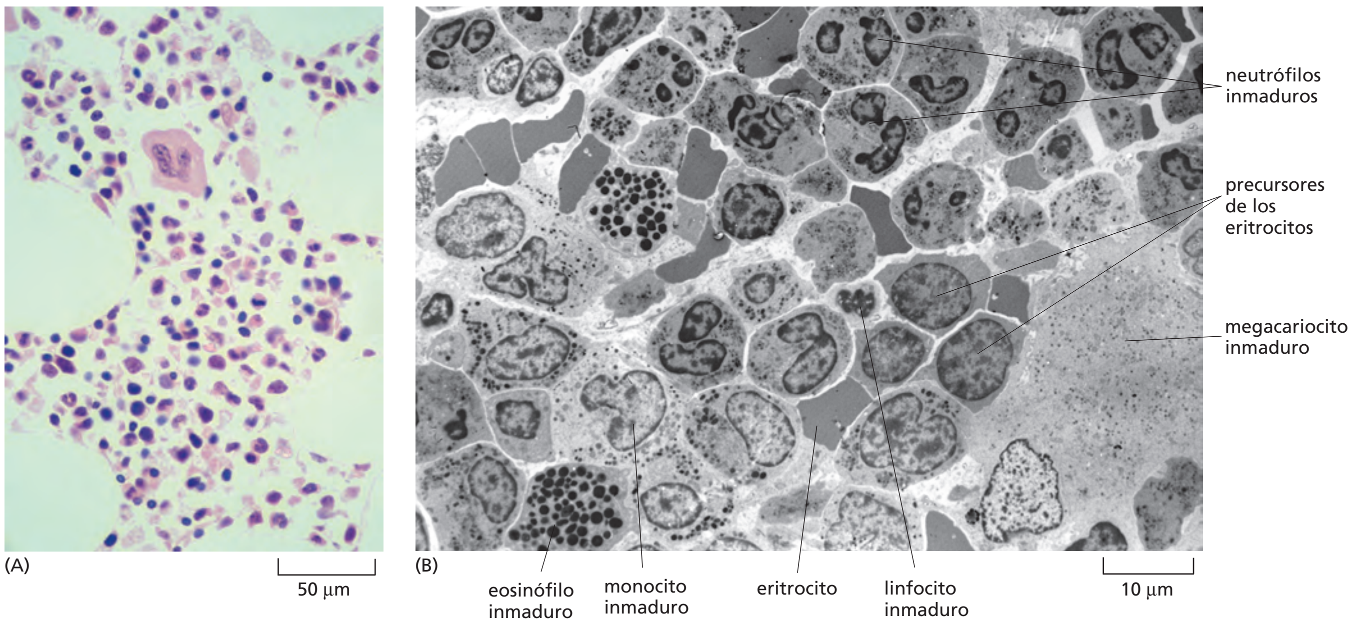


Figura 23–39 Médula ósea roja. (A) Micrografía de una sección teñida. Los grandes espacios vacíos corresponden a adipocitos, cuyo contenido lipídico se ha disuelto durante la preparación de la muestra. La célula gigante con un núcleo lobulado es un megacariocito. (B) Electromicrografía a bajo aumento. La médula ósea es la fuente principal de nuevas células sanguíneas (excepto de linfocitos T, que se producen en el timo). Obsérvese cómo las células sanguíneas inmaduras de un tipo determinado tienden a concentrarse en "grupos familiares". (A, cortesía de David Mason; B, a partir de J.A.G. Rhodin, Histology: A Text and Atlas. Nueva York: Oxford University Press, 1974.)

se encuentran entremezcladas unas con otras, así como con los adipocitos y con otras células del estroma (células del tejido conjuntivo), formando una delicada red estructural de fibras de colágena y de otros componentes de la matriz extracelular. Además, todo el tejido conjuntivo está altamente irrigado por vasos sanguíneos de paredes muy finas, denominados *sinusoides sanguíneos*, al interior de los cuales van a parar las nuevas células. También se encuentran los **megacariocitos**; estas células, a diferencia de otras células sanguíneas, permanecen en la médula ósea roja después de haber madurado lo que constituye una de sus características más relevantes; además son extraordinariamente grandes (con un diámetro de más de 60 µm) y presentan un núcleo con poliploidía elevada. Por lo general se hallan adosadas a los sinusoides y extienden sus expansiones a través de los poros del revestimiento endotelial de estos vasos; las plaquetas se fragmentan por sus expansiones y son arrastradas por la sangre (**Figura 23–40**). <GCAT>

Debido a la compleja ordenación celular de la médula ósea, en las secciones histológicas del tejido resulta difícil la identificación de los precursores inmediatos de las células sanguíneas maduras. Las células que están en estadios tempranos de desarrollo, antes de que inicien ningún tipo de diferenciación, parecen muy similares y, aunque la distribución espacial de los tipos celulares presenta una cierta ordenación, no existe ninguna característica visible que permita reconocer las últimas células madre constituidas. Para su identificación y caracterización hace falta una prueba funcional, que consiste en el marcaje de la descendencia de cada célula. Como veremos, esto puede realizarse *in vitro* simplemente examinando las colonias que producen las células aisladas. Sin embargo, el sistema hema-

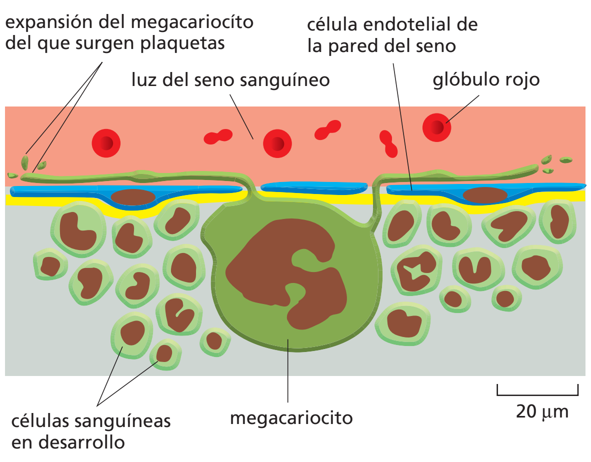


Figura 23–40 Un megacariocito situado entre las células de la médula ósea roja. Su enorme tamaño es el resultado de un núcleo con elevada poliploidía. Un megacariocito produce alrededor de 10.000 plaquetas, que se separan a partir de largas expansiones que se extienden a través de los orificios de las paredes de un seno sanguíneo adyacente.

topoyético se puede manipular de forma que los clones celulares puedan ser reconocidos *in vivo* en el animal intacto.

Cuando se expone un animal a una dosis elevada de rayos X, las células hematopoyéticas se destruyen y el animal muere a los pocos días como consecuencia de su incapacidad para producir nuevas células sanguíneas. Sin embargo, el animal irradiado puede salvarse mediante una transfusión de células extraídas de la médula ósea de un donante sano inmunológicamente compatible. Entre estas células existen algunas que pueden colonizar al huésped irradiado y proporcionarle un nuevo tejido hematopoyético de forma permanente (**Figura 23–41**). Este tipo de experimentos demuestran que la médula ósea contiene células madre hematopoyéticas. También muestran cómo se puede detectar la presencia de células madre hematopoyéticas y así poner en evidencia las características moleculares que las distinguen del resto de células.

Con este objetivo, las células extraídas de la médula ósea roja se clasifican (mediante un clasificador celular activado por fluorescencia) en función de los antígenos de superficie que presentan; las distintas fracciones se transfunden de nuevo a los ratones irradiados. Si una de estas fracciones salva a un ratón irradiado, es que contiene células madre hematopoyéticas. De este modo, ha sido posible demostrar que las células madre hematopoyéticas se caracterizan por una combinación específica de proteínas de superficie y mediante una clasificación adecuada podemos obtener preparaciones casi puras de células madre. Las células madre constituyen una diminuta fracción de la población de la médula ósea roja, alrededor de 1 de cada 10.000 células, pero son suficientes. Sólo con cinco células inyectadas en un ratón huésped con hematopoyesis defectuosa es suficiente para reconstituir su sistema hematopoyético completo, originando un conjunto completo de tipos celulares sanguíneos, así como de células madre nuevas.



Figura 23–41 Recuperación de un ratón irradiado mediante una transfusión de células de médula ósea roja. Un procedimiento esencialmente similar a éste se utiliza en el tratamiento de la leucemia en pacientes humanos, mediante el trasplante de médula ósea.

Una célula madre pluripotencial da lugar a todos los tipos de células sanguíneas

Para ver qué variedad de tipos celulares puede generar una sola **célula madre hematopoyética**, se necesita algún tipo de marcaje del destino de dicha estirpe. Esto se puede realizar marcando genéticamente la célula madre individual, de forma que la descendencia pueda identificarse incluso después de haberse transferido a la circulación sanguínea. Aunque se han utilizado distintos métodos para ello, un retrovirus diseñado de forma específica (un vector retroviral que transporta un gen marcador) sirve perfectamente para este fin. El virus marcador, igual que otros retrovirus, puede insertar su propio genoma en los cromosomas de la célula infectada, pero en este caso los genes que deberían permitir generar nuevas partículas víricas infecciosas han sido eliminados. Por lo tanto, el marcador sólo se halla en la progenie de las células infectadas inicialmente, de forma que esta descendencia se podrá diferenciar de la de otras células debido a que las regiones cromosómicas de inserción del virus son distintas. Para analizar las estirpes celulares hematopoyéticas, las células de la médula ósea roja se infectan primero con el vector retroviral *in vitro* y más tarde se transfieren a un animal receptor irradiado para eliminar sus células hematopoyéticas. Así, se pueden utilizar sondas de DNA para seguir la progenie de células individuales infectadas en los distintos tejidos hematopoyéticos y linfáticos del huésped. Estos experimentos demuestran que la célula madre hematopoyética es *pluripotencial* y puede dar lugar a una amplia variedad de tipos celulares sanguíneos, tanto mieloides como linfoides, así como a nuevas células madre similares a ella (**Figura 23–42**).

Al final del capítulo explicamos cómo los mismos métodos que se han desarrollado en la experimentación con ratones se utilizan en la actualidad para el tratamiento de enfermedades en el hombre.

La determinación es un proceso gradual

Las células madre hematopoyéticas no pasan directamente de un estadio pluripotencial a uno determinado por un sola etapa diferenciación, sino que atraviesan una serie de restricciones progresivas. Por lo general, la primera etapa es el compromiso hacia un destino linfoide o mieloide. Este hecho es lo que posiblemente da lugar a dos tipos de células progenitoras, una capaz de generar un gran número de distintos tipos de células mieloides o quizás de células mieloides y de linfocitos B, y la otra de generar grandes cantidades de los

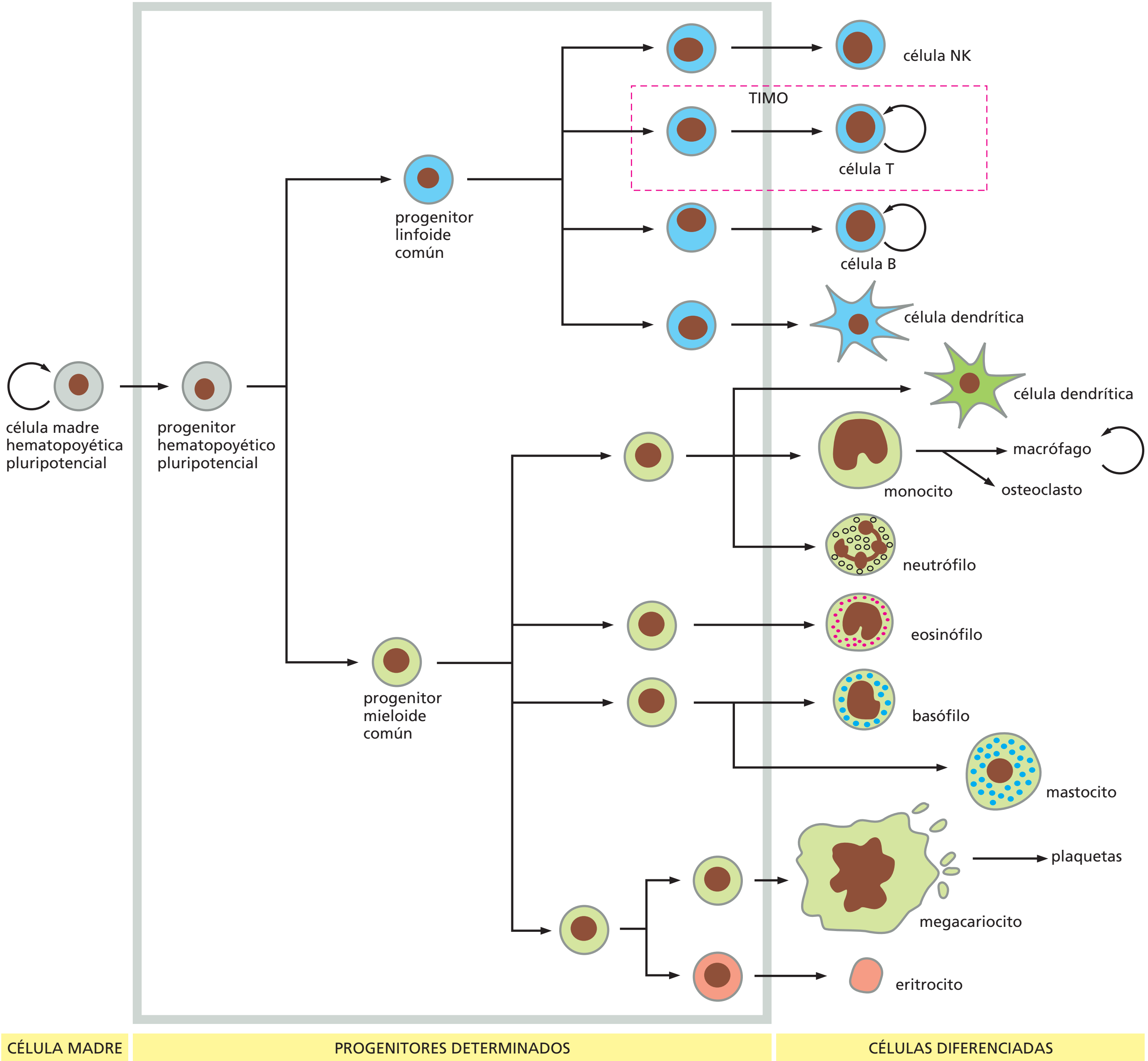


Figura 23–42 Esquema provisional de la hematopoyesis. Normalmente la célula madre pluripotente se divide pocas veces, y genera más células madre pluripotentes, que se autorrenuevan, o células progenitoras determinadas, que antes de diferenciarse se podrán dividir un número limitado de veces. Al diferenciarse formarán células maduras de la sangre. A medida que van sufriendo divisiones, las progenitoras se vuelven de forma progresiva más especializadas en la variedad de tipos celulares a que pueden dar origen, como indican las ramificaciones de la descendencia celular en la zona encerrada en el rectángulo *gris* del esquema. Sin embargo, muchos de los detalles de esta parte del esquema de la descendencia todavía son objeto de debate. En los mamíferos adultos, todas las células que se muestran se desarrollan en la médula ósea, excepto los linfocitos T, que se desarrollan en el timo, y los macrófagos y los osteoclastos que se desarrollan a partir de los monocitos de la sangre. También puede ocurrir que algunas células dendríticas provengan de los monocitos.

diferentes tipos de células linfoides o por lo menos de linfocitos T. Las etapas posteriores dan lugar a progenitores comprometidos en la producción de un solo tipo celular. Las etapas de la determinación se encuentran correlacionadas con los cambios de expresión de un determinado gen de proteínas reguladoras, necesarias para la producción de distintos subgrupos de células sanguíneas. Al parecer, estas proteínas actúan de forma combinatoria complicada: por ejemplo, la *proteína GATA1* es necesaria para la maduración de los glóbulos rojos, pero sólo es activa en etapas muy tempranas de la vía hematopoyética.

Las divisiones de las células progenitoras comprometidas amplifican el número de células sanguíneas especializadas

Por lo general, las células progenitoras hematopoyéticas se vuelven determinadas o comprometidas a una vía especial de diferenciación mucho antes de detener su proliferación y diferenciarse de forma terminal. Los progenitores comprometidos pasan por varias etapas de división celular hasta amplificar el número definitivo de células de un determinado tipo. De este modo, una división de una sola célula madre puede conducir a la producción de miles de progenies diferenciadas, lo cual explica por qué el número de células madre es una fracción tan pequeña de la población total de células hematopoyéticas. Por este mismo motivo puede mantenerse una velocidad elevada de producción de células sanguíneas a pesar de que la velocidad de división de las células madre sea baja. Como hemos comentado, la división poco frecuente o quiescencia es una característica común de las células madre en varios tejidos. Mediante la reducción del número de divisiones que las células madre puedan presentar en el transcurso de una vida, se reduce el riesgo de generar mutaciones en las células madre, que podrían dar lugar a clones de células mutantes persistentes en el organismo. Además reduce el riesgo de senescencia replicativa (descrito en el Capítulo 17). En realidad, las células madre hemopoyéticas que se ven forzadas a dividirse rápidamente (por silenciamiento del gen denominado *Gfi1* que limita la velocidad de proliferación o por otros medios) no logran mantener la hemopoyesis durante un ciclo de vida normal completo.

El carácter escalonado de la determinación significa que el sistema hematopoyético puede considerarse como un árbol genealógico jerárquico de células. Las células madre pluripotenciales dan lugar a las *células progenitoras comprometidas*, que se especializan en la producción de uno o de unos cuantos tipo celulares sanguíneos. Las células progenitoras comprometidas se dividen con rapidez, pero sólo un número limitado de veces, antes de diferenciarse de forma terminal en células que ya no se dividen y mueren al cabo de unos días o unas semanas. Normalmente, muchas células mueren durante las etapas más tempranas de la vía. Estudios sobre cultivos celulares proporcionan un modo de determinar cómo se regula la proliferación, la diferenciación y la muerte de las células hematopoyéticas.

Las células madre hematopoyéticas dependen de señales de contacto con las células del estroma

En un cultivo, las células hematopoyéticas sólo pueden sobrevivir, proliferar y diferenciarse, si disponen de proteínas señal específicas o están acompañadas por células que producen dichas proteínas. Si no disponen de estas proteínas, las células mueren. Para un mantenimiento a largo plazo, también parece que es necesario el contacto con las células de soporte adecuadas: la hematopoyesis puede mantenerse *in vitro* durante meses o incluso años, cultivando las células madre hematopoyéticas de la médula ósea de forma que queden distribuidas en la parte superior de una capa de células del estroma, las cuales mimetizan el entorno de la médula ósea intacta. Este tipo de cultivos puede generar todos los tipos de células mieloides y su continuidad a largo plazo implica que las células madre, igual que su descendencia diferenciada, se producirán de forma continua.

En la médula ósea, donde normalmente se encuentran, las células madre hematopoyéticas se localizan sobre todo en estrecho contacto con los *osteoblastos* que revisten las superficies óseas de la cavidad medular –las células que producen la matriz ósea. Los tratamientos y mutaciones que aumentan o disminuyen el número de osteoblastos producen los cambios correspondientes en el número de células hematopoyéticas. Este hallazgo sugiere que los osteoblastos aportan las señales que necesitan las células madre hematopoyéticas para mantenerse en su estado no comprometido de células madre, igual que las criptas intestinales proporcionan las señales necesarias para mantener las células madre del epitelio intestinal. En ambos sistemas, las células madre normalmente se hallan confinadas en un nicho concreto y cuando pierden el contacto con él, tienden a perder su potencial de célula madre (**Figura 23–43**). Las células madre hematopoyéticas de la médula ósea y de otras zonas se encuentran a menudo asociadas con un tipo especializado de células endoteliales, que puede aportarles un nicho alternativo.

Como en el caso del intestino, una característica esencial del nicho de células madre de la médula ósea es que proporciona la estimulación de la vía de señalización Wnt. La activación artificial de esta vía en células madre hematopoyéticas en cultivo contribuye a la supervivencia, proliferación y al mantenimiento de su carácter de células madre, mientras que

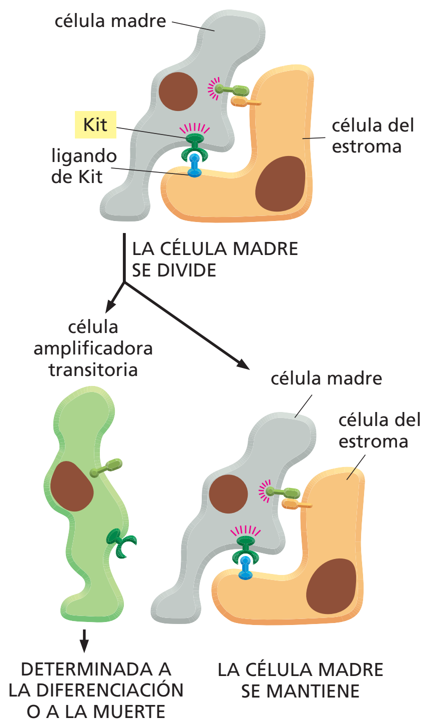


Figura 23–43 Dependencia de las células madre hematopoyéticas del contacto con las células del estroma. La interacción dependiente de contacto entre Kit y su ligando es uno de los diversos mecanismos de señalización que al parecer están implicados en el mantenimiento de las células madre hemopoyéticas. El sistema real es más complejo; la dependencia de las células hematopoyéticas del contacto con las células del estroma no puede ser absoluta, puesto que pequeñas cantidades de células madre funcionales se pueden encontrar circulando libremente.

el bloqueo de la señalización Wnt actúa de forma opuesta. Otra interacción importante para el mantenimiento de la hematopoyesis se ha deducido a partir del estudio de ratones mutantes con una curiosa combinación de defectos: reducción del número de glóbulos rojos (anemia), de células germinales (esterilidad) y de células pigmentarias (manchas blanquecinas en la piel; véase Figura 22–86). Como se trata en el Capítulo 22, este síndrome se produce como resultado de mutaciones en cada uno de los siguientes genes: uno de ellos, denominado *Kit* codifica un receptor tirosina quinasa; el otro codifica su ligando. Todos los tipos celulares afectados por estas mutaciones derivan de precursores migratorios. Al parecer, para que estos precursores sobrevivan y produzcan una descendencia normal, en cada caso tienen que expresar el receptor y deben acceder al ligando en su correspondiente entorno. Los estudios realizados en mutantes sugieren que para ser plenamente efectivo el ligando de Kit debe estar unido a la membrana, lo que implica que la hematopoyesis normal requiere el contacto directo célula-célula entre las células hematopoyéticas que expresan el receptor Kit y las células del estroma (osteoblastos entre otras) que expresan el ligando de Kit.

Los factores que regulan la hematopoyesis pueden analizarse en cultivo

Mientras que para su mantenimiento a largo plazo las células madre dependen del contacto con las células del estroma, para su progenie comprometida no es así o no lo es en el mismo grado. En efecto, células hematopoyéticas aisladas de la médula ósea se pueden cultivar en una matriz semisólida de agar diluido o de metilcelulosa, añadiendo de forma artificial al medio factores derivados de otras células. Debido a que las células no pueden migrar en la matriz semisólida, las células descendientes de cada célula precursora aislada permanecen juntas en forma de colonias fácilmente reconocibles. Por ejemplo, se puede observar cómo un progenitor neutrófilo comprometido llega a formar una colonia de miles de neutrófilos. Este sistema de cultivo ha proporcionado un sistema de análisis de los factores que regulan la hematopoyesis y, por lo tanto, permite purificarlos y estudiar su actividad. Estas sustancias se encuentran en forma de glucoproteínas y generalmente se denominan **factores estimuladores de colonias** (**CSF**: ***c****olony-****s****timulating* ***f****actors*). Del creciente número de CSF que se han definido y purificado, algunos circulan por la sangre y actúan como hormonas, mientras que otros actúan en la médula ósea roja ya sea como mediadores locales de secreción, o como el ligando de Kit, unidos a membrana como señales que actúan mediante el contacto célula a célula. El más conocido de los CSF que actúan como hormonas es la glicoproteína eritropoyetina, que se fabrica en el riñón y regula la *eritropoyesis* o formación de los glóbulos rojos.

La eritropoyesis depende de la hormona eritropoyetina

El eritrocito constituye, con diferencia, el tipo de célula más numeroso de la sangre (véase Tabla 23–1). Cuando está maduro es como una bolsa llena de hemoglobina y apenas contiene alguno de los orgánulos celulares habituales. El eritrocito de un mamífero adulto carece incluso de núcleo, retículo endoplasmático, mitocondrias y ribosomas; todos estos componentes se han expulsado de la célula en el transcurso de su formación (**Figura 23–44**). Por lo tanto, el eritrocito no puede ni crecer ni dividirse; la única vía de fabricación posible de nuevos eritrocitos es a partir de las células madre. Además, los eritrocitos tienen un ciclo vital limitado –de unos 120 días en la especie humana o de 55 días en los ratones. Los eritrocitos envejecidos son fagocitados y digeridos por los macrófagos del hígado y del bazo, que eliminan en cada uno de nosotros hasta 10^{11} eritrocitos envejecidos cada día. Los eritrocitos jóvenes se protegen activamente de este destino: presentan una proteína de superficie que se une a un receptor inhibidor en los macrófagos e impide así su fagocitosis.

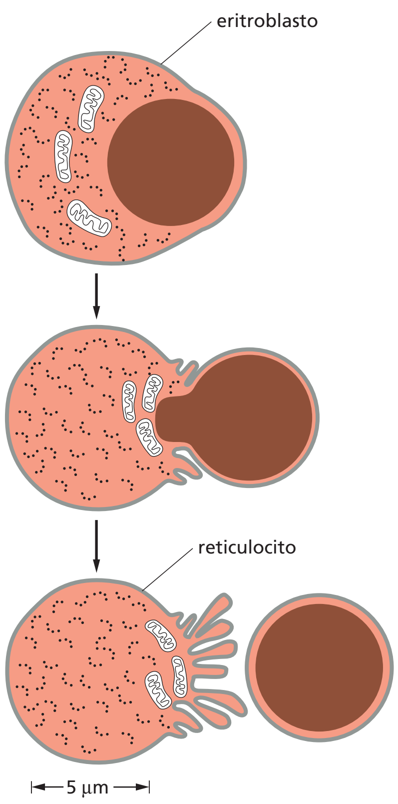


Figura 23–44 Desarrollo de un glóbulo rojo (eritroblasto). Se muestra cómo la célula expulsa el núcleo y se convierte en un eritrocito inmaduro (reticulocito), que más tarde abandona la médula ósea roja y pasa a la circulación sanguínea. Uno o dos días más tarde, el reticulocito perderá sus mitocondrias y sus ribosomas convirtiéndose en un eritrocito maduro. Los clones de eritrocitos se desarrollan en la médula ósea roja, en la superficie de un macrófago, que fagocita y digiere los núcleos desprendidos por los eritroblastos.

La falta de oxígeno o una disminución del número de eritrocitos estimula a las células del riñón a sintetizar y segregar mayores cantidades de **eritropoyetina** a la circulación sanguínea. La eritropoyetina a su vez, estimula la producción de más eritrocitos. El cambio producido en la velocidad de liberación de nuevos eritrocitos a la circulación sanguínea se detecta al cabo de 1-2 días después del aumento de los niveles de eritropoyetina en la sangre circulante, por lo que probablemente la hormona actúa sobre las células precursoras más directas de los eritrocitos maduros.

Se pueden identificar las células que son sensibles a la eritropoyetina cultivando células de la médula ósea roja sobre una matriz semisólida en presencia de esta hormona. Al cabo de unos días aparecen colonias de unos 60 eritrocitos, cada una de las cuales se forma a partir de una célula progenitora eritroide comprometida. Dicha célula progenitora depende de la eritropoyetina tanto para la supervivencia como para su proliferación. Todavía no contiene hemoglobina y deriva de un tipo celular más temprano de la célula progenitora eritroide comprometida que no depende de la eritropoyetina.

Un segundo CSF, denominado **interleuquina-3 (IL-3)**, estimula la supervivencia y la proliferación de las células progenitoras eritroides tempranas. En su presencia se forman colonias eritroides más grandes, de más de 5000 eritrocitos cada una, que se desarrollan a partir de cultivos de células de la médula ósea roja durante un proceso que requiere entre una semana y 10 días. Evidentemente las células descendientes de las células madre hematopoyéticas, después de quedar comprometidas a un destino eritroide, tienen que ir siguiendo su camino a través de un largo programa de divisiones, cambiando su carácter y su dependencia de las señales ambientales a medida que avanzan hacia el estadio final diferenciado.

En la producción de los neutrófilos y de los macrófagos influyen muchos CSF

Los dos tipos celulares especializados en la fagocitosis, los neutrófilos y los macrófagos, se forman a partir de una célula progenitora común denominada **célula progenitora de granulocitos/macrófagos** (**GM**). Al igual que los otros granulocitos (los eosinófilos y los basófilos), los neutrófilos sólo circulan por la sangre durante unas horas antes de migrar desde los capilares hacia los tejidos conjuntivos u otras áreas determinadas, donde sobreviven durante unos cuantos días. A continuación mueren por apoptosis y son fagocitados por los macrófagos. Los macrófagos, por el contrario, pueden sobrevivir durante meses o quizá incluso años fuera del torrente sanguíneo, donde pueden ser activados por señales locales y reiniciar su proliferación.

Hasta ahora se han definido como mínimo siete tipos distintos de CSF que estimulan la formación de colonias de neutrófilos y macrófagos; se sabe que algunos o todos ellos actúan en distintas combinaciones, regulando la producción selectiva de estas células *in vivo*. Estos CSF son sintetizados por varios tipos celulares –incluyendo las células endoteliales, los fibroblastos, los macrófagos y los linfocitos– y su concentración en sangre aumenta rápidamente de forma característica en respuesta a la infección bacteriana de un tejido, aumentando así el número de células fagocíticas liberadas desde la médula ósea hacia la circulación sanguínea. IL-3 es uno de los factores menos específico y actúa tanto sobre células madre pluripotenciales como sobre la mayor parte de las células progenitoras comprometidas, incluyendo las células progenitoras GM. Otros factores distintos actúan de una forma más selectiva sobre las células progenitoras comprometidas GM y sobre su descendencia diferenciada (**Tabla 23–2**), aunque en muchos casos también afectan a otros linajes de la familia hematopoyética.

Todos estos CSF, al igual que la eritropoyetina, son glucoproteínas que actúan a bajas concentraciones (alrededor de 10^{-12} M) uniéndose a receptores específicos de superficie, como se describió en el Capítulo 15. Algunos de estos receptores son tirosina quinasas transmembrana, pero la mayoría de ellos pertenecen a la amplia familia de receptores de las citoquinas, cuyos miembros se componen generalmente de dos o más subunidades, una de las cuales se encuentra con frecuencia entre algunos tipos de receptores (**Figura 23–45**). Los CSF no sólo actúan sobre las células precursoras provocando la formación de un linaje de células diferenciadas, sino que también activan funciones especializadas (tales como la fagocitosis y la destrucción de células diana) de células diferenciadas de forma terminal. Las proteínas producidas de forma artificial a partir de genes clonados para estos factores son potentes estimuladores de la hematopoyesis en animales experimentales. En la actualidad son ampliamente utilizados en pacientes humanos para estimular la regeneración del tejido

Tabla 23–2 Algunos factores estimuladores de colonias (CSF) que influyen en la formación de las células sanguíneas

FACTOR	CÉLULAS DIANA	CÉLULAS PRODUCTORAS	RECEPTORES
Eritropoyetina	CFC-E	células del riñón	familia de las citoquinas
Interleuquina 3 (IL-3)	célula madre pluripotencial, la mayor parte de células progenitoras, muchas células diferenciadas de forma terminal	linfocitos T, células epidérmicas	familia de las citoquinas
Granulocito/macrófago CSF (GMCSF)	células progenitoras GM	linfocitos T, células endoteliales, fibroblastos	familia de las citoquinas
Granulocito CSF (GCSF)	células progenitoras GM y neutrófilos	macrófagos, fibroblastos	familia de las citoquinas
Macrófago CSF (MCSF)	células progenitoras GM y macrófagos	fibroblastos, macrófagos, células endoteliales	familia de receptores tirosina quinasa
Ligando de Kit	células madre hematopoyéticas	células del estroma en la médula ósea y muchas otras células	familia de receptores tirosina quinasa

hematopoyético y aumentar la resistencia a las infecciones –una impresionante demostración de cómo la investigación biológica básica de la célula y los experimentos con animales pueden contribuir a la mejora de un tratamiento médico.

El comportamiento de una célula hematopoyética depende parcialmente del azar

Los CSF se han definido como factores que estimulan la producción de colonias de células sanguíneas diferenciadas. Pero ¿qué efecto preciso ejerce un CSF sobre una célula hematopoyética individual? Un factor de este tipo podría controlar la velocidad de división celular o el número de ciclos de división que la célula progenitora presenta en el transcurso de la diferenciación; podría actuar tardíamente en el linaje hematopoyético facilitando la diferenciación; podría actuar de forma temprana influyendo en su compromiso o simplemente incrementando la probabilidad de supervivencia celular (**Figura 23–46**). Mediante el seguimiento de un cultivo de células hematopoyéticas ha sido posible demostrar que un sólo CSF, el GMCSF, puede ejercer todos estos efectos, aunque no está tan claro cuáles de ellos tienen más importancia *in vivo*.

Además, los estudios *in vitro* indican que existe un elevado componente de azar en el comportamiento de la célula hematopoyética –posiblemente, un reflejo del "ruido" en el sistema del control genético, como se trató en el Capítulo 7. Como mínimo alguno de los CSF parece que actúa regulando probabilidades y no dictan de forma directa lo que debe hacer cada célula. En los cultivos de células hematopoyéticas, incluso cuando las células seleccionadas constituyen una población lo más homogénea posible, se produce una marcada variabilidad en cuanto a tamaños y a menudo en cuanto a características de las colonias que se

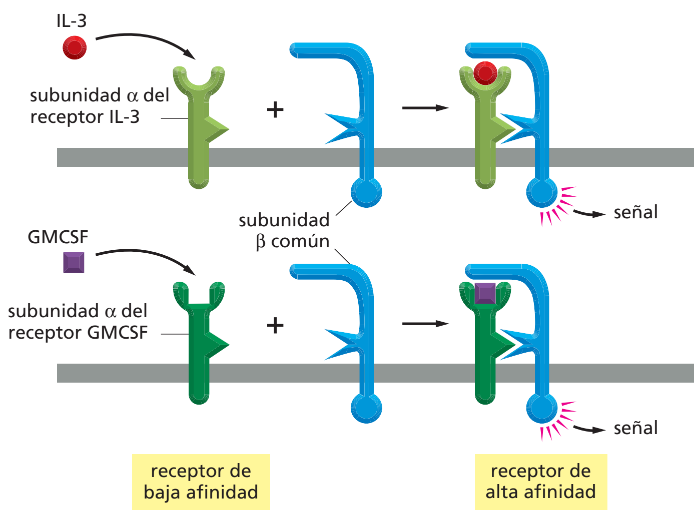


Figura 23–45 Subunidades compartidas entre los receptores CSF. Los receptores humanos IL-3 y GMCSF presentan diferentes subunidades α y una subunidad β común. Sus ligandos se unen a la subunidad α libre con una afinidad baja, lo que provoca el ensamblaje del heterodímero que se une al ligando con afinidad alta.

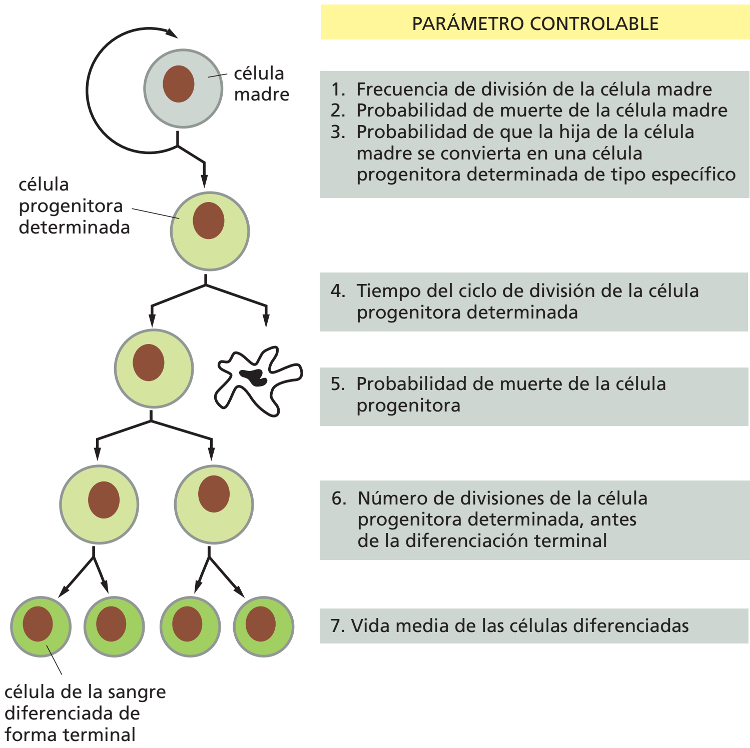


Figura 23–46 Algunos de los parámetros que pueden regular la producción de un tipo determinado de células de la sangre. Estudios sobre células en cultivo sugieren que los factores de estimulación de colonias (CSF) pueden afectar todos estos aspectos de la hematopoyesis.

originan. Si dos células hermanas se separan inmediatamente después de una división y se cultivan aparte bajo condiciones idénticas, con frecuencia darán lugar a colonias que contengan distintos tipos de células sanguíneas o los mismos tipos pero en cantidades distintas. Así pues, parece que tanto en la programación de la división celular como en el proceso de compromiso de una célula en una vía concreta de diferenciación, participan una serie de acontecimientos aleatorios a nivel individual, aunque el comportamiento de un sistema pluricelular en su conjunto se regula de una forma más precisa. La secuencia de restricciones en el destino celular mostradas en la Figura 23–42 da la impresión de un programa ejecutado con la precisión y la lógica de un ordenador. Las células aisladas pueden ser más extravagantes y erráticas y, en ocasiones, pueden progresar mediante otras vías de decisión a partir del estadio de células madre hacia la diferenciación terminal.

La regulación de la supervivencia celular es tan importante como la regulación de la proliferación celular

El comportamiento alterado de las células hematopoyéticas en ausencia de los CSF conduce a la muerte por apoptosis (estudiado en el Capítulo 18). De este modo, en principio, los CSF deberían regular por completo el número de los distintos tipos de células sanguíneas mediante el control selectivo de la supervivencia celular en dicha vía. Existen evidencias de que, en efecto, el control selectivo de la supervivencia celular tiene un papel fundamental en la regulación del número de células sanguíneas, como sucede con los hepatocitos y con muchos otros tipos celulares, como se ha descrito anteriormente. En el sistema hematopoyético de los vertebrados, la cantidad de apoptosis es enorme; por ejemplo, en un hombre adulto cada día mueren millones de neutrófilos de esta forma. De hecho, una gran mayoría de neutrófilos producidos en la médula ósea roja muere sin haber funcionado nunca. Este ciclo inútil de producción y destrucción, posiblemente mantiene una reserva suplementaria de células que pueden ser rápidamente movilizadas para combatir una infección aguda, o ser recicladas mediante fagocitosis y digestión, cuando todo vuelve a la calma. Si la comparamos con la vida del organismo, la vida de las células resulta económica.

Una tasa de muerte celular demasiado baja puede ser tan peligrosa para la salud de un organismo pluricelular como una proliferación exagerada. En el sistema hematopoyético, las mutaciones que inhiben la muerte celular provocando una excesiva producción del inhibidor de apoptosis Bcl2 provocan el desarrollo del cáncer en los linfocitos B. La capacidad

de autorrenovación ilimitada constituye una peligrosa característica para cualquier célula que la presente. Muchos casos de leucemia surgen de mutaciones que confieren dicha capacidad a células precursoras hematopoyéticas comprometidas que normalmente estarían destinadas a diferenciarse y mueren después de un número reducido de ciclos de división.

Resumen

Todos los distintos tipos de células sanguíneas, que incluyen los eritrocitos, los linfocitos, los granulocitos y los macrófagos, derivan de una célula madre pluripotencial común. En el adulto, las células madre hematopoyéticas se localizan principalmente en la médula ósea roja; la preservación de su carácter de células madre depende de las señales de las células del estroma medular (tejido conjuntivo), sobre todo osteoblastos. Como en algún otro grupo de células madre, la vía de señalización Wnt parece ser crítica para el mantenimiento de la célula madre, aunque no sea la única vía implicada. Normalmente las células madre se dividen con una frecuencia muy baja y dan lugar a más células madre (autorrenovación). Cada una de las distintas células progenitoras comprometidas (células amplificadoras transitorias) deben producir uno o unos cuantos tipos celulares sanguíneos. Las células progenitoras comprometidas se dividen de forma activa bajo la influencia de distintas moléculas señalizadoras proteicas (factores estimuladores de colonias o CSF) y luego se diferencian de forma terminal en células sanguíneas maduras, que habitualmente mueren a los pocos días o semanas.

Los estudios sobre hematopoyesis han experimentado un gran avance con los experimentos realizados in vitro, *en los que las células madre o las células progenitoras comprometidas forman colonias clónicas cuando se cultivan en una matriz semisólida. Al parecer, la descendencia de las células madre escoge, parcialmente al azar, una de las distintas vías de desarrollo alternativas. La muerte celular por apoptosis, controlada por la disponibilidad de los CSF, también tiene un papel fundamental en la regulación del número de células sanguíneas diferenciadas maduras.*

GÉNESIS, MODULACIÓN Y REGENERACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

El término “músculo” engloba un gran número de tipos celulares, todos ellos especializados en la contracción, pero diferentes en otros aspectos. Como se indicó en el Capítulo 16, todas las células eucariotas presentan un sistema contráctil constituido por actina y miosina, pero las células de tipo muscular han desarrollado al máximo este sistema. Los mamíferos tienen cuatro tipos básicos de células especializadas en la contracción: fibras del músculo esquelético, fibras musculares del corazón (cardíacas), fibras del músculo liso y células mioepiteliales (**Figura 23–47**). Estos tipos celulares se diferencian entre sí en cuanto a función, estructura y desarrollo. Aunque todas ellas generan fuerzas de contracción utilizando sistemas organizados de filamentos de actina y miosina, las moléculas de actina y de miosina utilizadas presentan secuencias de aminoácidos algo diferentes, tienen una distribución intracelular distinta y el control de la contracción se produce por asociación con distintos grupos de proteínas.

Las **fibras del músculo esquelético** son las responsables de casi todos los movimientos que están bajo control voluntario. Esas células pueden ser muy largas (2-3 cm de largo y 100 μm de diámetro en un hombre adulto), por lo que a menudo se las denomina *fibras musculares* debido a su forma extraordinariamente alargada. Cada una de ellas es un sincitio que contiene varios núcleos en un citoplasma común. Los otros tipos de células musculares son más convencionales y por lo general tienen un solo núcleo. Las **células musculares cardíacas** se parecen a las fibras musculares esqueléticas en que sus filamentos de actina y miosina están alineados de forma muy ordenada, formando series de unidades contráctiles denominadas *sarcómeros* y, en consecuencia, las células tienen una apariencia estriada (en bandas). Las **células del músculo liso** reciben este nombre porque no tienen aspecto estriado. Las funciones del músculo liso son muy variadas y abarcan desde la propulsión del alimento a lo largo del tubo digestivo hasta la erección de los pelos como respuesta al frío o al miedo. Las **células mioepiteliales** tampoco presentan bandas pero, a diferencia del resto de fibras musculares, se encuentran en los epitelios y derivan del ectodermo. Forman el músculo dilatador del iris ocular y también actúan en la expulsión de la saliva, del sudor y de la leche de las glándulas correspondientes (véase Figura 23–11). Los cuatro tipos principales

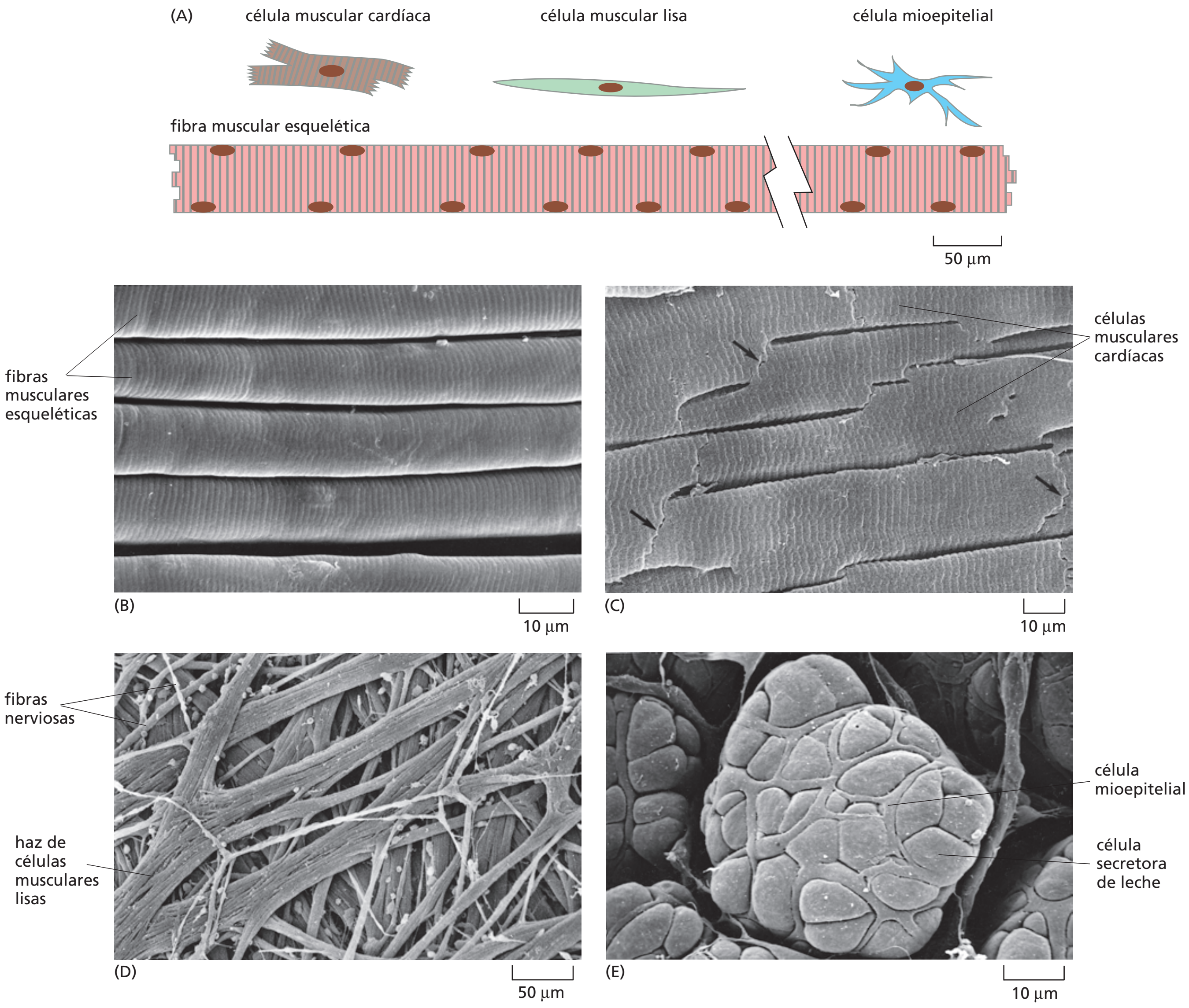


Figura 23–47 Los cuatro tipos de células musculares de un mamífero. (A) Esquemas (a escala). (B-E) Electromicrografías de barrido en las que aparecen (B) el músculo esquelético del cuello del hámster, (C) el músculo cardíaco de una rata, (D) el músculo liso de la vejiga urinaria de un cobaya y (E) las células mioepiteliales de un alvéolo secretor de una glándula mamaria de una rata lactante. Las *flechas* en (C) señalan los discos intercalares, es decir, las uniones entre los extremos de las células musculares del corazón; las células de la musculatura esquelética de los grandes músculos unen un extremo con otro de forma similar. Obsérvese que en esta figura el músculo liso se presenta a menos aumentos que los restantes. (B, por cortesía de Junzo Desaki; C, de T. Fujiwara, en Cardiac Muscle en Handbook of Microscopic Anatomy [E.D. Canal ed.] Berlin: Springer Verlag, 1986; D, por cortesía de Satoshi Nakasiro; E, de T. Nagato et al., *Cell Tiss. Res.* 209:1-10, 1980. Con la autorización de Springer-Verlag.)

de fibras musculares se pueden dividir en varios subtipos, cada uno de los cuales tiene unos rasgos característicos.

Los mecanismos de la contracción muscular se han descrito en el Capítulo 16. En este capítulo se considerará cómo se genera y se mantiene el tejido muscular. Nos centraremos en la fibra muscular esquelética, que presenta un modelo especial de desarrollo y también una notable capacidad para modular su carácter diferenciado, así como una estrategia especial de regeneración.

Los mioblastos se fusionan para formar nuevas fibras musculares esqueléticas

En el Capítulo 22 describimos cómo ciertas células que se originan a partir de los somitas de un embrión de vertebrado, en un estadio muy temprano, quedan comprometidas como

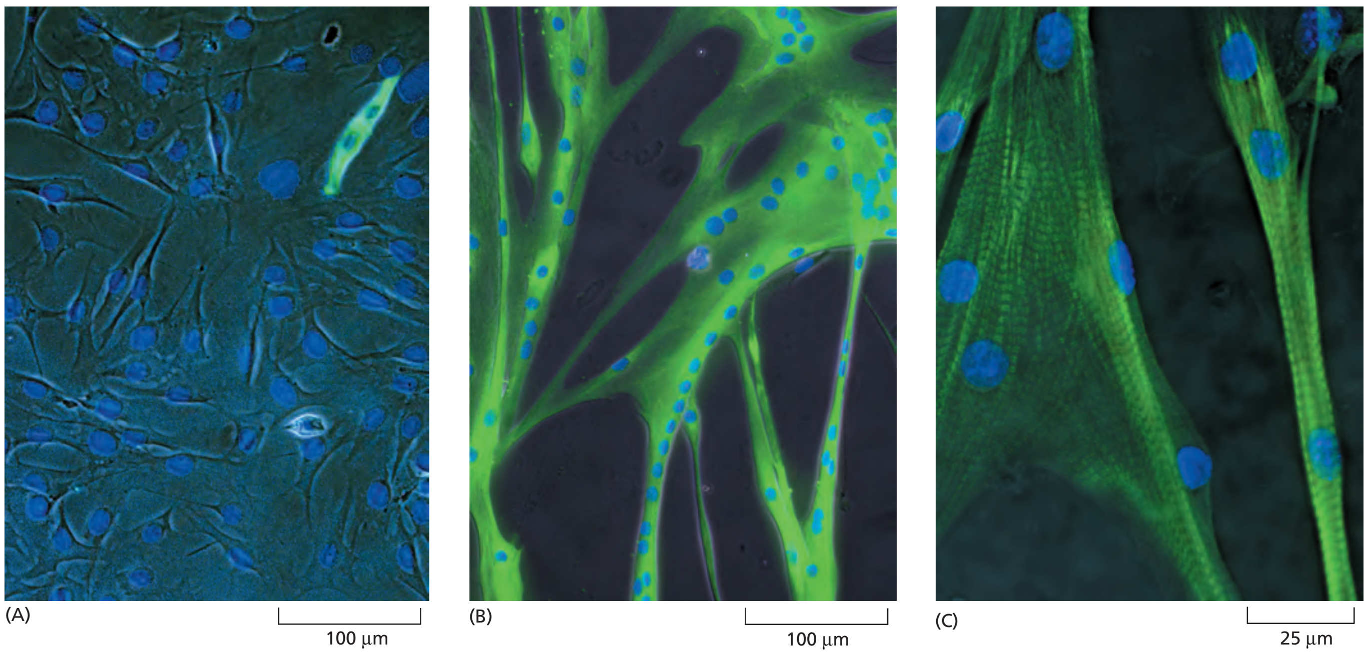


Figura 23–48 Fusión de mioblastos en cultivo. El cultivo se ha teñido con un anticuerpo fluorescente (en *verde*) contra la miosina muscular esquelética, que marca las células musculares diferenciadas, y con un fluorocromo específico del DNA (en *azul*) que muestra los núcleos de las células. (A) Poco tiempo después de cambiar el medio de cultivo que favorece la diferenciación, sólo dos de los muchos mioblastos del campo de visión han iniciado la producción de miosina y se han fusionado formando una célula muscular con dos núcleos (*arriba a la derecha*). (B) Algo más tarde, casi todas las células se han diferenciado y se fusionan entre sí. (C) Observando a gran aumento, se detectan las estriaciones características (las finas bandas transversales) en dos de las células musculares plurinucleadas. (Por cortesía de Jacqueline Gross y Terence Partridge.)

mioblastos, los precursores de las fibras musculares esqueléticas. El compromiso para constituir un mioblasto depende de proteínas reguladoras génicas de al menos dos familias: un par de proteínas con homeodominios, denominadas Pax3 y Pax7 y la *familia MyoD* de proteínas básicas hélice-bucle-hélice (descrito en el Capítulo 7). Dichas proteínas actúan de forma combinada proporcionando al mioblasto una memoria de su estadio comprometido y finalmente, regulando la expresión de otros genes que le dan a la célula su carácter especializado de célula muscular madura (véase Figura 7–75). Tras un periodo de proliferación, los mioblastos sufren un marcado cambio de estado: dejan de dividirse, activan la expresión de una batería completa de genes específicos de músculo necesarios para la diferenciación terminal y se fusionan entre sí formando fibras musculares esqueléticas plurinucleadas (**Figura 23–48**) La fusión implica moléculas de adhesión célula-célula que intervienen en el reconocimiento entre los mioblastos en vías de diferenciación y las fibras. Cuando se ha completado la diferenciación, las células ya no se dividen y los núcleos ya no replican nunca más su DNA.

Mioblastos mantenidos en proliferación en un cultivo celular, durante dos años, todavía conservan la capacidad de diferenciarse y de fusionarse formando fibras musculares en respuesta a un cambio adecuado de las condiciones de cultivo. La presencia en el medio de cultivo de proteínas señal adecuadas como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF: ***fi**broblast **g**rowth **f**actor*) o el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF: ***h**epatocyte **g**rowth **f**actor*) puede mantener los fibroblastos en un estado proliferativo indiferenciado: si se eliminan estos factores solubles, las células dejan rápidamente de dividirse, diferenciarse y fusionarse. Sin embargo, el sistema de controles es complejo y la adhesión a la matriz extracelular también es importante para la diferenciación del fibroblasto. Además, el proceso de diferenciación es cooperativo: los mioblastos en diferenciación segregan factores que aparentemente estimulan a otros mioblastos a diferenciarse. En el animal intacto, los mioblastos y las fibras musculares se sostienen en las mallas de una red de tejido conjuntivo formada por los fibroblastos. Esta red coordina el desarrollo muscular y controla la ordenación y la orientación de las células musculares.

Las células musculares pueden modular sus propiedades cambiando isoformas de las proteínas que presentan

Una vez formada, una fibra muscular esquelética crece, madura y modula su carácter. El genoma contiene múltiples copias variantes de los genes que codifican la mayoría de las proteínas características de la célula muscular esquelética y los transcritos de RNA de estos genes pueden madurar de distintas formas. Como resultado, las fibras musculares fabrican numerosas variantes proteicas (isoformas) de los diferentes componentes del aparato contráctil. A

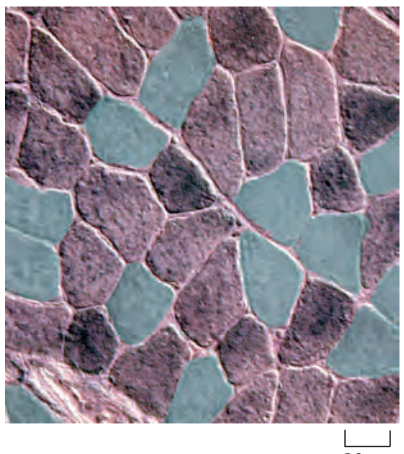


Figura 23–49 Fibras musculares lentas y rápidas. Dos cortes consecutivos del mismo fragmento de músculo de una pata de ratón adulto, fueron teñidos con distintos anticuerpos, cada uno de ellos específico de las distintas isoformas de la cadena pesada de la miosina. Las imágenes de ambas secciones se presentan en falsos colores y muestran la arquitectura de los tipos de fibra muscular. Las fibras teñidas con anticuerpos contra la miosina "rápida" (en *gris*) se especializan en la producción de contracciones rápidas y bruscas; las fibras teñidas con anticuerpos contra la miosina "lenta" (en *rosa*) se especializan en la producción de contracciones lentas y sostenidas. Las fibras musculares rápidas se conocen como fibras musculares blancas, debido a que contienen relativamente poca cantidad de la proteína coloreada de unión a oxígeno, la mioglobina. Las fibras musculares lentas se denominan fibras musculares rojas debido a su contenido más elevado en dicha proteína. (Por cortesía de Simon Hughes.)

medida que la fibra muscular va madurando, sintetiza distintas isoformas que satisfacen las sucesivas demandas de velocidad, fuerza y resistencia en el feto, el recién nacido y el adulto. En el músculo de un individuo adulto, se pueden encontrar adosados distintos tipos de fibras musculares esqueléticas, cada uno de los cuales presenta un conjunto diferente de isoformas proteicas y distintas propiedades funcionales (**Figura 23–49**). Las características de los distintos tipos de fibras quedan determinadas en parte antes del nacimiento por el programa de desarrollo genético y en parte, en una etapa más avanzada de la vida, por la actividad y el entrenamiento. Distintas clases de neuronas motoras inervan las fibras musculares lentas (de contracción sostenida) y las fibras musculares rápidas (de estiramiento rápido) y la inervación puede regular la expresión génica de la fibra muscular y la dimensión que abarcan los diferentes patrones de estimulación eléctrica que emiten dichas neuronas.

Las fibras musculares esqueléticas segregan miostatina, que limita su propio crecimiento

Un músculo puede crecer de tres maneras: sus fibras pueden aumentar de número, longitud o grosor. Debido a que las fibras musculares esqueléticas no tienen capacidad de división, muchas de ellas pueden formarse solamente por fusión de los mioblastos y, en realidad, el número definitivo de fibras musculares esqueléticas plurinucleadas se alcanza pronto, en el hombre, antes del nacimiento. Una vez formada, por lo general una fibra muscular esquelética sobrevive durante toda la vida del animal. Sin embargo, cada uno de los núcleos de un músculo puede formarse o perderse. El enorme aumento postnatal de la masa muscular se completa por un agrandamiento de las células. El crecimiento en longitud depende de la incorporación de más mioblastos a las fibras plurinucleadas preexistentes, con lo cual aumenta el número de núcleos en cada célula. El crecimiento en grosor, como el que experimentan los músculos de las personas que levantan pesas, implica la incorporación de mioblastos y un aumento del tamaño y del número de las miofibrillas contráctiles que contiene cada fibra muscular.

Entonces, ¿cuáles son los mecanismos que controlan el número y el tamaño de la célula muscular? La respuesta se encuentra, en parte, en una proteína señal extracelular denominada *miostatina*. Ratones que tienen una mutación de pérdida de función en el gen miostatina, tienen unos músculos enormes –dos o tres veces más grandes de lo normal (**Figura 23–50**). Al parecer, aumentan tanto el número como el tamaño de las células musculares. Mutaciones en este mismo gen se presentan en la raza ganadera denominada de "doble-musculatura" (Figura 17–69): al seleccionar a los animales que tienen los músculos grandes, los criadores de ganado han seleccionado de forma involuntaria la deficiencia en miostatina. La miostatina forma parte de la superfamilia de proteínas señalizadoras TGFβ. Generalmente está formada y segregada por las células musculares esqueléticas y actúa de forma determinante en los mioblastos, inhibiendo tanto la proliferación como la diferenciación. Como es evidente, su función consiste en generar una retroalimentación negativa que limita el crecimiento muscular, tanto durante el desarrollo como en la vida adulta. El crecimiento de otros órganos se controla de forma similar mediante la actividad retroactiva negativa de un factor producido por dichos órganos. Más adelante se describirá un nuevo ejemplo de este tipo de mecanismo.

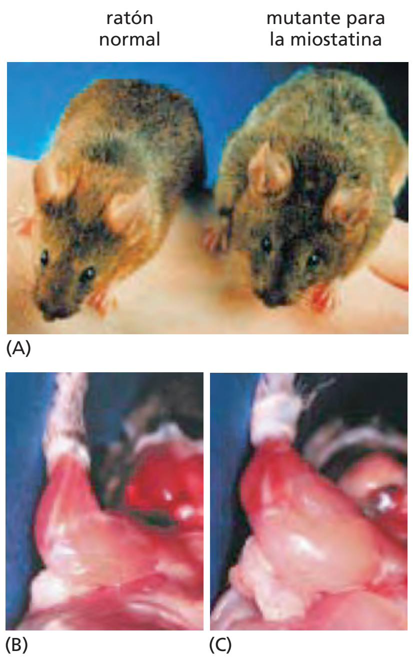


Figura 23–50 Regulación del tamaño del músculo por miostatina. (A) Un ratón normal comparado con un ratón mutante deficiente en mioestatina. (B) Pata de un ratón normal y (C) de uno deficiente en mioestatina. Se ha quitado la piel para poder observar el agrandamiento masivo de la musculatura del mutante. (De S.J. Lee y A.C. McPherron, *Curr. Opin. Genet. Devel.* 9:604-607,1999. Con la autorización de Elsevier.)

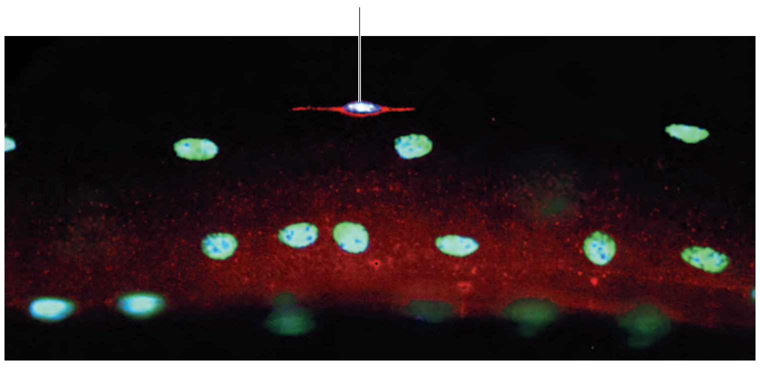


Figura 23–51 Una célula satélite de una fibra muscular esquelética. La muestra se ha teñido con un anticuerpo (en *rojo*) contra una cadherina muscular, la M-cadherina, que se encuentra tanto en las células satélite como en la fibra muscular, y que se concentra en la zona en la que las membranas entran en contacto. Los núcleos de la fibra muscular se han teñido de *verde* y el núcleo de la célula satélite está teñido de *azul*. (Por cortesía de Terence Partridge.)

En el adulto, algunos mioblastos persisten como células madre quiescentes

A pesar de que en el hombre normalmente no se forman fibras musculares esqueléticas nuevas durante la vida adulta, todavía mantiene la capacidad de hacerlo y las fibras musculares existentes pueden asumir de nuevo el crecimiento cuando surge la necesidad. En estrecho contacto con la lámina basal se encuentran células capaces de actuar como mioblastos, en forma de células inactivas, pequeñas y aplanadas (**Figura 23–51**). Si se lesiona el músculo o se trata de forma artificial con FGF, se activan y proliferan las denominadas *células satélite* y su descendencia puede fusionarse reparando el músculo dañado o activando el crecimiento muscular. Igual que los mioblastos, están reguladas por miostatina. Las células satélite o alguna subpoblación de las células satélite constituyen las células madre de la musculatura esquelética de un adulto y, por lo general, se mantienen en reserva en un estado quiescente, pero son utilizables cuando se requiere una autorrenovación de células diferenciadas de forma terminal. El estudio de estas células ha proporcionado las pruebas más evidentes sobre la hipótesis de la hebra inmortal en la división asimétrica de la célula madre, tal como ilustramos antes en la Figura 23–10.

Sin embargo, el mecanismo de reparación muscular mediante la intervención de las células satélite debe ajustarse a la lesión. Por ejemplo, una forma de *distrofia muscular,* un defecto genético en la proteína del citoesqueleto distrofina, daña las células musculares esqueléticas diferenciadas. Como resultado de ello, las células satélite proliferan reparando las fibras musculares dañadas. Sin embargo, esta respuesta regenerativa no consigue ajustarse a la lesión y finalmente el tejido conjuntivo reemplaza a las células musculares, bloqueando cualquier posibilidad posterior de regeneración. Al parecer, una pérdida similar de la capacidad de regeneración contribuye al debilitamiento del músculo en la vejez.

En la distrofia muscular, en la que las células satélite proliferan de manera constante, su capacidad de dividirse puede llegar a agotarse como resultado de un progresivo acortamiento de sus telómeros en el transcurso de cada ciclo celular (descrito en el Capítulo 17). Las células madre de otros tejidos tienen esta misma limitación, tal como ya se indicó en el caso de las células madre hemopoyéticas: normalmente se dividen a una velocidad lenta, pero algunas mutaciones o determinadas circunstancias excepcionales pueden provocar divisiones más rápidas que conducen a un agotamiento prematuro de las células madre.

Resumen

En los vertebrados, las fibras musculares esqueléticas constituyen uno de los cuatro tipos principales de células especializadas en la contracción y son responsables de todos los movimientos voluntarios. Cada fibra muscular esquelética es un sincitio y se desarrolla por fusión de varios mioblastos. Los mioblastos proliferan activamente, pero cuando se han fusionado, ya no pueden dividirse más. Por lo general, la fusión permite la diferenciación del mioblasto, en la que varios genes que codifican proteínas específicas del músculo se activan de forma coordinada. En el músculo de un adulto, algunos mioblastos persisten en un estado quiescente como células satélite; cuando se lesiona un músculo, estas células se reactivan, proliferando y fusionándose, sustituyendo a las células musculares que se han perdido. La masa muscular se regula homeostáticamente mediante un mecanismo de retroalimentación negativo en el que el músculo segrega miostatina, que inhibe el crecimiento muscular posterior.

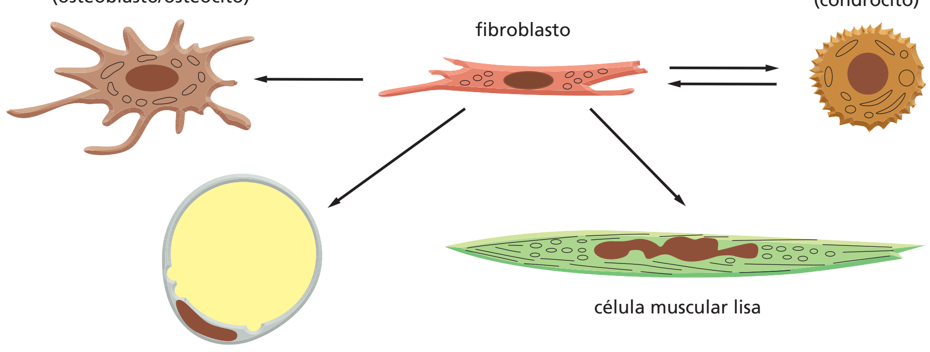


Figura 23–52 La familia de células del tejido conjuntivo. Las *flechas* señalan las interconversiones que posiblemente tienen lugar entre las células de la familia del tejido conjuntivo. Para simplificar el esquema, el fibroblasto aparece como un solo tipo celular aunque de hecho se desconoce cuántos tipos de fibroblastos existen y si la diferenciación potencial de los distintos tipos se halla restringida de formas diferentes.

LOS FIBROBLASTOS Y SUS TRANSFORMACIONES: LA FAMILIA DE LAS CÉLULAS DEL TEJIDO CONJUNTIVO

En el individuo adulto, la mayor parte de las células diferenciadas pueden agruparse en familias, cuyos miembros están estrechamente relacionados entre sí en función de su origen y de sus características. Un ejemplo importante lo constituye la familia de las **células del tejido conjuntivo**, cuyos componentes no sólo están relacionados entre sí sino que también, excepcionalmente, son interconvertibles. Esta familia incluye *fibroblastos, condrocitos* y *osteocitos*, células todas ellas especializadas en la secreción de la colágena de la matriz extracelular. En conjunto, son las responsables del soporte arquitectónico del cuerpo. La familia del tejido conjuntivo también incluye los *adipocitos* y las *células musculares lisas*. La **Figura 23–52** ilustra estos tipos celulares y las interconversiones que presentan entre ellas. Las células del tejido conjuntivo intervienen en el sostén y en la reparación de la mayor parte de los tejidos y órganos; la adaptabilidad de su carácter diferenciado constituye uno de los aspectos más importantes de las respuestas frente a distintos tipos de lesiones.

Los fibroblastos cambian sus características en respuesta a señales de la matriz extracelular

Al parecer, los fibroblastos son las células menos especializadas de la familia del tejido conjuntivo. Se encuentran dispersas por el tejido conjuntivo de todo el cuerpo, donde segregan una matriz extracelular blanda, rica en colágena de tipo I o de tipo III, o ambas, tal como se describió en el Capítulo 19. Cuando un tejido se lesiona, los fibroblastos proliferan, migran hacia la herida <TGAT> y producen grandes cantidades de colágena, la cual contribuye al aislamiento y la reparación de los tejidos dañados. Su capacidad para desplazarse en el momento de una lesión, junto con el modo de vida solitario que presentan, podría explicar por qué los fibroblastos son las células que crecen más fácilmente en cultivo –una característica que hace de ellas el tipo celular favorito en los estudios de biología celular (**Figura 23–53**).

Como se indica en la Figura 23–52, parece que los fibroblastos son las células más versátiles del tejido conjuntivo, ya que tienen una notable capacidad para diferenciarse en otros miembros de la misma familia. Sin embargo, estas interconversiones todavía encierran algunos puntos oscuros. Los fibroblastos de distintas partes del cuerpo son intrínsecamente distintos; incluso en una misma región puede haber diferentes tipos de fibroblastos. Por ejemplo, los fibroblastos "maduros" con menor capacidad de transformación coexisten junto a los fibroblastos "inmaduros" (a menudo denominados células mesenquimáticas) que pueden dar lugar a distintos tipos celulares maduros.

Las células del estroma de la médula ósea roja, mencionadas anteriormente, proporcionan un buen ejemplo de la versatilidad del tejido conjuntivo. Estas células, que pueden considerarse como un tipo de fibroblasto, se pueden aislar de la médula ósea roja y propagarse en cultivo. De este modo pueden generarse grandes clones de descendientes a partir de una sola célula del estroma ancestral. Según las proteínas señalizadoras que se añadan al

cultivo, los elementos de este clon pueden continuar proliferando y produciendo más células del mismo tipo, o pueden diferenciarse como células adiposas, células cartilaginosas o células óseas. Todas ellas se consideran *células madre mesenquimáticas* debido a su carácter pluripotencial y a su capacidad de autorrenovación.

Los fibroblastos de la dermis de la piel son distintos. Cuando se someten a las mismas condiciones de cultivo, no muestran esta misma plasticidad. Todavía pueden ser inducidos también a cambiar su carácter. Por ejemplo, en la cicatrización de una herida cambian la expresión del gen de actina y presentan algunas de las propiedades contráctiles de las células musculares lisas, colaborando de este modo en el acercamiento de los bordes de la herida; estas células se denominan *miofibroblastos*. De forma más espectacular, si se elabora un preparado de matriz ósea mediante pulverización del hueso hasta conseguir un polvo fino, luego se elimina el componente mineral, y este preparado se implanta en la capa dérmica de la piel, algunas células (probablemente fibroblastos) pueden transformarse en células cartilaginosas y, un poco más tarde, otras se transforman en células óseas; el resultado es la formación de un pequeño bulto óseo. Estos experimentos sugieren que los componentes de la matriz extracelular influyen de forma espectacular en la diferenciación de las células del tejido conjuntivo.

Varias transformaciones celulares similares a éstas tienen lugar en la reparación espontánea de huesos fracturados. De hecho, la matriz ósea contiene concentraciones elevadas de varias proteínas señalizadoras que pueden afectar el comportamiento de las células del tejido conjuntivo. En este grupo de proteínas señalizadoras se encuentran los elementos de la superfamilia de TGFβ, incluyendo las BMP y el propio TGFβ. Estos factores son reguladores del crecimiento, la diferenciación y la síntesis de matriz por las células del tejido conjuntivo, ejerciendo diversas actuaciones que dependen del tipo de célula diana y de la presencia de otros factores y de componentes de la matriz. Cuando se inyectan en un animal vivo, pueden inducir la formación de cartílago, hueso o matriz fibrosa, según la región y las circunstancias de la inyección. El TGFβ es especialmente importante en la cicatrización de heridas, estimulando la conversión de los fibroblastos en miofibroblastos y activando la formación de tejido cicatricial rico en colágena, que confiere resistencia a la cicatrización de la herida.

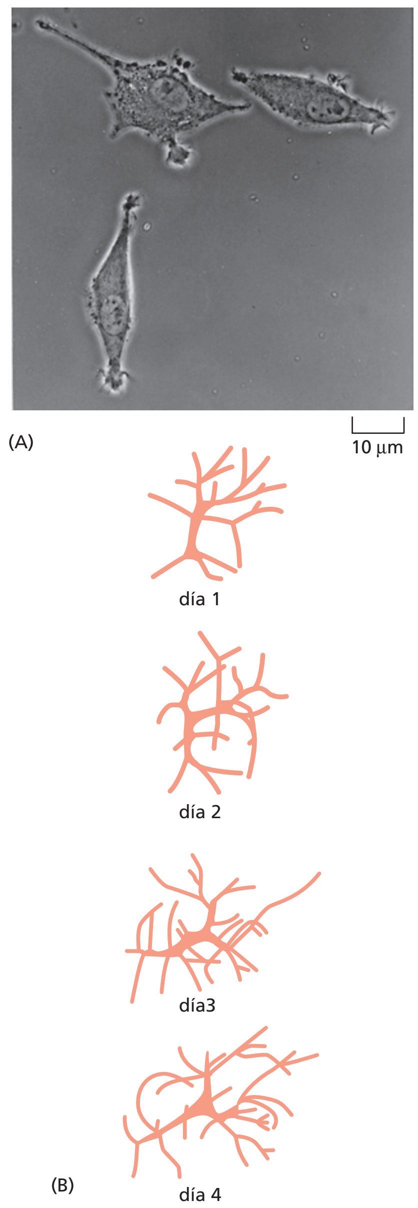


Figura 23–53 El fibroblasto. (A) Micrografía en contraste de fases de un fibroblasto en cultivo. (B) Esquemas de una célula viva similar a un fibroblasto, a partir de la cola transparente de un renacuajo. Aparecen los cambios de forma y de posición, en días sucesivos, de esta célula. Obsérvese que los fibroblastos en cultivo se aplanan pero en los tejidos pueden presentar morfologías más complejas y formar diferentes expansiones. Véase también la Figura 19–54. (A, de E. Pokorna et al., *Cell Motil. Cytoskeleton.* 28:25-33, 1994; B, dibujado a partir de E. Clark, *Am. J. Anat.* 13:351-379, 1912. Ambos con la autorización de Wiley-Liss.)

La matriz extracelular puede influir en la diferenciación de las células del tejido conjuntivo, afectando a su forma y su adhesión

La matriz extracelular influye en el estado de diferenciación de las células del tejido conjuntivo mediante efectos físicos o químicos. Este hecho se ha demostrado en estudios realizados sobre cultivos de células cartilaginosas o **condrocitos**. Bajo condiciones de cultivo apropiadas, estas células proliferan y conservan su carácter diferenciado, manteniendo durante muchas generaciones la síntesis de grandes cantidades de matriz cartilaginosa muy especializada, que las rodea por completo. Sin embargo, si las células se mantienen a una densidad relativamente baja y permanecen en forma de monocapa en la placa de cultivo, se produce su transformación. Pierden la forma redondeada característica de los condrocitos, se aplanan contra el sustrato y dejan de fabricar matriz cartilaginosa: dejan de producir colágena de tipo II, que es característica del cartílago, e inician la producción de colágena de tipo I, característica de los fibroblastos. Al cabo de un mes de cultivo, casi todas las células han modificado la expresión génica de la colágena y presentan un aspecto de fibroblastos. Los cambios bioquímicos deben producirse de forma brusca, ya que sólo unas cuantas células fabrican de forma simultánea ambos tipos de colágena.

Al parecer, los cambios bioquímicos están inducidos, al menos en parte, por cambios en la forma y en la adherencia celular. Por ejemplo, las células cartilaginosas que han realizado la transición al carácter fibroblástico, se pueden ir desprendiendo poco a poco de la placa de cultivo y transferirse a una placa de agarosa. Al formarse el depósito de gel a su alrededor, la agarosa mantiene las células en suspensión sin ningún tipo de adhesión al sustrato, adoptando estas una forma redondeada. En estas condiciones, las células revierten de inmediato al carácter de condrocitos y empiezan de nuevo a fabricar colágena de tipo II. La forma y la adhesión de las células puede controlar la expresión génica mediante señales intracelulares generadas en los contactos focales por las integrinas, que actúan como receptores de la matriz, tal como se describió en el Capítulo 19.

Para la mayoría de tipos celulares y en especial para las células del tejido conjuntivo, las posibilidades de anclaje y adhesión dependen de la matriz circundante, que por lo general

está producida por las propias células. De este modo, una célula puede crear un entorno que posteriormente actúa sobre sí misma reforzando su estado diferenciado. Además, la matriz extracelular segregada por una célula forma parte tanto de su propio entorno como del entorno de las células vecinas, lo que provoca un mismo tipo de diferenciación en las células próximas. Por ejemplo, se puede observar que un grupo de condrocitos que constituyen un nódulo de cartílago, se expande tanto en el organismo en desarrollo como en una placa de cultivo, debido a la conversión de los fibroblastos cercanos en condrocitos.

Los osteoblastos fabrican la matriz ósea

El cartílago y el hueso son tejidos con características muy distintas, pero están estrechamente relacionados por su origen; la formación del esqueleto depende de la asociación íntima entre ellos.

El **cartílago** es un tejido estructuralmente sencillo, constituido por un solo tipo de células –los condrocitos– inmersos en una matriz muy hidratada compuesta por proteoglicanos y colágena de tipo II más o menos uniforme, cuyas propiedades más relevantes se han estudiado en el Capítulo 19. La matriz cartilaginosa es deformable y el tejido crece por expansión a medida que los condrocitos se dividen y segregan nueva matriz (**Figura 23–54**). Por el contrario, el **hueso** es rígido y denso; crece por aposición, que consiste en un depósito de nueva matriz en las superficies libres. Como en el hormigón armado, la matriz ósea está formada principalmente por una mezcla de fibras fuertes (fibras de colágena tipo I), que resisten las fuerzas de tracción, y partículas sólidas (fosfato cálcico en forma de cristales de *hidroxiapatita*), que resisten la compresión. En el hueso adulto, las fibras de colágena están ordenadas en capas regulares estratificadas, de tal forma que las fibras de cada capa se disponen paralelas entre sí, pero en sentido perpendicular respecto a las fibras de las capas contiguas. La colágena ocupa un volumen casi igual al del fosfato cálcico. La matriz ósea es segregada por los **osteoblastos** que se encuentran en la periferia de la matriz existente y depositan nuevas capas de hueso sobre ella. Algunos de los osteoblastos permanecen libres en la periferia mientras que otros quedan englobados de forma gradual en su propia secreción. Este material recién fabricado (formado sobre todo por colágena de tipo I) recibe el nombre de *osteoide*. Mediante el depósito de cristales de fosfato cálcico en su interior, se transforma rápidamente en matriz ósea dura. Una vez aprisionada en la matriz dura, la célula original que constituye el hueso, denominada ahora **osteocito**, ya no tiene posibilidad de dividirse, aunque continua segregando a su alrededor pequeñas cantidades de matriz. El osteocito, al igual que el condrocito, ocupa una pequeña cavidad o *laguna* en la matriz, pero a diferencia del condrocito no está aislado de los otros osteocitos. Desde cada laguna parten finos canales, o *canalículos*, que albergan las prolongaciones celulares de los osteocitos que residen en ellas, permitiéndole formar uniones de comunicación con los osteocitos que se encuentran adyacentes (**Figura 23–55**). Aunque los osteocitos, por sí mismos, no segregan ni erosionan cantidades apreciables de matriz, es probable que desempeñen un papel importante en el control de la actividad de las células que sí llevan a cabo esta función. Los vasos sanguíneos y los nervios discurren a través del tejido, manteniendo vivas las células óseas y reaccionando cuando el hueso queda dañado.

El hueso maduro presenta una arquitectura bella y compleja, en la que densas placas de *hueso compacto* encierran espacios limitados por delgadas zonas de *hueso esponjoso* –una filigrana de ejes y arbotantes de tejido óseo, con médula ósea en los espacios intersticiales (**Figura 23–56**). Tal como veremos a continuación, la formación, mantenimiento y reparación de esta estructura no sólo depende de las células de la familia del tejido conjuntivo que sintetizan la matriz, sino también de otra clase distinta de células denominadas *osteoclastos*, que degradan la matriz.

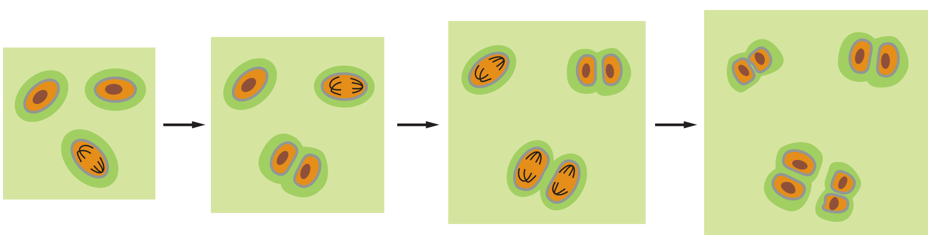


Figura 23–54 Crecimiento del cartílago. El tejido se expande a medida que los condrocitos se dividen y producen más cantidad de matriz. La matriz recién sintetizada, que rodea cada célula, está sombreada en *verde oscuro*. El cartílago también puede crecer incorporando fibroblastos del tejido periférico y convirtiéndolos en condrocitos.

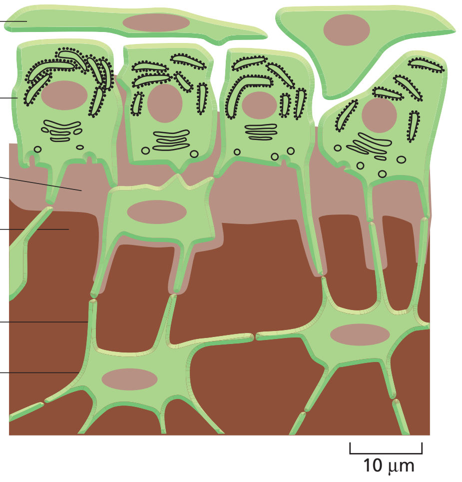


Figura 23–55 Depósito de matriz ósea por los osteoblastos. Los osteoblastos que revisten la superficie del hueso segregan la matriz orgánica del hueso (osteomucoide) y se transforman en osteocitos al quedar englobados por esta matriz. La matriz se calcifica poco después de depositarse. Parece que los propios osteoblastos derivan de las células madre osteogénicas que se hallan estrechamente relacionadas con los fibroblastos.

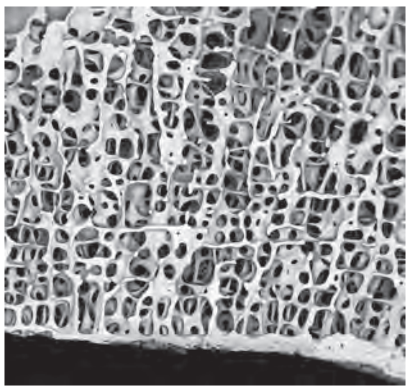
La mayor parte de los huesos se forman a partir de modelos de cartílago

La mayor parte de los huesos y en especial los huesos largos del tronco y extremidades, se originan a partir de diminutos "modelos a escala" que se forman en el embrión a partir del cartílago. Cada modelo a escala crece y a medida que se forma el nuevo cartílago, el cartílago antiguo es reemplazado por el hueso. El mecanismo se conoce como formación de hueso *endocondral*. El crecimiento del cartílago y la erosión y depósito de hueso están tan ingeniosamente coordinados que, aunque un hueso adulto mida medio metro de largo, tiene casi la misma forma que el modelo de cartílago inicial, que no alcanzaba más que unos cuantos milímetros de longitud.

El proceso se inicia en el embrión con la aparición de "condensaciones" vagamente definidas –grupos de células de tejido cartilaginoso embrionario que quedan más densamente empaquetadas que las células adyacentes y empiezan a expresar un grupo característico de genes– que incluyen *Sox9* y, después de un corto intervalo, *Runx2*. Estos dos genes codifican proteínas reguladoras génicas que son esenciales en el desarrollo del cartílago y del hueso, respectivamente. Las células mutantes que carecen de *Sox9* no alcanzan a diferenciarse como cartílago pero pueden formar hueso (y en algunas zonas del cuerpo donde tendría que haber cartílago, construirán hueso). A la inversa, los animales que carecen de *Runx2* funcional no fabrican hueso y nacen con un esqueleto constituido únicamente por cartílago.

En cuanto se inicia la expresión de *Sox9*, las células del interior de la condensación empiezan a segregar matriz cartilaginosa, a la vez que se dividen y agrandan. De este modo, forman un eje de cartílago rodeado de células no cartilaginosas más densamente empaquetadas. Las células cartilaginosas de la región central del eje quedan hipertrofiadas (muy voluminosas), dejan de dividirse y al mismo tiempo empiezan a segregar Indian Hedgehog –una molécula señalizadora de la familia Hedgehog. A su vez, esto provoca un aumento en la producción de determinadas proteínas Wnt, que activan la vía Wnt en las células que rodean el eje de cartílago. Como resultado de ello, bloquean la expresión de *Sox9*, mantienen la expresión de *Runx2* y empiezan a diferenciarse como osteoblastos, construyendo un collar de hueso alrededor de la trabécula del modelo cartilaginoso. Una sobreactivación artificial de la vía Wnt determina que una gran proporción de células fabrique hueso, y no cartílago; un bloqueo artificial de la vía de señalización Wnt hace lo contrario. Por lo tanto, en este sistema la señalización Wnt controla la elección entre las vías alternativas de diferenciación, con la expresión de *Sox9* que conduce hacia la vía del cartílago y la expresión de *Runx2* que conduce hacia la vía del hueso.

Las células cartilaginosas hipertrofiadas en la trabécula del modelo cartilaginoso mueren pronto, dejando grandes cavidades en la matriz y, al igual que en el hueso, la propia matriz se va mineralizando por depósito de cristales de fosfato cálcico. Los osteoclastos y los vasos sanguíneos invaden las cavidades y degradan la matriz cartilaginosa residual, creando un espacio para la médula ósea; los osteoblastos siguen su recorrido empezando a depositar médula ósea en las partes de la cavidad donde las áreas de matriz cartilaginosa actúan de molde. En una etapa mucho más avanzada, mediante un proceso parecido, en los extremos del hueso el tejido cartilaginoso es sustituido por tejido óseo, tal como se observa en la


(A)


(B)

Figura 23–56 Huesos esponjoso y compacto. (A) Electromicrografía de barrido a pequeño aumento del hueso esponjoso en una vértebra de un hombre adulto. Se ha eliminado el tejido blando de la médula ósea. (B) Una sección a nivel de la cabeza del fémur, de donde se han extraído previamente la médula ósea y otros tejidos blandos, muestra el hueso compacto más denso y el hueso esponjoso en su interior. Debido al tipo de remodelado que tiene lugar en el hueso como respuesta a una carga mecánica, las trabéculas de hueso esponjoso se van orientando en su interior, a lo largo de las principales direcciones de fuerza. (A, por cortesía de Alan Boyde; B, de J.B. Kerr, Atlas of Functional Histology. Mosby, 1999.)

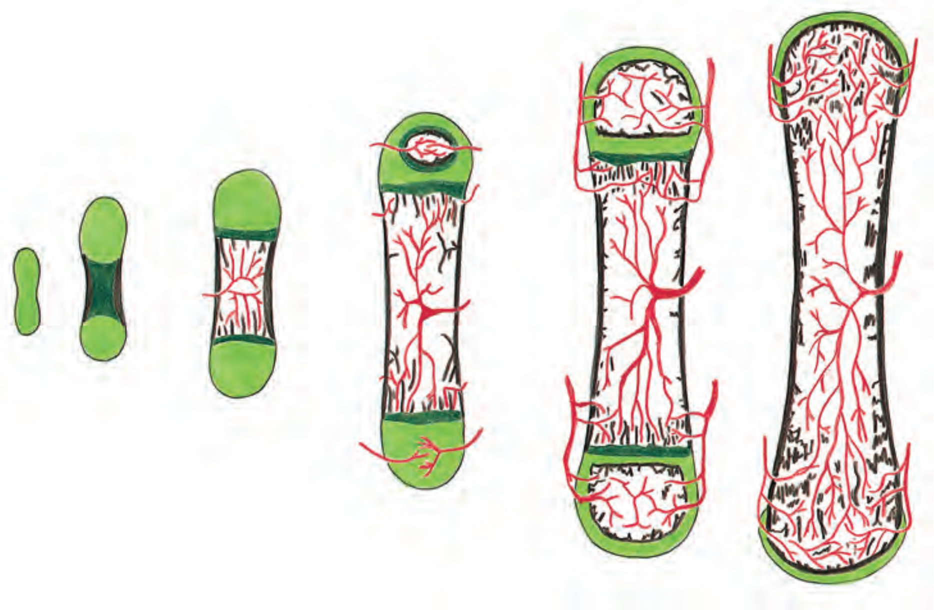


Figura 23–57 Desarrollo de un hueso largo. Los huesos largos, como el fémur o el húmero, se desarrollan a partir de un modelo cartilaginoso en miniatura. El cartílago no calcificado se ha dibujado en *verde claro*, el cartílago calcificado en *verde oscuro*, el hueso en *negro* y los vasos sanguíneos en *rojo*. El cartílago no se transforma en hueso, sino que gradualmente se sustituye por éste, debido a la acción de los osteoclastos y de los osteoblastos, que invaden el cartílago junto con los vasos sanguíneos. Los osteoclastos erosionan el cartílago y la matriz cartilaginosa, mientras que los osteoblastos segregan matriz ósea. El proceso de osificación empieza en el embrión y no termina hasta el final de la pubertad. El hueso resultante está formado por un cilindro vacío de paredes gruesas constituidas por hueso compacto que limitan una cavidad central ocupada por la médula ósea. Téngase en cuenta que no todos los huesos se desarrollan de este modo. Los huesos membranosos del cráneo, por ejemplo, no se forman a partir de un modelo cartilaginoso, sino directamente como placas óseas. (Adaptado de D.W. Fawcett. A Textbook of Histology, 12.ª ed. New York: Chapman and Hall, 1994.)

Figura 23–57. A partir de la pubertad, el alargamiento continuo del hueso depende de la placa de cartílago de crecimiento entre el tallo y el extremo (la epífisis y la diáfisis) del hueso. Como resultado de una mutación dominante en el gen que codifica un receptor de FGF (FGFR3), se produce un crecimiento defectuoso del cartílago en dicha placa, responsable de una de las formas más frecuentes de enanismo, la *acondroplasia* (**Figura 23–58**).

Finalmente, la placa de crecimiento de cartílago queda sustituida por hueso y desaparece. El único remanente de cartílago que queda en el hueso largo adulto es una fina, aunque esencial, capa que forma una cubierta lisa y lubrificada en las superficies de las uniones óseas, donde los huesos se articulan entre sí (véase Figura 23–57). La edad, una lesión mecánica o una enfermedad autoinmune pueden desgastar dicha capa de cartílago y producir *artritis*, una de las dolencias más generalizadas y dolorosas de la vejez.

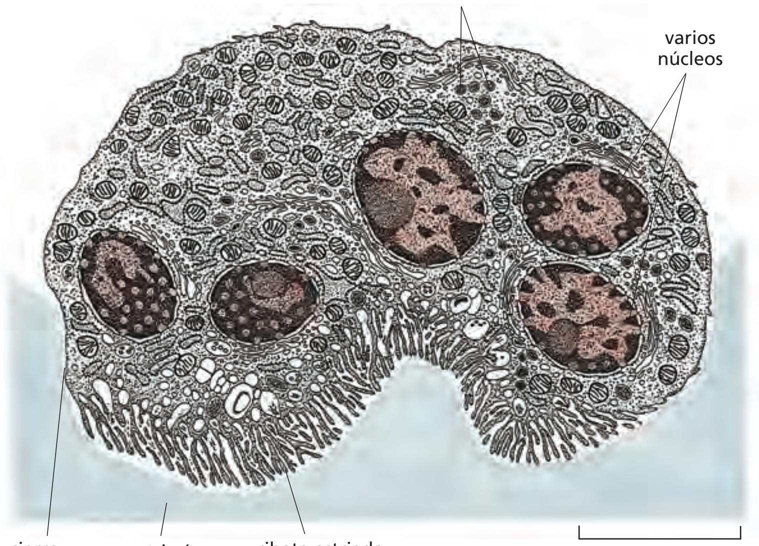


Figura 23–58 Acondroplasia. Este tipo de enanismo tiene lugar con una frecuencia de uno de cada 10.000-100.000 nacimientos; en más del 99% de los casos está provocado por una mutación en una región idéntica del genoma, correspondiente al aminoácido 380 del receptor de FGF, FGFR3 (una glicina en el dominio transmembrana). La mutación es dominante y en casi todos los casos es debida a nuevas mutaciones independientes lo cual implica una velocidad de mutación extraordinaria en dicha región del genoma. El defecto en la señalización por FGF provoca enanismo, debido a la interferencia con el crecimiento del cartílago en el desarrollo de los huesos largos. (De una pintura de Velázquez de Sebastián de Morra © Museo del Prado, Madrid.)

El hueso se remodela continuamente por medio de las células que lo forman

Aunque parezca lo contrario, a pesar de su elevada rigidez el hueso no es un tejido inmutable y permanente. Atravesando la dura matriz extracelular se encuentran conductos y cavidades ocupados por células vivas, que constituyen alrededor de un 15% del peso del hueso compacto. Estas células están implicadas en un incesante proceso de remodelaje: mientras los osteoblastos depositan matriz ósea nueva, los osteoclastos destruyen la matriz ósea envejecida. Este mecanismo posibilita una continua renovación y sustitución de la matriz en el interior del hueso.

Los **osteoclastos** (**Figura 23–59**) son grandes células plurinucleadas que, igual que los macrófagos, se forman a partir de las células madre hemopoyéticas en la médula ósea roja. Las células precursoras se liberan como monocitos hacia la circulación sanguínea y se agrupan en las áreas de reabsorción ósea, donde se fusionan dando lugar a osteoclastos plurinucleados, que se fijan a las superficies de la matriz ósea y la destruyen. Los osteoclastos pueden abrir profundos túneles en la sustancia intercelular del hueso compacto y formar cavidades que luego son invadidas por otras células. Un capilar sanguíneo crece hacia el centro de cada túnel y sus paredes quedan tapizadas por una capa de osteoblastos (**Figura 23–60**). Dichos osteoblastos se distribuyen en capas concéntricas de matriz nueva que van llenando de forma gradual la cavidad y dejan sólo un estrecho canal que rodea al nuevo vaso sanguíneo, produciendo la estructura estratificada del hueso compacto. Muchos de los osteoblastos quedan atrapados en la matriz ósea y sobreviven en los anillos concéntricos que forman los osteocitos. Mientras que algunos de los túneles se llenan de hueso, otros quedan perforados por los osteoclastos, abriéndose paso a través de sistemas concéntricos más antiguos. Las consecuencias de este remodelaje constante se observan en los bellos patrones estratificados de la matriz del hueso compacto (**Figura 23–61**).



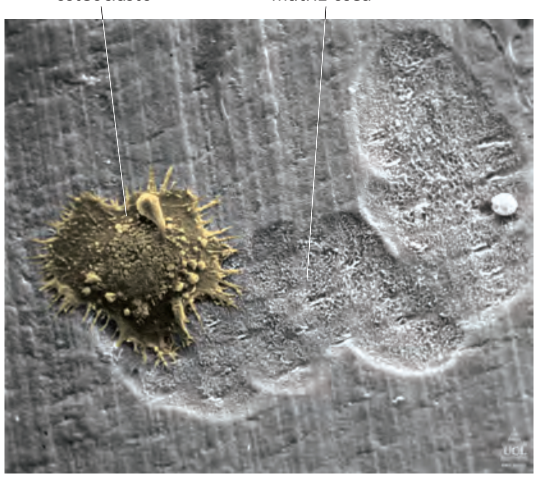


Figura 23–59 Osteoclastos. (A) Sección transversal de un osteoclasto. Esta célula gigante plurinucleada erosiona la matriz ósea. El "ribete estriado" es una zona de secreción de ácidos (que disuelven la parte mineralizada del hueso) y de hidrolasas (que digieren los componentes orgánicos de la matriz). Los osteoclastos varían en su forma, son móviles y a menudo forman prolongaciones que reabsorben el hueso en las distintas zonas. Se originan a partir de los monocitos y se pueden considerar macrófagos especializados. (B) Un osteoclasto de la matriz ósea, observado con microscopía electrónica de barrido. El osteoclasto ha ido excavando la matriz, degradándola y dejando como resultado una serie de huecos. (A, de R.V. Krstić, Ultrastructure of the Mammalian Cell: An Atlas. Berlin: Springer-Verlag, 1979; B, cortesía de Alan Boyde.)

Las señales de los osteoblastos controlan a los osteoclastos

Los osteoblastos que fabrican la matriz también producen las señales que incorporan y activan a los osteoclastos para degradarla. Al parecer, dos proteínas asumen esta función: una es el CSF de macrófagos (MCSF), ya descrito en la explicación de la hematopoyesis (véase Tabla 23–2); la otra es TNF11, un miembro de la familia TNF (también denominada RANKL). El comportamiento de los osteoblastos para atraer a sus oponentes puede parecer contrapro-

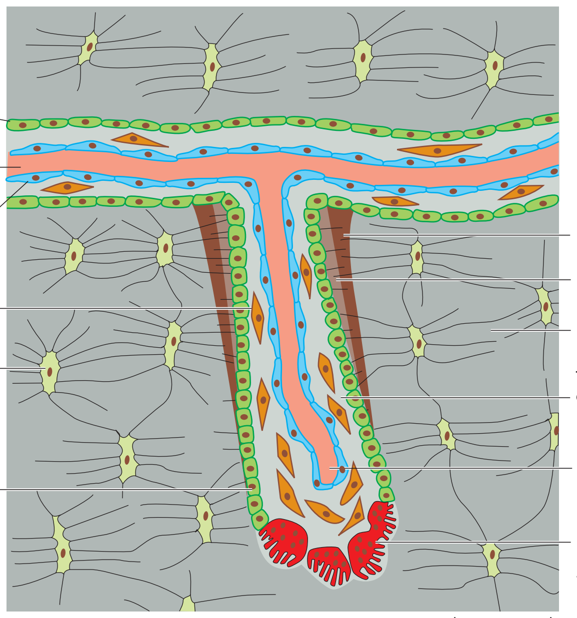


Figura 23–60 Remodelaje del hueso compacto. Los osteoclastos, que actúan conjuntamente como un pequeño grupo, excavan un túnel a través del hueso viejo y avanzan a una velocidad de cerca de 50 μm al día. Los osteoblastos penetran tras ellos en el túnel, revisten sus paredes y empiezan a formar hueso nuevo depositando matriz a una velocidad de 1-2 μm al día. Al mismo tiempo, un capilar crece a lo largo del centro del túnel. Finalmente, el túnel quedará lleno de capas concéntricas de hueso formado de nuevo, con un solo estrecho conducto central. Cada uno de estos conductos, además de constituir una vía de acceso para los osteoclastos y para los osteoblastos, contiene uno o más vasos sanguíneos que transportan los nutrientes que necesitan las células óseas para sobrevivir. De esta forma, cada año se sustituye entre un 5-10% del hueso de un mamífero adulto sano. (Según Z.F.G. Jaworski, B. Duck y G. Sekaly, *J. Anat.* 133: 397-405, 1981. Con la autorización de Blackwell Publishing.)

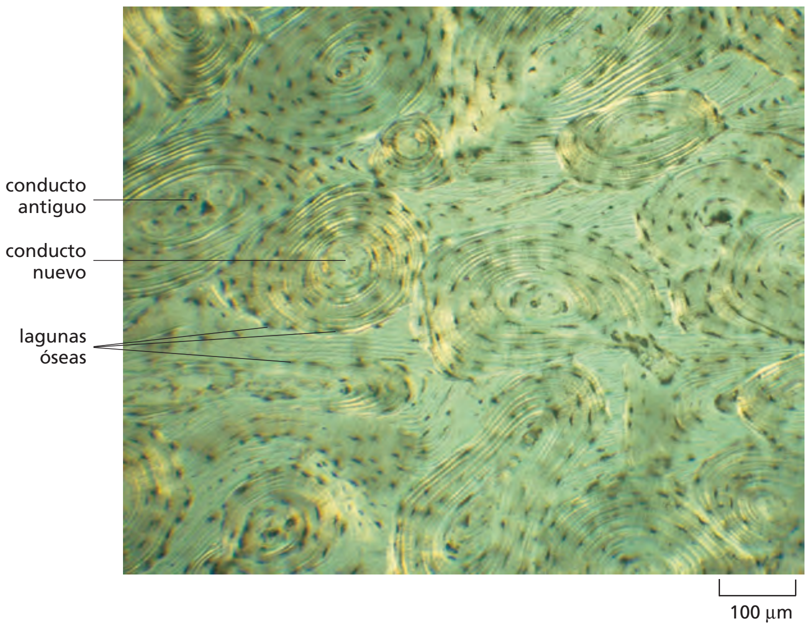


Figura 23–61 Sección transversal de una región compacta externa de un hueso largo. La micrografía muestra los límites de los túneles formados por los osteoclastos y posteriormente rellenos por los osteoblastos durante periodos sucesivos de remodelaje del hueso. La sección se ha obtenido mediante la técnica de desgaste. La matriz dura ha quedado conservada, pero no así las células. Sin embargo, las lagunas y los conductos calcóforos que ocupaban los osteocitos son claramente visibles. Los anillos concéntricos claros y oscuros en alternancia corresponden a una orientación alternante de las fibras de colágena en las sucesivas capas de la matriz ósea depositada por los osteoblastos que en vida revestían la pared del conducto. (Este patrón se observa aquí habiendo situado la muestra entre filtros polaroid parcialmente cerrados.) Obsérvese cómo el sistema más viejo de capas concéntricas de hueso de la parte inferior derecha se ha cortado de forma parcial y se ha reemplazado por sistemas más nuevos.

ducente para dichas células, pero tiene la función provechosa de concentrar osteoclastos en los tejidos donde se necesitan.

Para prevenir una excesiva degradación de la matriz, los osteoblastos segregan junto a MSCF y TNF11, otra proteína, la *osteoprotegerina*, que tiende a bloquear la acción de TNF11. Cuanto más alto es el nivel de la activación Wnt en los osteoblastos, más osteoprotegerina segregan y, en consecuencia, más bajos son los niveles de activación de los osteoclastos y de la velocidad de degradación de la matriz. Así, la vía de señalización Wnt parece que tiene dos funciones distintas en la formación del hueso: en los estadios tempranos, controla el compromiso inicial de las células destinadas a ser osteoblastos; más tarde, actúa en los osteoblastos diferenciados para intervenir en la regulación del equilibrio entre depósito y erosión de la matriz.

La alteración de este equilibrio puede provocar *osteoporosis*, que consiste en una excesiva erosión de la matriz ósea y debilitación del hueso, o la situación opuesta, la *osteopetrosis,* situación en la que el hueso se vuelve excesivamente grueso y denso. Las señales hormonales, incluidos los estrógenos, los andrógenos y la hormona peptídica *leptina,* conocida por su función en el control del apetito (se trata más adelante), tienen un potente efecto sobre este equilibrio. Como mínimo alguno de estos efectos tiene lugar en función de la producción de TNF11 y de osteoprotegerina por los osteoblastos.

Las hormonas circulantes afectan a los huesos de todo el cuerpo. No menos importantes son los controles locales que posibilitan que el hueso se deposite en una zona mientras se reabsorbe en otra. Gracias a este tipo de controles en el proceso del remodelado, la estructura los huesos está dotada de una extraordinaria capacidad de adaptación como respuesta a las variaciones a largo plazo de la carga que soportan. Esto es lo que posibilita, por ejemplo, la ortodoncia: una fuerza constante aplicada a un diente mediante una abrazadera producirá un desplazamiento gradual, durante varios meses, a través del hueso de la mandíbula, remodelando el tejido óseo por delante y por detrás de la misma. El comportamiento adaptativo del hueso implica que el depósito y la degradación de la matriz están regulados de algún modo por fuerzas mecánicas locales (véase Figura 23–56). Ciertas evidencias sugieren que este hecho es debido a que la fuerza mecánica sobre el hueso activa la vía Wnt, en los osteoblastos o en los osteocitos, y regula de este modo la producción de señales reguladoras de la actividad de los osteoclastos.

El hueso también puede sufrir una reconstrucción mucho más rápida y espectacular cuando se necesita. Ciertas células capaces de formar cartílago nuevo permanecen en el tejido conjuntivo que rodea al hueso. Si se rompe el hueso, las células adyacentes a la fractura lo reparan mediante una especie de recapitulación del proceso embrionario inicial: primero el cartílago se deposita soldando el espacio vacío y posteriormente es sustituido por hueso. La capacidad de autorreparación, tan eficazmente desempeñada por los tejidos esqueléticos, es una propiedad de los seres vivos que en la actualidad no tiene ningún paralelismo entre los materiales diseñados por el hombre.

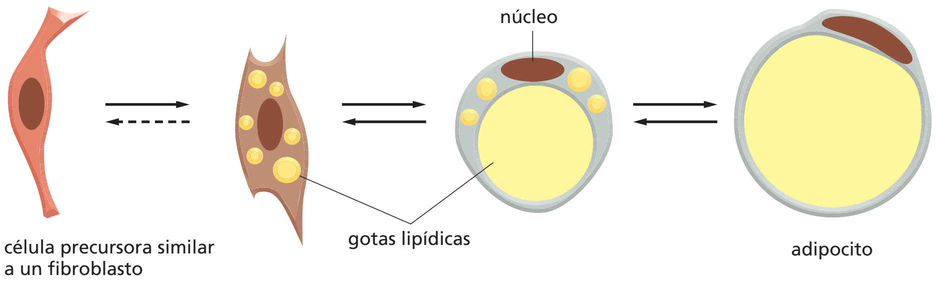


Figura 23–62 Desarrollo de un adipocito. Una célula precursora similar a un fibroblasto se convierte en una célula adiposa madura mediante acumulación y coalescencia de gotas lipídicas. El proceso es, al menos parcialmente, reversible, tal como indican las *flechas;* las *flechas discontinuas* indican la posibilidad de que, en ocasiones, una célula diferenciada pueda revertir al estadio de fibroblasto pluripotencial. En los estados temprano e intermedio, las células pueden dividirse, pero la célula adiposa madura ya no puede hacerlo.

Las células adiposas pueden desarrollarse a partir de los fibroblastos

Las **células adiposas**, o **adipocitos**, también derivan de células similares a los fibroblastos, tanto durante el desarrollo normal de los mamíferos como en situaciones patológicas. Por ejemplo, en la distrofia muscular, en que las células musculares mueren, son reemplazadas de forma gradual por tejido conjuntivo, posiblemente por conversión de los fibroblastos locales. La diferenciación de la célula adiposa se inicia con la expresión de dos familias de proteínas reguladoras de genes: la familia *CEBP* (CCAAT/proteína de unión activadora; ***C****CAAT/****e****nhancer* ***b****inding* ***p****rotein)* y la familia PPAR (receptor activado de proliferación de peroxisomas; ***p****eroxisome* ***p****roliferator-****a****ctivated* ***r****eceptor*), especialmente PPARγ. Como ocurre con las familias MyoD y MEF2 en el desarrollo del músculo esquelético, las proteínas CEBP y PPARγ dirigen y mantienen una expresión diferente a lo largo de varios circuitos de control interreguladores y autorreguladores. Estas proteínas actúan conjuntamente controlando la expresión de los otros genes característicos de los adipocitos.

La producción de las enzimas de importación de ácidos grasos y de la glucosa para la síntesis de lípidos, genera una acumulación de gotas de grasa, compuestas sobre todo por triacilgliceroles (véase Figura 2–81). Estas gotas se fusionan y se agrandan hasta que la célula está muy dilatada (más de 120 μm de diámetro) y presenta únicamente un delgado anillo citoplasmático alrededor de la masa lipídica (**Figura 23–62** y **Figura 23–63**). En la célula adiposa también se sintetizan lipasas, que proporcionan la capacidad de invertir el proceso de acumulación de lípidos, mediante la hidrólisis de las moléculas de triacilgliceroles en ácidos grasos, que pueden ser consumidos por otras células. La célula adiposa puede variar su volumen más de mil veces, acumulando y liberando lípidos.

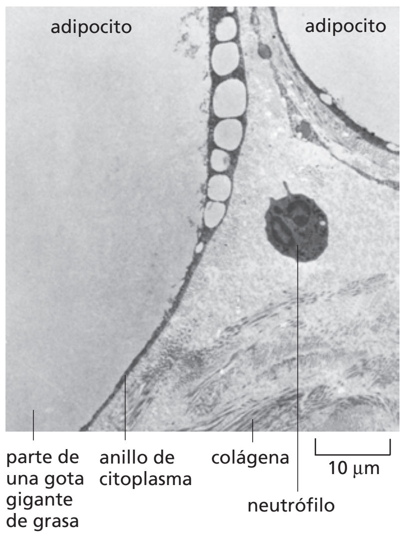


Figura 23–63 Adipocitos. En esta electromicrografía a pocos aumentos, se observan zonas de dos adipocitos. Un neutrófilo que se halla en el tejido conjuntivo adyacente da la referencia de la escala de aumentos; cada uno de los adipocitos es 10 veces más grande que el diámetro del neutrófilo y se halla ocupado casi por completo por una sola y voluminosa gota de grasa. Las pequeñas gotas de grasa (*claras y ovaladas*) del anillo citoplasmático restante acabarán fusionándose con la gota central. El núcleo no es visible en ninguno de los adipocitos de la imagen. (Por cortesía de Don Fawcett, de D.W. Fawcett, A Textbook of Histology, 12.ª ed. New York: Chapman y Hall, 1994.)

La leptina segregada por las células adiposas proporciona una retroalimentación negativa que inhibe la ingesta

En condiciones normales, para la mayoría de animales el suministro de alimento es variable e impredecible. Las células adiposas realizan una función esencial de almacenaje de reservas y nutrientes en situaciones de abundancia, y de liberación de estas reservas en épocas de escasez. Por lo tanto, para la funcionalidad del tejido adiposo es esencial que su número pueda adaptarse, durante toda la vida, al aporte de nutrientes. Para nuestros antepasados este hecho era una bendición; en el bien alimentado medio mundo actual, se ha convertido en una maldición. Por ejemplo, en los Estados Unidos aproximadamente el 30% de la población padece obesidad, que se define como un índice de masa corporal (peso/altura^2) de más de 30 kg/m^2, equivalente a un 30% superior al peso ideal.

No resulta fácil determinar en qué medida las variaciones de la cantidad de tejido adiposo dependen de cambios en el número de células adiposas o de cambios en el tamaño de las células. Probablemente, en los adultos normales no obesos, las variaciones se producen principalmente en el tamaño de las células adiposas, aunque en casos de obesidad grave, el número de células adiposas también aumenta. Los factores que provocan la incorporación de nuevas células adiposas no se conocen exactamente, aunque parece que incluyen la hormona del crecimiento y el IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina-1; ***i****nsulinlike* ***g****rowth* ***f****actor-1*). Sin embargo está claro que el aumento o la disminución del tamaño de la célula adiposa está regulado de forma directa por los niveles de nutrientes circulantes y de hormonas como la insulina, que reflejan el nivel nutricional. Así pues, el exceso de alimento ingerido respecto al consumo energético condiciona directamente la acumulación del tejido adiposo.

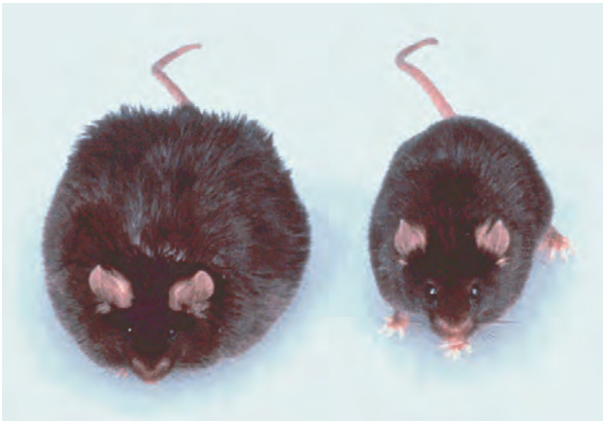


Figura 23–64 Efectos de la deficiencia de leptina. Un ratón normal (derecha) comparado con otro que presenta una mutación en el gen de la *Obesidad,* que codifica la leptina (izquierda). El mutante deficiente en leptina fracasa en limitar su comida y se vuelve exageradamente obeso (tres veces el peso de un ratón normal). (Por cortesía de Jeffrey M. Friedman.)

Pero ¿cómo se regula la ingesta de alimento y el gasto energético? Factores como la colecistoquinina, que como hemos descrito anteriormente segregan las células intestinales en respuesta a la presencia de alimento en la luz intestinal, son responsables del control a corto plazo del curso del alimento durante un día. Pero también se necesitan controles a largo plazo, puesto que no engordamos o adelgazamos de forma continuada durante toda la vida. Lo más importante desde una perspectiva evolutiva y para nuestros antepasados que con frecuencia contaban con suministros escasos e inseguros de alimento, es que el ayuno puede provocar más hambre y la búsqueda de alimento. Quienes han sufrido verdadera hambre durante mucho tiempo son testigos de la fuerza incontenible de esta compulsión. La señal clave parece ser una hormona denominada **leptina**, que por lo general circula por la sangre cuando las reservas de grasa son las adecuadas; cuando no lo son, desaparece produciendo hambre crónica. Los ratones mutantes que carecen de leptina o del receptor de leptina adecuado son extremadamente obesos (**Figura 23–64**). En la especie humana se puede presentar este mismo tipo de mutaciones, aunque raras veces. Las consecuencias son parecidas; apetito constante, sobrealimentación y una obesidad extraordinaria.

La leptina se sintetiza de forma normal en las células adiposas; cuanto más grandes son estas células, más leptina fabrican. La leptina actúa sobre distintos tejidos y en particular sobre el cerebro, en las células de las regiones del hipotálamo que regulan el comportamiento alimentario. La ausencia de leptina es una señal de inanición, que conduce a un comportamiento que restaurará las reservas de grasa al nivel apropiado. Así pues, la leptina, como la miostatina liberada por las fibras musculares, proporciona un mecanismo de retroalimentación negativo que regula el crecimiento del tejido que la segrega.

En la mayoría de personas obesas, los niveles de leptina en la circulación sanguínea se mantienen elevados, aunque el apetito no desaparece, a pesar de que los receptores de leptina existen y son funcionales. Al parecer, el control por retroalimentación de la leptina ha evolucionado para salvarnos de morir por inanición, más que de la obesidad producida por la sobrealimentación. En las regiones bien alimentadas del mundo dependemos de un conjunto de mecanismos diversos, muchos de los cuales son poco conocidos, que nos impiden ser demasiado obesos.

Resumen

La familia de las células del tejido conjuntivo comprende los fibroblastos, las células cartilaginosas, las células óseas, las células adiposas y las células musculares lisas. Algunos tipos de fibroblastos, como las células madre mesenquimáticas de la médula ósea son capaces de transformarse en cualquiera de los restantes miembros de la familia de células. Estas transformaciones de los tipos celulares del tejido conjuntivo están reguladas por la composición de la matriz extracelular, la forma celular y las hormonas y factores de crecimiento.

El cartílago, como el hueso, están formados por células y matriz sólida segregada alrededor de las propias células –los condrocitos del cartílago y los osteoblastos del hueso (los osteocitos son osteoblastos que han quedado atrapados en el interior de la matriz). La matriz del cartílago es deformable de manera que el tejido puede crecer por dilatación, mientras que el hueso es rígido y sólo puede crecer por aposición. Los dos tejidos tienen un origen relacionado y colaboran estrechamente. La

mayoría de huesos largos se desarrollan a partir de pequeños "modelos" en cartílago que, a medida que crecen, actúan de moldes para el depósito de hueso. La señalización Wnt regula la elección de una de las dos vías de diferenciación celular: como condrocito (que requiere la expresión de Sox9) o como osteoblasto (que requiere la expresión de Runx2). Los osteoblastos, además de segregar matriz ósea, también producen señales que incorporan monocitos de la circulación sanguínea para convertirse en osteoclastos, que degradan la matriz ósea. Los osteoblastos y los osteocitos controlan el equilibrio entre depósito y degradación de la matriz, mediante la coordinación de señales que envían a los osteoclastos. A través de la actividad de estos tipos celulares antagonistas, el hueso ejerce un perpetuo remodelado mediante el que puede adaptarse a la carga que soporta y puede alterar su densidad como respuesta a señales hormonales. Además, si el hueso adulto se fractura, conserva la capacidad de autorrepararse, mediante la reactivación de los mecanismos que regulan el desarrollo embrionario: las células adyacentes a la rotura lo transforman en cartílago, que posteriormente queda sustituido por hueso.

Mientras que la función principal de la mayoría de miembros de la familia del tejido conjuntivo es la de segregar matriz extracelular, las células adiposas almacenan grasa. La regulación por retroalimentación mantiene la cantidad de tejido graso adecuada para el cuerpo: los adipocitos producen una hormona, la leptina, que actúa sobre el cerebro; la ausencia de leptina actúa como señal de peligro de inanición, dirigiendo el comportamiento que restaurará las reservas de grasa hasta el nivel adecuado.

INGENIERÍA DE LAS CÉLULAS MADRE

La mayoría de los tejidos del cuerpo no sólo se renuevan, sino que también se reparan; este hecho se debe principalmente a las células madre y a los controles por retroalimentación que regulan su comportamiento. Pero, cuando los propios mecanismos de la Naturaleza fallan ¿podemos intervenir y mejorarlos? ¿Podemos encontrar formas de ayudar a las células a reconstruir los tejidos vivos que se han perdido o se han dañado por enfermedad o lesión y son incapaces de repararse de forma espontánea? Una estrategia obvia consiste en aprovechar las capacidades de desarrollo características de las células madre o progenitoras de las que generalmente derivan los componentes tisulares que se han perdido. Pero ¿cómo se obtienen dichas células y cómo podemos actuar sobre ellas para su utilización? Este es el tema que analizamos en esta última sección de este capítulo.

Las células madre hemopoyéticas se pueden utilizar para sustituir células sanguíneas alteradas por otras sanas

Como se ha descrito, se pueden irradiar ratones para destruir sus células hemopoyéticas y más tarde reconstituirlas mediante una transfusión de nuevas células madre, que repoblarán la médula ósea y restaurarán la producción de células sanguíneas. De forma parecida, los pacientes con leucemia, por ejemplo, pueden ser irradiados o tratados químicamente para destruir sus células cancerosas junto con el tejido hematopoyético restante y después reconstituirlas mediante una transfusión de células madre hemopoyéticas no cancerosas, que se han obtenido a partir de la médula ósea de un donante adecuado. Si la médula ósea del donante y del receptor son genéticamente diferentes, dará lugar a problemas de rechazo inmunitario, aunque haciendo coincidir el tejido cuidadosamente y utilizando fármacos inmunosupresores se pueden reducir estas dificultades hasta niveles tolerables. En ciertos casos, en los que la leucemia no deriva de una mutación de la propia célula madre hemopoyética sino de la de un tipo de célula sanguínea progenitora especializada, es posible que el paciente se recupere con sus propias células. Se extrae una muestra de médula ósea antes de la irradiación y se separan sus poblaciones celulares para obtener una preparación de células madre hemopoyéticas que no presente células leucémicas. Esta preparación purificada se introduce en el paciente después de la irradiación, mediante una transfusión.

Este mismo tipo de tecnología también abre paso, en principio, a un tipo de terapia génica: se pueden aislar células madre hemopoyéticas en cultivo, modificarlas genéticamente mediante una transfección de DNA, u otra técnica que permita introducir el gen de interés, y después realizar una transfusión en un paciente que carezca de este gen para proporcionarle una fuente de renovación del componente genético perdido. Una versión de esta aproximación se está probando para el tratamiento del sida. Se pueden obtener células madre hemopoyéticas del paciente infectado con HIV, modificarlas genéticamente por transfec-

ción con un material genético que haga que las células madre y su estirpe se vuelvan resistentes a la infección por HIV, y transfundirlas de nuevo al mismo paciente.

Las poblaciones de células madre epidérmicas pueden expandirse en cultivo para la reparación de un tejido

Otro ejemplo sencillo de utilización de células madre consiste en la reparación de piel tras quemaduras extensas. Mediante cultivos celulares procedentes de zonas no lesionadas de la piel quemada de un paciente, es posible obtener rápidamente células madre epidérmicas en cantidades elevadas. Estas células madre se utilizan para repoblar la superficie corporal dañada. Sin embargo, para obtener buenos resultados después de una quemadura de tercer grado es necesario, antes que nada, proporcionar una sustitución urgente de la dermis perdida. Para ello, se puede utilizar la dermis extraída de un cadáver humano o sustituirla por dermis artificial. Este campo todavía está sujeto a experimentación. Existe una técnica en la que se forma una lámina de matriz artificial de colágena mezclada con glicosaminoglucanos, con una fina membrana externa de silicona que cubre la superficie externa constituyendo una barrera impermeable; esta piel sustitutoria (denominada Íntegra) se extiende sobre la superficie del cuerpo quemado, después de haber limpiado los tejidos dañados. Los fibroblastos y los capilares sanguíneos de los tejidos más profundos del paciente migran a través de la matriz artificial y la reemplazan de forma gradual con tejido conjuntivo nuevo. Mientras tanto, se cultivan las células epidérmicas hasta alcanzar un número suficiente para formar una lámina fina de extensión adecuada. Unas semanas más tarde de la operación inicial, se extrae la membrana de silicona y se sustituye por esta epidermis cultivada, hasta que se reconstruye la piel por completo.

Las células madre neuronales se pueden manipular en cultivo

Mientras que la epidermis es uno de los tejidos que se puede regenerar de forma rápida y sencilla, el sistema nervioso central (SNC) es el más complejo y al parecer, el más difícil de reconstruir durante la vida adulta. El cerebro y la médula espinal de los mamíferos adultos tienen muy poca capacidad de autorreparación. Las células madre capaces de generar nuevas neuronas son difíciles de localizar en los mamíferos adultos y hasta hace poco se creía que no existían.

Sin embargo, actualmente sabemos que en el cerebro de los mamíferos adultos subsisten células madre del sistema nervioso central capaces de dar lugar tanto a neuronas como a células de la glía. Además, en algunas zonas del cerebro se producen de forma continuamente nuevas neuronas que reemplazan a las que mueren (**Figura 23–65**). La renovación neuronal ocurre de forma espectacular en determinados pájaros cantores en los que cada año muere un gran número de neuronas y son reemplazadas por neuronas recién formadas, como parte del proceso de aprendizaje de una nueva melodía en cada época de cría.

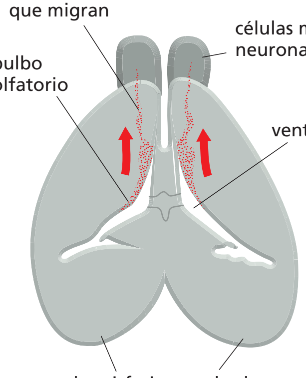


Figura 23–65 Producción continua de neuronas en el cerebro de un ratón adulto. Sección transversal del cerebro que proporciona una visión desde arriba y que muestra la región que limita los ventrículos del cerebro, donde se encuentran las células madre neuronales. Estas células producen continuamente una descendencia que migra hacia el bulbo olfativo, donde se diferencian a neuronas. Posiblemente el recambio constante de neuronas en el bulbo olfativo se halla relacionado, de algún modo, con el recambio de las neuronas receptoras olfatorias que se extienden desde el epitelio olfativo, tal como se indicó. También existe un continuo recambio de neuronas en el hipocampo del adulto, una región implicada en el aprendizaje y la memoria, donde la plasticidad de funciones en el adulto parece estar vinculada al recambio de un grupo específico de neuronas. (Adaptado de B. Barres, *Cell* 97: 667-670,1999. Con la autorización de Elsevier.)

La prueba de que el cerebro de un mamífero adulto contiene células madre neuronales procede de experimentos con fragmentos de tejido que se disocian y se utilizan para el mantenimiento de cultivos celulares. En condiciones adecuadas de cultivo, las células derivadas de una región apropiada del cerebro formarán "neuroesferas" flotantes –agregados compuestos por una mezcla de células madre neuronales con neuronas y células de la glía derivadas de las células madre. Dichas neuroesferas pueden propagarse a través de varias generaciones celulares, o bien las células se extraen en cualquier momento y se trasplantan al cerebro de un animal intacto. Allí darán lugar a una estirpe diferenciada, compuesta por neuronas y células de la glía.

Utilizando condiciones de cultivo ligeramente distintas, mediante una correcta combinación de factores de crecimiento en el medio, las células madre neuronales pueden crecer en monocapa y ser activadas para proliferar como si se tratara de una población pura de células madre, sin considerar las estirpes diferenciadas. Mediante un cambio posterior de las condiciones de cultivo, se puede inducir en cualquier momento la diferenciación de dichas células para dar lugar a una mezcla de neuronas y células de la glía (**Figura 23–66**), o sólo uno de los dos tipos celulares, en función de la composición del medio.

Los cultivos puros de células madre neuronales, en los que las células se dividen produciendo más células de este tipo, son valiosos como una fuente de células para trasplantes. Deberían contribuir al análisis de los factores que definen el estadio de célula madre y al control

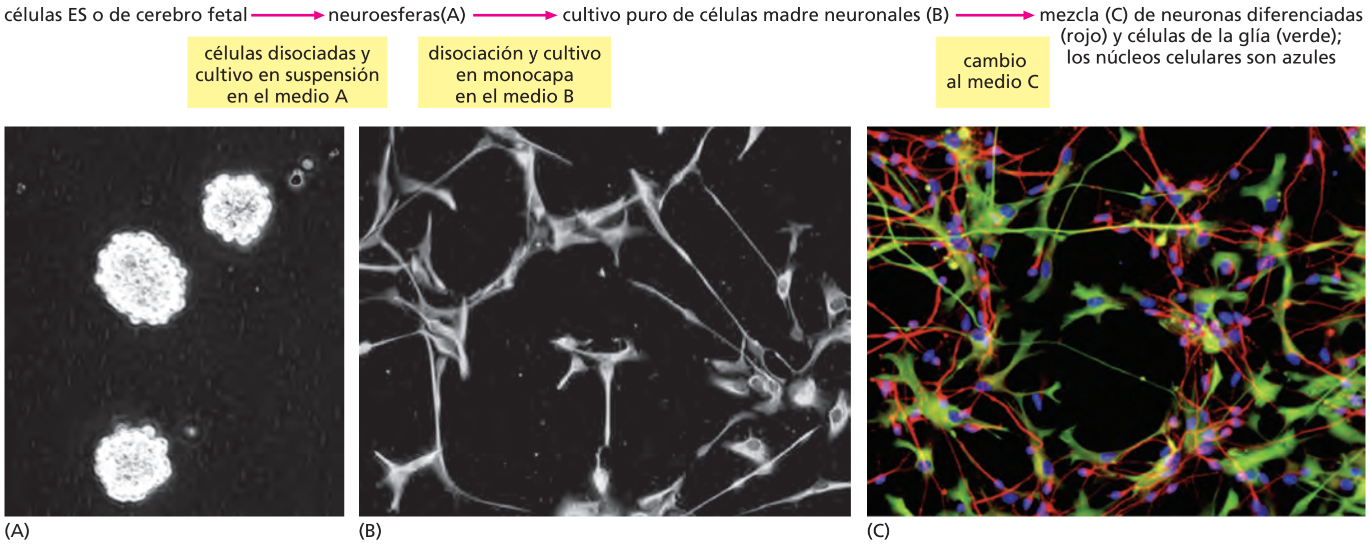


Figura 23–66 Células madre neuronales. Las fotografías muestran las etapas de producción, mediante neuroesferas (A), de un cultivo puro de células madre neuronales (B) a partir de tejido del cerebro embrionario. Estas células madre se pueden mantener en proliferación indefinidamente, o mediante un cambio de medio de cultivo, puede provocarse su diferenciación (C) en neuronas (*rojo*) y células de la glía (*verde*). A partir de células ES también se pueden derivar células neuronales con idénticas propiedades. (Micrografías de L. Conti et al., *PLoS* 3:1594-1606, 2005. Con autorización de Public Library of Science.)

del inicio de la diferenciación. Desde que las células pueden manipularse genéticamente por transfección de DNA y por otros medios, se han abierto nuevas líneas de investigación sobre la función de genes específicos en dichos procesos y en enfermedades genéticas del sistema nervioso, como las enfermedades neurodegenerativas. En principio este hallazgo crea nuevas oportunidades de tratamiento de enfermedades mediante la ingeniería genética de células neuronales.

Las células madre neuronales pueden repoblar el sistema nervioso central

Las células madre neuronales trasplantadas en un cerebro adulto tienen una gran capacidad para adecuar su comportamiento ajustándose a su nueva localización. Por ejemplo, las células madre del hipocampo de ratón implantadas en la vía precursora del bulbo olfatorio (véase Figura 23–65) dan lugar a neuronas que quedan correctamente incorporadas en el bulbo olfatorio. Esta capacidad de las células madre neuronales y su estirpe para adaptarse a un nuevo entorno augura importantes aplicaciones clínicas en el tratamiento de enfermedades en las que las neuronas degeneran o pierden sus vainas de mielina y en las lesiones del sistema nervioso central. Así, las células madre neuronales (derivadas de tejidos fetales humanos) se han trasplantado en la médula espinal de ratones afectados por una lesión medular o por una mutación que provoca una mielinización defectuosa; se escogieron ratones inmunodeficientes y de este modo no rechazaban las células implantadas. Más tarde, dichas células dieron lugar tanto a neuronas que conectaron con las neuronas del huésped, como oligodendrocitos que formaron nuevas vainas de mielina alrededor de los axones desmielinizados. Como resultado, los ratones huésped recuperaron un cierto control sobre sus limbos.

Estos descubrimientos sustentan la esperanza de que, a pesar de la extraordinaria complejidad de los tipos de neuronas y de las conexiones neuronales, se puedan utilizar las células madre neuronales por lo menos para reparar determinados tipos de lesiones y enfermedades del sistema nervioso central.

En el adulto las células madre son específicas de cada tejido

Cuando se extraen células del organismo y se mantienen en cultivo o se trasplantan de una zona del cuerpo a otra, como acabamos de describir en los procedimientos anteriores, por lo general las células trasplantadas permanecen completamente fieles a sus orígenes. Los queratinocitos continúan comportándose como queratinocitos, las células hematopoyéticas como células hematopoyéticas, las células nerviosas como células nerviosas, y así sucesivamente. Es cierto que si las células diferenciadas se sitúan en un entorno inadecuado, dejan de presentar el conjunto normal completo de características diferenciadas y las células madre pueden perder su característica de células madre y diferenciarse; pero no inician



Figura 23–67 Regeneración de un miembro en el tritón. Secuencia de intervalos de tiempo donde se observa el proceso de regeneración de un miembro amputado a nivel del húmero, en un axolote. La secuencia muestra la reparación de la herida, la desdiferenciación, el blastema y los estadios de rediferenciación y regeneración. El intervalo total de tiempo es aproximadamente de 20-30 días. (Cortesía de Susan Bryant y David Gardiner).

la expresión de características de otro tipo celular radicalmente distinto. De este modo, cada tipo de célula especializada tiene una memoria de su historial de desarrollo y queda determinada en su destino especializado. Pueden tener lugar unas cuantas transformaciones, como en el caso de la familia de células del tejido conjuntivo, y algunas células madre pueden generar diversos tipos de células diferenciadas, aunque las posibilidades son restringidas. Cada tipo de células madre sirve para la renovación de un tipo particular de tejido.

Obviamente, las oportunidades reales serían mucho mayores si las células madre fueran más versátiles y no tan especializadas –si pudiéramos extraerlas de un tipo de tejido en el que fuesen accesibles con facilidad y utilizarlas para reparar un tejido distinto, donde fueran necesarias. En la década anterior hubo una gran conmoción en relación a las informaciones sobre células madre de tejidos especializados que, en determinadas circunstancias, pueden presentar una asombrosa plasticidad de desarrollo, dando lugar a tipos celulares radicalmente distintos, por ejemplo, de células madre hematopoyéticas a neuronas o de células madre neuronales a músculo. Sin embargo, la validez de estos descubrimientos ha sido objeto de debate y quedan por dilucidar algunas evidencias importantes. Por ejemplo, en muchas situaciones evidentes de este tipo de iniciación del destino celular, parece que en realidad son el resultado de procesos de fusión celular, mediante los cuales los núcleos de un tipo de células especializadas entran en contacto con el citoplasma de otro tipo celular y, como consecuencia, activan un conjunto distinto de genes. En cualquier caso, la mayor parte de los estudios sobre interconversiones entre estirpes celulares adultas radicalmente diferentes concuerdan en que son procesos poco comunes. Mientras continúa la investigación sobre estas formas extremas de plasticidad en las células madre, aún se desconoce cómo suceden este tipo de interconversiones directas a una escala lo bastante grande o fiable para su aplicación en la práctica médica.

Esta constatación no significa que la transformación radical de células desde un carácter diferenciado a otro sea un sueño imposible o que no se puedan encontrar las vías adecuadas para conseguirlo. En realidad, algunas especies de no mamíferos regeneran tejidos y órganos perdidos mediante interconversiones de este tipo. Por ejemplo, un tritón puede regenerar un miembro amputado mediante un proceso en el que parece que las células diferenciadas revierten a un carácter embrionario y recapitulan el desarrollo embrionario. En el muñón del miembro amputado, las células musculares reinician el ciclo celular, se desdiferencian y se disgregan como células mononucleadas; estas células proliferan formando un brote similar al de un miembro embrionario y ocasionalmente se rediferencian en la serie de tipos celulares necesarios para reconstruir la región perdida del miembro (**Figura 23–67**). Por qué un tritón puede controlar este proceso –así como muchos otros extraordinarios procesos de regeneración– y en cambio un mamífero no puede, sigue siendo un gran misterio.

Las células ES pueden formar cualquier parte del cuerpo

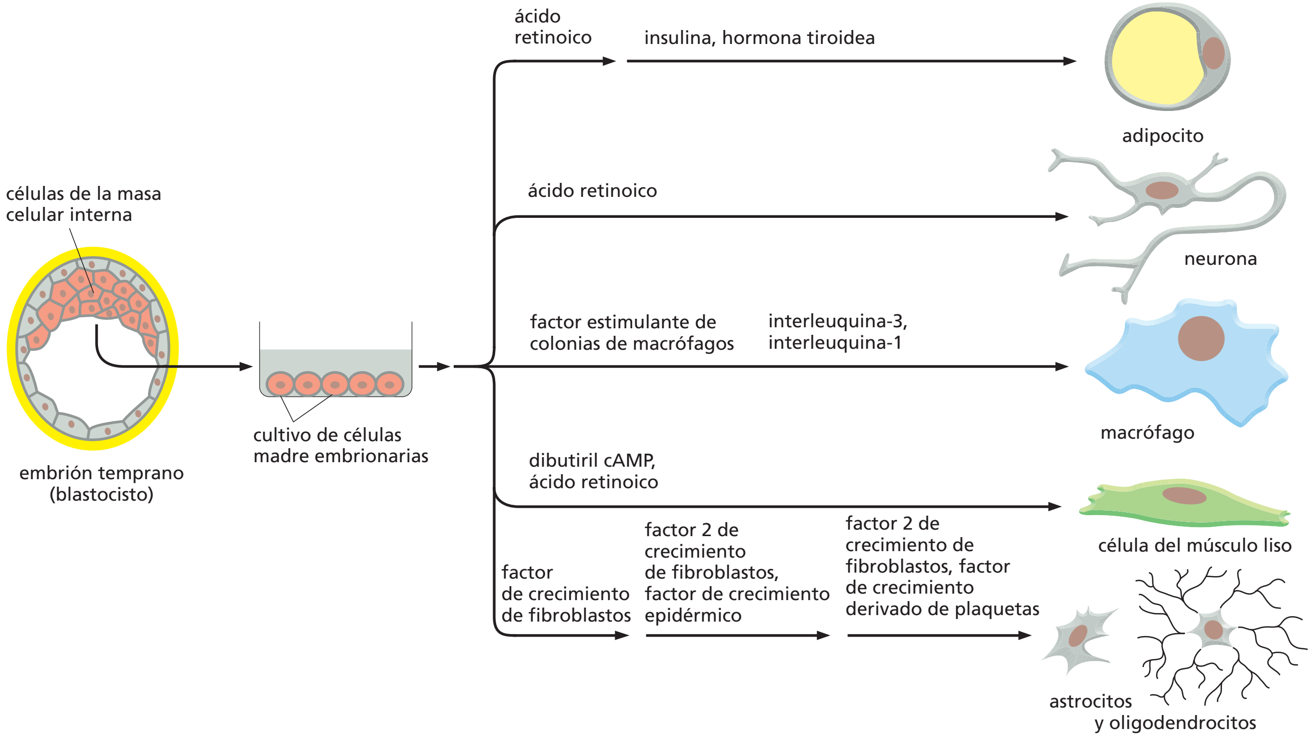
Mientras que las células madre de los tejidos adultos de mamíferos parecen ser bastante restrictivas en cuanto a su actuación, otro tipo de célula madre de los mamíferos es extraordinariamente versátil. Como se describió en los Capítulos 8 y 22, es posible, mediante cultivo celular de un embrión temprano de ratón, en estadio de blastocisto, obtener un tipo de células madre denominadas **células madre embrionarias** o **células ES** (*embryonic stem cells*). Las células ES pueden mantenerse proliferando de forma indefinida en cultivo conservando un amplio potencial de desarrollo. Si estas células ES se vuelven a situar en un blastocisto, quedan incorporadas al embrión y pueden dar lugar a todos los tipos de tejidos y de células

del organismo, incluyendo las células germinales, integrándose a la perfección en cualquier sitio donde se encuentren, adoptando el carácter y el comportamiento que mostrarían las células normales en este mismo lugar. Podemos considerar el desarrollo en términos de una serie de opciones que se van planteando a las células a medida que avanzan por la vía que conduce desde el óvulo fecundado hasta la diferenciación terminal. Después de una larga permanencia en el cultivo, las células ES y su descendencia todavía pueden seguir las señales de cada bifurcación de la vía y responder tal como lo harían las células embrionarias normales. Sin embargo, si las células ES se implantan directamente en un embrión en estado avanzado o en un tejido adulto, no llegan a recibir la secuencia apropiada de señales; su diferenciación no estará controlada de forma apropiada y a menudo dan lugar a un tumor.

En la actualidad, se pueden generar células con propiedades similares a las de las células ES de ratón, a partir de embriones humanos tempranos y de ovarios y testículos fetales humanos, lo que constituye una fuente potencialmente inagotable de células que se pueden utilizar en la sustitución y reparación de tejidos humanos maduros lesionados. Aunque puedan plantearse objeciones éticas en cuanto a la utilización de embriones humanos, merece la pena considerar las posibilidades que se abren ante nosotros. Dejando a un lado el sueño del crecimiento completo de órganos a partir de las células ES mediante una recapitulación del desarrollo embrionario, los experimentos realizados en ratones sugieren que en un futuro cercano sería posible utilizar las células ES para reemplazar las fibras musculares esqueléticas degeneradas en pacientes con distrofia muscular, las células nerviosas que mueren en pacientes con enfermedad de Parkinson, las células secretoras de insulina que faltan en la diabetes de tipo I, las células musculares del corazón que mueren en un ataque al corazón, etc.

Si se utilizan las células ES para este tipo de reparación de tejidos, primero tienen que estar situadas en la vía de desarrollo deseado. De hecho, se puede inducir a las células a diferenciarse en una gran variedad de tipos celulares en cultivo (**Figura 23–68**) mediante un tratamiento apropiado de combinaciones entre proteínas señal y factores de crecimiento. <GGAA> Por ejemplo, pueden utilizarse para generar nanoesferas y células madre neuronales. Las células madre neuronales derivadas de las células ES de ratón, igual que las células derivadas del tejido cerebral, pueden ser implantadas en el cerebro de un ratón huésped adulto, donde se diferenciarán para dar lugar a neuronas y células de la glía. Si el huésped es deficiente en oligodendrocitos formadores de mielina, un implante de células ES derivadas de oligodendrocitos precursores corregiría la deficiencia mediante el suministro de las vainas de mielina a los axones que carecen de ella.

Figura 23–68 Producción de células diferenciadas a partir de un cultivo de células ES de ratón. Las células ES derivadas de un embrión temprano de ratón pueden mantenerse indefinidamente en un cultivo en monocapa o dejar que formen agregados denominado cuerpos embrioides, en los cuales las células empiezan su especialización. Así, las células de los cuerpos embrioides, cultivadas en medios a los que se ha añadido distintos factores, pueden llegar a diferenciarse a través de distintas vías. (Basado en E. Fuchs y J.A. Segre, *Cell* 100: 143-155, 2000. Con la autorización de Elsevier.)



Las células ES específicas de un paciente podrían resolver el problema del rechazo inmunitario

Quedan por resolver muchos problemas antes de que se puedan utilizar las células ES para la reparación de tejidos en pacientes. Uno de los más serios, y que limita también la utilización de células madre adultas, es el del rechazo inmunitario. Si las células ES derivadas de un determinado genotipo se implantan en un individuo genéticamente distinto, las células implantadas probablemente sean rechazadas como extrañas por el sistema inmune. Se han desarrollado distintas formas de abordar este problema utilizando fármacos inmunosupresores para trasplantar órganos como el corazón y el riñón, pero distan de ser perfectos.

Para evitar totalmente problemas inmunológicos, necesitamos células implantadas que sean idénticas en términos genéticos a las del huésped. Por tanto, ¿cómo se pueden producir células ES con fines terapéuticos, con el mismo genotipo de un paciente adulto que necesita un trasplante? Tal como se describió en el Capítulo 8, una posible vía es la de *transferencia nuclear de una célula somática*. En dicho procedimiento –todavía no completado con células humanas, a pesar de las falsas esperanzas– se extraería el núcleo de una célula somática del paciente y se inyectaría en un oocito proporcionado por un donante (por lo general, una mujer que no sea el paciente), reemplazando el núcleo original del oocito. A partir de este oocito híbrido, se podría obtener un blastocisto y, a partir de éste, las células ES. Dichas células y su estirpe contendrían el genoma nuclear del paciente y, en principio, podrían trasplantarse sin riesgo de rechazo inmune. Pero el procedimiento completo implica muchas dificultades y queda un largo recorrido hasta que pueda utilizarse como tratamiento.

Sería preferible que se pudieran obtener las células del paciente adulto y convertirlas a un carácter similar a las ES de forma directa mediante manipulación de la expresión génica. El primer paso en este sentido consiste en identificar los principales determinantes del carácter de célula ES –las proteínas reguladoras originales que especifican este carácter, si es que existen. Comparaciones bioquímicas de células ES con otros tipos celulares sugieren un conjunto de candidatos para esta función. Estos candidatos se pueden comprobar mediante la introducción de construcciones de DNA apropiado en células diferenciadas, como los fibroblastos, que puedan mantenerse en cultivo. Parece que una combinación de dichos transgenes que codifican un conjunto de cuatro proteínas reguladoras génicas (Oct3/4, Sox2, Myc y Klf4), consiguen la conversión de fibroblastos en células con propiedades similares a las ES, incluyendo su capacidad para diferenciarse en diversas vías. La velocidad de conversión es baja– sólo se activan una pequeña proporción de fibroblastos que contienen los transgenes – y las células transformadas son distintas de las verdaderas células ES. No obstante, estos experimentos muestran una posible vía hacia la producción de células con posibilidad de convertirse en células similares a las ES, a partir de células somáticas adultas.

Las células ES son útiles para el descubrimiento de fármacos y el estudio de enfermedades

Si bien el trasplante de células derivadas de las ES para el tratamiento de enfermedades en el hombre todavía parece un futuro lejano, hay otras vías en que las células ES prometen ser válidas de forma inmediata. Pueden utilizarse para generar cultivos de grandes poblaciones homogéneas de células diferenciadas de un tipo específico y pueden servir para comprobar los efectos de numerosos compuestos químicos en la búsqueda de nuevos fármacos que actúen sobre tipos celulares humanos. Además, gracias a las técnicas que acabamos de describir, existe la posibilidad de generar células similares a las ES que contengan los genomas de pacientes afectados por una determinada enfermedad genética y utilizar dichas células madre específicas del paciente para el descubrimiento de fármacos útiles en el tratamiento de aquella enfermedad. Estas células podrían ser aplicables también al análisis del mecanismo de la enfermedad. Y a un nivel más básico, las manipulaciones de cultivos de células ES podrían contribuir a la comprensión de algunos de los misterios no resueltos de la biología de las células madre.

Es necesario resolver serias cuestiones éticas y salvar enormes problemas técnicos antes de que la tecnología de células madre pueda aportarnos todas las ventajas que esperamos. Pero por uno u otro camino parece que la biología celular está empezando a ofrecer nuevas oportunidades para mejorar los mecanismos naturales de reparación de tejidos.

Resumen

Las células madre pueden manipularse artificialmente y utilizarse tanto para el tratamiento de enfermedades como para otros fines, como el descubrimiento de fármacos. Por ejemplo, algunos tipos de células madre se pueden transfundir a pacientes con leucemia para sustituir al sistema hematopoyético enfermo, y células madre epidérmicas, extraídas de una zona de la piel no lesionada de un paciente con abundantes quemaduras, pueden ser mantenidas en cultivo y trasplantadas de nuevo para reconstruir una epidermis que cubra las quemaduras. Las células madre neuronales pueden derivar de algunas regiones del cerebro de un feto o de un mamífero adulto y cuando se trasplantan a un cerebro lesionado pueden diferenciarse en neuronas y en células de la glía que llegan a integrarse en el tejido del huésped y contribuyen a una reparación parcial, como mínimo en los estudios de carácter experimental sobre animales.

En el organismo de un adulto normal, cada tipo de célula madre da lugar a una serie restringida de tipos celulares diferenciados. Aunque existen diversos estudios sobre la plasticidad de las células madre que discrepan sobre dichas restricciones, las evidencias continúan siendo polémicas. Sin embargo, las células madre embrionarias (células ES) son capaces de diferenciarse en cualquier tipo celular del organismo y en un cultivo pueden ser inducidas a diferenciarse en distintos tipos celulares. Por ejemplo, a partir de células ES es posible generar líneas de células madre neuronales que proliferen indefinidamente como cultivos puros de células madre, aunque puedan responder en cualquier momento a un cambio apropiado de las condiciones de cultivo diferenciándose en neuronas y células de la glía. Se están desarrollando métodos para generar células similares a las ES a partir de células de tejidos adultos. En principio, dichas células similares a las ES, portadoras del genoma de un paciente concreto, podrían ser utilizadas para la reparación de tejidos y evitar así el problema del rechazo inmunitario. De forma más inmediata, proporcionan una valoración del crecimiento in vitro *en investigaciones sobre la fisiología y farmacología de células con genotipo normal o patológico y en el descubrimiento de fármacos que actúan sobre dichas células.*

BIBLIOGRAFÍA

General

Fawcett DW (1994) Bloom and Fawcett: A Textbook of Histology, 12.ª ed. New York/London: Arnold/Chapman & Hall.
Kerr JB (1999) Atlas of Functional Histology. London: Mosby.
Lanza R, Gearhart J, Hogan B et al (eds) (2004). Handbook of Stem Cells. Amsterdam: Elsevier.
Young B, Lowe JS, Stevens A & Heath JW (2006) Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas, 5.ª ed. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier.

La epidermis y su renovación mediante células madre

Fuchs E (2007) Scratching the surface of skin development. *Nature* 445:834–842.
Imagawa W, Yang J, Guzman R & Nandi S (1994) Control of mammary gland development. In The Physiology of Reproduction (Knobil E & Neill JD eds), 2nd ed, pp 1033–1063. New York: Raven Press.
Ito M, Yang Z, Andl T et al (2007) Wnt-dependent *de novo* hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature* 447:316–320.
Jacinto A, Martinez-Arias A & Martin P (2001) Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nature Cell Biol* 3:E117–123.
Jensen UB, Lowell S & Watt FM (1999) The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development* 126:2409–2418.
Prince JM, Klinowska TC, Marshman E et al (2002) Cell-matrix interactions during development and apoptosis of the mouse mammary gland *in vivo*. *Dev Dyn* 223:497–516.
Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ et al (2006) Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439:84–88.
Shinin V, Gayraud-Morel B, Gomes D & Tajbakhsh S (2006) Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nature Cell Biol* 8:677–687.
Stanger BZ, Tanaka AJ & Melton DA (2007) Organ size is limited by the number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not the liver. *Nature* 445:886–891.
Steinert PM (2000) The complexity and redundancy of epithelial barrier function. *J Cell Biol* 151:F5–F8.
Watt FM, Lo Celso C & Silva-Vargas V (2006) Epidermal stem cells: an update. *Curr Opin Genet Dev* 16:518–524.

Los epitelios sensoriales

Axel R (2005) Scents and sensibility: a molecular logic of olfactory perception (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 44:6110–6127.
Buck LB (2000) The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals. *Cell* 100:611–618.
Howard J & Hudspeth AJ (1988) Compliance of the hair bundle associated with gating of mechanoelectrical transduction channels in the bullfrog's saccular hair cell. *Neuron* 1:189–199.
Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K et al (2005) Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nature Med* 11:271–276.
Masland RH (2001) The fundamental plan of the retina. *Nature Neurosci* 4:877–886.
Mombaerts P (2006) Axonal wiring in the mouse olfactory system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:713–737.
Mombaerts P, Wang F, Dulac C et al (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87:675–686.
Morrow EM, Furukawa T & Cepko CL (1998) Vertebrate photoreceptor cell development and disease. *Trends Cell Biol* 8:353–358.
Pazour GJ, Baker SA, Deane JA et al (2002) The intraflagellar transport protein, IFT88, is essential for vertebrate photoreceptor assembly and maintenance. *J Cell Biol* 157:103–113.
Stone JS & Rubel EW (2000) Cellular studies of auditory hair cell regeneration in birds. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11714–11721.
Vollrath MA, Kwan KY & Corey DP (2007) The micromachinery of mechanotransduction in hair cells. *Annu Rev Neurosci* 30:339–365.

Las vías respiratorias y el intestino

Batlle E, Henderson JT, Beghtel H et al (2002) Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 111:251–263.
Bjerknes M & Cheng H (1999) Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* 116:7–14.
Crosnier C, Stamataki D & Lewis J (2006) Organizing cell renewal in the

intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Rev Genet* 7:349–359.
Dor Y, Brown J, Martinez OI & Melton DA (2004) Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429:41–46.
Fre S, Huyghe M, Mourikis P et al (2005) Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* 435:964–968.
Haramis AP, Begthel H, van den Born M et al (2004) *De novo* crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* 303:1684–1686.
Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE et al (2005) Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 121:823–835.
Li L & Xie T (2005) Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:605–631.
Sancho E, Batlle E & Clevers H (2004) Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:695–723.
Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ et al (2004) Loss of Apc *in vivo* immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev* 18:1385–1390.
Taub R (2004) Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5:836–847.
van Es JH, van Gijn ME, Riccio O et al (2005) Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 435:959–963.

Los vasos sanguíneos, los vasos linfáticos y las células endoteliales

Adams RH (2003) Molecular control of arterial-venous blood vessel identity. *J Anat* 202:105–112.
Carmeliet P & Tessier-Lavigne M (2005) Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 436:193–200.
Folkman J & Haudenschild C (1980) Angiogenesis in vitro. *Nature* 288:551–556.
Folkman J (1996) Fighting cancer by attacking its blood supply. *Sci Am* 275:150–154.
Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M et al (2003) VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 161:1163–1177.
Hellstrom M, Phng LK, Hofmann JJ et al (2007) Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 445:776–780.
Lawson ND & Weinstein BM (2002) In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol* 248:307–318.
Lindahl P, Johansson BR, Leveen P & Betsholtz C (1997) Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 277:242–245.
Oliver G & Alitalo K (2005) The lymphatic vasculature: recent progress and paradigms. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:457–483.
Pugh CW & Ratcliffe PJ (2003) Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature Med* 9:677–684.

Renovación mediante células madre pluripotenciales: formación de células sanguíneas

Allsopp RC, Morin GB, DePinho R, Harley CB & Weissman IL (2003) Telomerase is required to slow telomere shortening and extend replicative lifespan of HSCs during serial transplantation. *Blood* 102:517–520.
Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW et al (2003) Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425:841–846.
Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM et al (2004) Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* 431:1002–1007.
Metcalf D (1980) Clonal analysis of proliferation and differentiation of paired daughter cells: action of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on granulocyte-macrophage precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:5327–5330.
Metcalf D (1999) Stem cells, pre-progenitor cells and lineage-committed cells: are our dogmas correct? *Annu NY Acad Sci* 872:289–303.
Orkin SH (2000) Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nature Rev Genet* 1:57–64.
Reya T, Duncan AW, Ailles L et al (2003) A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423:409–414.
Shizuru JA, Negrin RS & Weissman IL (2005) Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. *Annu Rev Med* 56:509–538.
Wintrobe MM (1980) Blood, Pure and Eloquent. New York: McGraw-Hill.

Génesis, modulación y regeneración del músculo esquelético

Andersen JL, Schjerling P & Saltin B (2000) Muscle, genes and athletic performance. *Sci Am* 283:48–55.
Bassel-Duby R & Olson EN (2006) Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem* 75:19–37.
Buckingham M (2006) Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 16:525–532.
Collins CA, Olsen I, Zammit PS et al (2005) Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 122:289–301.
Lee SJ (2004) Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:61–86.
Weintraub H, Davis R, Tapscott S et al (1991) The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 251:761–766.

Los fibroblastos y sus transformaciones: la familia de las células del tejido conjuntivo

Benya PD & Shaffer JD (1982) Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30:215–224.
Day TF, Guo X, Garrett-Beal L & Yang Y (2005) Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 8:739–750.
Flier JS (2004) Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116:337–350.
Glass DA, Bialek P, Ahn JD et al (2005) Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 8:751–764.
Karsenty G & Wagner EF (2002) Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* 2:389–406.
Kronenberg HM (2003) Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423:332–336.
Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143–147.
Rinn JL, Bondre C, Gladstone HB, Brown PO & Chang HY (2006) Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS Genet* 2:e119.
Rosen ED & Spiegelman BM (2006) Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444:847–853.
Schafer M & Werner S (2007) Transcriptional control of wound repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* in press.
Seeman E & Delmas PD (2006) Bone quality—the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med* 354:2250–2261.
Zelzer E & Olsen BR (2003) The genetic basis for skeletal diseases. *Nature* 423:343–348.

Ingeniería de las células madre

Brockes JP & Kumar A (2005) Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine. *Science* 310:1919–1923.
Brustle O, Jones KN, Learish RD et al (1999) Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 285:754–756.
Conti L, Pollard SM, Gorba T et al (2005) Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol* 3:e283.
Eggan K, Baldwin K, Tackett M et al (2004) Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature* 428:44–49.
Lee TI, Jenner RG, Boyer LA et al (2006) Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 125:301–313.
Ming GL & Song H (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28:223–250.
Okita K, Ichisaka T & Yamanaka S (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* in press.
Raff M (2003) Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:1–22.
Schulz JT, 3rd,Tompkins RG & Burke JF (2000) Artificial skin. *Annu Rev Med* 51:231–244.
Suhonen JO, Peterson DA, Ray J & Gage FH (1996) Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons *in vivo*. *Nature* 383:624–627.
Wagers AJ & Weissman IL (2004) Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116:639–648.

Patógenos, infección e inmunidad innata

24

En la actualidad, las enfermedades infecciosas y parasitarias causan la tercera parte de las muertes de la especie humana, lo que representa un porcentaje mayor que el conjunto de todas las formas de cáncer. A la alta prevalencia que presentan enfermedades antiguas, tales como tuberculosis y malaria, continuamente se añaden nuevas enfermedades infecciosas como el *sida* (*síndrome de inmunodeficiencia adquirida*), la actual pandemia (epidemia mundial), que ya ha producido un total de 25 millones de muertes. Además, algunas enfermedades que parecían tener otras causas, ahora se asocian con infecciones. Así, por ejemplo, la mayoría de las úlceras gástricas no son producidas por el estrés o por la comida picante, como se creía, sino por la infección producida por *Helicobacter pylori* en el estómago.

Por otra parte, las enfermedades infecciosas no presentan una distribución geográfica uniforme, sino que se concentran en las regiones más pobres. Así, con frecuencia, existe una correlación entre la prevalencia de las enfermedades infecciosas y la deficiencia en la sanidad pública y los sistemas públicos de salud, los cuales a menudo se encuentran asociados a desastres naturales o agitaciones políticas. Sin embargo, otras enfermedades infecciosas se desarrollan sobre todo o exclusivamente en los países industrializados: la legionelosis, propagada a través de los sistemas de aire acondicionado, constituye un ejemplo reciente de este tipo de enfermedades.

La humanidad siempre se ha mostrado a la vez preocupada y fascinada por las enfermedades infecciosas. Las descripciones más antiguas sobre el control de la transmisión de la rabia datan de hace más de 3000 años, aunque no ha sido hasta la mitad del siglo XIX cuando médicos y científicos han hecho un esfuerzo por identificar los agentes causantes de las infecciones, denominados colectivamente **patógenos**. Con el advenimiento de la genética microbiana y la biología celular y molecular, se ha incrementado en gran medida el conocimiento de las causas y mecanismos que subyacen a las enfermedades infecciosas. Así, sabemos que con frecuencia estos patógenos aprovechan las características biológicas de las células del huésped para infectarlas. Este conocimiento no sólo aporta nuevos puntos de vista sobre la biología de las células, sino también sobre nuevas estrategias para el tratamiento y la prevención de las enfermedades infecciosas.

En un mundo rebosante de sutiles patógenos hostiles que evolucionan con rapidez, ¿cómo pueda sobrevivir la frágil especie humana que evoluciona además tan lentamente? A semejanza de otros organismos pluricelulares, hemos desarrollado mecanismos que nos permiten resistir las infecciones de patógenos. En primer lugar las barreras físicas, tales como nuestra resistente capa externa de la piel o las asociadas a defensas químicas, como el ácido del estómago, impiden que los microorganismos (microbios) lleguen a contactar con los tejidos estériles de nuestro organismo. En segundo lugar, cada una de nuestras células posee algunas capacidades intrínsecas; por ejemplo, las células degradan eficientemente moléculas de RNA de doble cadena, que constituyen el sello de ciertos tipos de infecciones víricas. Para combatir especialmente a aquellos patógenos que atraviesan estas defensas, los vertebrados utilizan dos tipos de defensa inmune, llevadas a cabo por proteínas y células especializadas: las **respuestas inmunitarias innatas**, activadas inmediatamente tras el inicio de una infección y que no dependen de una exposición previa del huésped al agente patógeno, y las **respuestas inmunitarias adquiridas**, más poderosas y que actúan más tarde en el proceso infeccioso, y que son muy específicas para el agente patógeno concreto que las ha inducido.

Este capítulo se inicia con una visión general de los diferentes tipos de organismos patógenos. Posteriormente describiremos la biología celular de la infección y, finalmente, consideraremos las barreras contra la infección y la inmunidad innata. La inmunidad adquirida se trata en el Capítulo 25.

En este capítulo

INTRODUCCIÓN A LOS AGENTES PATÓGENOS 1486

BIOLOGÍA CELULAR DE LA INFECCIÓN 1501

EL SISTEMA INMUNITARIO INNATO Y LAS BARRERAS FRENTE A LA INFECCIÓN 1525

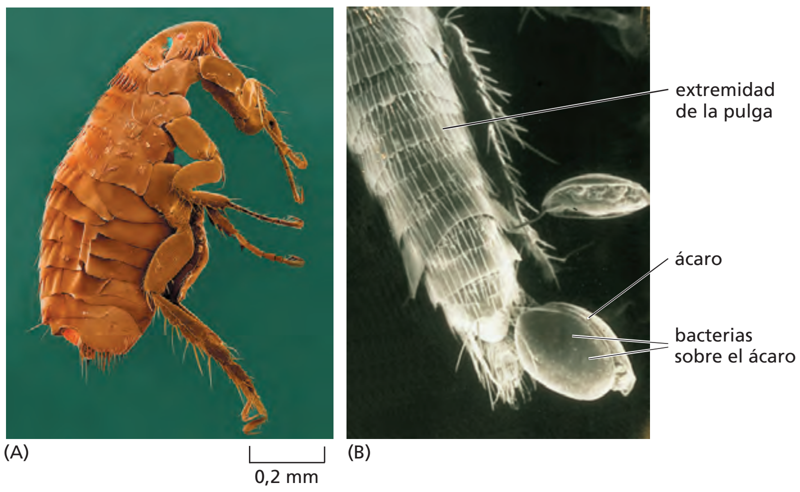


Figura 24–1 Parasitismo a diferentes niveles. (A) Electromicrografía de una pulga obtenida con el microscopio electrónico de barrido. Se trata de un parásito común de mamíferos, como perros, gatos, ratas y hombre, a los cuales chupa la sangre. Sus picaduras transmiten la peste bubónica al transportar la bacteria patógena *Yersinia pestis* desde la sangre de un huésped infectado a otro sano. (B) Imagen ampliada de una extremidad de la pulga, en la que se observa que ella también está parasitada, en este caso por ácaros. Estos ácaros, a su vez, están cubiertos por bacterias. Es probable que los *bacteriófagos*, que son virus bacterianos, también parasiten estas bacterias.

Una observación similar fue realizada por Jonathan Swift en 1733: "Así, observan los naturalistas, que una pulga tiene pequeñas pulgas que de ella viven; y éstas, otras más pequeñas que les pican; y así, *ad infinitum*". (A, cortesía de Tina Carvalho/MicroAngela; B, cortesía de Stanley Falkow.)

INTRODUCCIÓN A LOS AGENTES PATÓGENOS

Por lo general pensamos en los agentes patógenos como invasores hostiles que atacan nuestros organismos. Pero un agente patógeno o un parásito, igual que cualquier otro organismo, sólo cumple con su mandato biológico de vivir y proliferar. Vivir a expensas de un organismo es una estrategia muy efectiva y, posiblemente, cualquiera de las formas de vida padece algún tipo de infección o parasitismo (**Figura 24–1**). Un huésped humano constituye un ambiente caliente, rico en nutrientes y húmedo, que permanece a una temperatura uniforme y que está en constante renovación. Por lo tanto no es extraño que muchos microorganismos hayan desarrollado la habilidad de sobrevivir y reproducirse en este envidiable nicho. En esta sección se describen algunas de las características comunes que los microorganismos deben tener para ser contagiosos. Luego exploraremos la amplia variedad de organismos que producen enfermedades en la especie humana.

Los agentes patógenos han desarrollado mecanismos específicos de interacción con sus huéspedes

El cuerpo humano es un complejo y próspero ecosistema. Está constituido por unas 10^{13} células y, además, también alberga alrededor de 10^{14} células de origen bacteriano, hongos e incluso protozoos que representan miles de especies de microorganismos. Estos microorganismos comensales, denominados en conjunto **flora normal**, están habitualmente confinados en ciertas áreas del organismo como la piel, la boca, el intestino grueso o la vagina. La flora normal no está constituida por parásitos que simplemente colonizan el ecosistema que representa nuestro organismo, sino que también contribuye a nuestra salud. Las bacterias anaeróbicas que colonizan nuestro intestino contribuyen a la digestión de los alimentos y son esenciales para el correcto desarrollo del intestino en los niños. La flora normal de la piel y otros órganos también nos ayudan compitiendo con organismos en potencia patógenos. Además, la especie humana está infectada de forma permanente por virus, aunque en raras ocasiones son perceptibles.

Si es tan normal para nosotros convivir con una amplia variedad de microorganismos, ¿cómo es posible que algunos de ellos sean capaces de causarnos enfermedades o incluso la muerte? Esta pregunta tiene varias respuestas y debe considerarse que la capacidad de que dispone un determinado microorganismo para causar un daño evidente y desarrollar una enfermedad en un determinado huésped depende en gran parte de elementos externos. Los **patógenos primarios**, que son los causantes de enfermedades en individuos sanos, son diferentes a la flora normal. Difieren de los organismos comensales en su capacidad para romper las barreras y sobrevivir en lugares donde los otros microorganismos no pueden hacerlo. Así, los microorganismos que nos colonizan por lo general sólo provocan problemas cuando nuestro sistema inmunitario está debilitado o si acceden a una parte del organismo estéril, como cuando tras una perforación del intestino la flora accede a la cavidad del peritoneo y provoca una *peritonitis*; en ocasiones, también pueden inducir una enfermedad si nuestra

respuesta inmune es inadecuadamente fuerte. Por el contrario, los agentes patógenos no requieren un huésped demasiado comprometido o enfermo. Los patógenos primarios han desarrollado mecanismos altamente especializados para cruzar barreras tanto celulares como bioquímicas e inducir respuestas específicas del organismo que contribuyan a la supervivencia y la proliferación del patógeno. Para algunos patógenos, estos mecanismos se han adaptado a un único tipo de huésped, mientras que en otros son lo bastante generales que permiten al patógeno infectar, sobrevivir y proliferar en una gran variedad de huéspedes.

Algunos patógenos son causantes de infecciones epidémicas agudas y están obligados a diseminarse rápido de un huésped enfermo o muerto a otro, como es el caso de la peste bubónica y la viruela. Otros causan infecciones persistentes que permanecen durante años en un individuo sin dar lugar a ninguna enfermedad, como el virus de Epstein-Barr (que en algunos individuos puede causar mononucleosis, una enfermedad semejante a la gripe), la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (la cual puede causar la tuberculosis, una grave infección pulmonar) y el nematodo intestinal *Ascaris*. Aunque algunos de estos patógenos pueden afectar gravemente a algunos individuos, otros miles de millones ignoran que están infectados, transportándolos de una forma asintomática. Es difícil trazar un límite entre infección persistente y comensalismo. A lo largo de este capítulo se reconocerá la diversidad de patógenos e infecciones, centrándonos en los principios biológicos comunes a la mayoría de ellos.

Para sobrevivir y proliferar en un huésped, un agente patógeno ha de ser capaz de: (1) colonizarlo; (2) encontrar un nicho nutritivamente compatible en el huésped; (3) evitar, subvertir o engañar a las respuestas inmunitarias tanto innatas como adquiridas del huésped; (4) reproducirse utilizando los recursos del huésped, y (5) abandonar el huésped antiguo y colonizar uno nuevo. Bajo la tremenda presión selectiva que implica el inducir un único conjunto de respuestas del huésped que permitan cumplir las condiciones antedichas, los organismos patógenos han desarrollado mecanismos que maximizan el aprovechamiento de las características biológicas de sus huéspedes. Así, muchos de estos agentes patógenos son en términos metafóricos, hábiles y prácticos “biólogos celulares”, de los que podemos aprender mucha biología celular observándolos detenidamente.

Al mismo tiempo, nuestra exposición constante a los agentes patógenos ha influenciado en gran medida la evolución humana. El desarrollo del preciso sistema de inmunidad adquirida en los vertebrados, descrito en el Capítulo 25, constituyó una importante escalada en la carrera de armamentos que desde siempre ha existido entre los agentes patógenos y sus huéspedes. Actualmente, la especie humana ha subido la apuesta mediante la modificación deliberada de nuestro comportamiento al limitar la capacidad infectiva de los patógenos. En los últimos siglos, las mejoras en la salud pública, como el alcantarillado y el suministro de agua potable, han contribuido al descenso gradual en la frecuencia de las muertes por enfermedades infecciosas. Las sociedades que han dedicado recursos a la mejora de la alimentación infantil se han beneficiado de una mejora en la salud a lo que se añade la importante disminución de la mortalidad infantil debida a la infección. Las intervenciones médicas como la vacunación, el uso de fármacos antibióticos y los análisis hematológicos rutinarios previos a las transfusiones sanguíneas, han disminuido de manera notable el impacto de la infección en la especie humana. A medida que aprendamos más acerca de los mecanismos por los cuales los microorganismos causan una enfermedad (patogénesis), nuestros cerebros irán constituyendo cada vez más una importante extensión de nuestros sistemas inmunitarios en el combate contra las enfermedades infecciosas.

Los signos y síntomas de una infección pueden deberse tanto al agente infeccioso como a las respuestas del huésped

Aunque podemos entender fácilmente que los microorganismos infecciosos evolucionan para poder proliferar en un huésped, es menos evidente por qué evolucionan para causar una enfermedad, es decir, causar daño a sus huéspedes. Una explicación puede ser que, en algunos casos, las respuestas patológicas provocadas por los microorganismos aumentan la eficiencia de su diseminación o propagación y, por lo tanto, representan una clara ventaja selectiva para el agente patógeno. Así, por ejemplo, en los órganos genitales la infección por *Herpes simplex* produce ampollas repletas de virus que, durante el contacto sexual, facilitan la transmisión de la enfermedad desde el huésped infectado a otro sano. De manera semejante, las infecciones que producen diarreas se propagan eficazmente desde el paciente al personal que lo atiende. En otros muchos casos, sin embargo, la inducción de la enfermedad

no tiene ventaja aparente para el agente patógeno. En cambio, algunas de las respuestas a la infección, como el aletargamiento y el alejamiento de las interacciones sociales, parecen dificultar la propagación del patógeno. De esta forma, las personas infectadas pueden evitar de manera altruista el contagio de amigos y familiares y, de igual manera, los individuos sanos pueden evitar conscientemente la enfermedad; un comportamiento semejante a éste ha sido descrito en las langostas marinas. Todas ellas pueden ser respuestas adquiridas seleccionadas en poblaciones de huéspedes con costumbres gregarias.

Muchos de los síntomas y signos que asociamos con una enfermedad contagiosa son, finalmente, manifestaciones de las respuestas inmunitarias del huésped. Algunos signos característicos de una infección bacteriana, incluyendo la hinchazón, el enrojecimiento en el lugar de infección y la producción de pus (constituido, sobre todo, por leucocitos muertos) son el resultado de la actividad de las células del sistema inmunitario frente a los microorganismos invasores. La fiebre también es una respuesta defensiva, ya que parece que el incremento de la temperatura del organismo inhibe la proliferación de algunos microorganismos. En casos extremos, las consecuencias más graves y dañinas de una enfermedad infecciosa están causadas por una respuesta inmunitaria excesiva: la masiva destrucción observada en casos de leishmaniosis (una infección causada por patógenos eucariotas del género *Leishmania*) es un buen ejemplo. En definitiva, el conocimiento de la biología de una enfermedad contagiosa precisa de la valoración de las contribuciones respectivas del patógeno y del huésped.

Para comprender las contribuciones relativas de los microorganismos infecciosos y el huésped en la producción de signos y síntomas de la enfermedad resulta de gran utilidad tener en cuenta la causa y la extensión del daño provocado en los tejidos del huésped durante una infección. Cada interacción entre un microorganismo y un huésped determinado es única y el resultado de ella depende del cambio constante en el paisaje que dibujan tanto la actividad microbiana como la función inmunitaria del huésped. La extensión del daño causado al huésped depende de la interacción entre estos factores. Un microorganismo en particular puede actuar habitualmente como un comensal inocuo o incluso beneficioso para la mayoría de las personas pero, en algunos casos, también puede causar una importante infección en individuos con una inmunidad debilitada. Así ocurre, por ejemplo, con un habitante habitual de la piel, *Staphylococcus epidermidis* (**Figura 24–2**A). Otros microorganismos, como el virus causante de las paperas, sólo causará un daño importante cuando se enfrenta a respuestas inmunitarias intensas (Figura 24–2B). Un apartado muy interesante y que ilustra bien la importancia de la interacción entre el huésped y los factores microbianos como causante de daño, es el hecho de que muchos patógenos causan graves enfermedades en personas con respuestas inmunitarias muy débiles o muy fuertes, pero poco o ninguno en individuos con respuestas inmunitarias intermedias (Figura 24–2C). Un excelente ejemplo de ello es la tuberculosis pulmonar, que habitualmente padecen entre 1 y 2 millones de personas en el mundo, aunque la mayoría lo ignoran, ya que sus sistemas inmunitarios contienen de manera eficiente la infección. Sin embargo, cuando una persona con una infección latente de *M. tuberculosis* se vuelve inmunodeficiente a consecuencia de un protocolo terapéutico o una infección por el virus de la inmunodeficiencia (HIV), el delicado equilibrio entre la bacteria y el sistema inmune se inclina hacia la bacteria, la cual puede replicarse de manera incontrolada dando lugar a una grave enfermedad que discurre por lo general con tos dolorosa y esputos sanguinolentos. Por el contrario, cuando se produce una respuesta sobredimensionada frente a *M. tuberculosis* puede dar lugar a una destrucción masiva de tejido pulmonar.

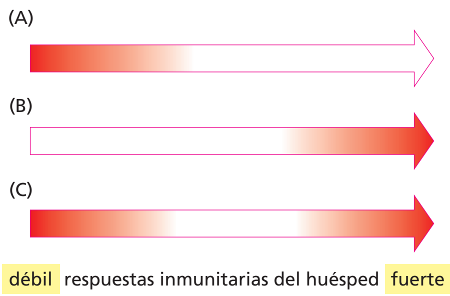


Figura 24–2 Interacción entre los microorganismos y las respuestas inmunitarias durante la patogénesis microbiana. La intensidad de las respuestas inmunitarias se incrementa en el sentido de las *flechas*, mientras que el alcance del daño ocasionado al huésped está indicado por la intensidad del *color rojo* de las mismas. (A) Los componentes de la flora normal, como la bacteria *Staphylococcus epidermidis* y el hongo *Pneumocystis carinii* tan sólo producen enfermedades cuando el sistema inmunitario está debilitado de manera anormal. (B) En el caso de algunos patógenos, como paramyxovirus, que causa las paperas y la bacteria *Chlamydia trachomatis*, agente causal de una enfermedad de transmisión sexual, es la respuesta inmunitaria más que el patógeno la principal responsable del daño tisular. (C) Los huéspedes con una respuesta inmunitaria normal pueden ser colonizados de manera asintomática por muchos patógenos, pero aquellos huéspedes que tienen respuestas inmunitarias demasiado intensas o demasiado débiles pueden sufrir graves daños o incluso la muerte. Muchos microorganismos se comportan de esta manera, como la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, el hongo *Aspergillus* y el virus herpes simple.

Los agentes patógenos son filogenéticamente diversos

Muchos tipos de agentes patógenos causan enfermedades a la especie humana. Los más familiares son virus y bacterias. Las infecciones víricas causan enfermedades que van desde el sida y la viruela hasta el resfriado común. Esencialmente son fragmentos de ácidos nucleicos (DNA o RNA) que codifican un número relativamente pequeño de productos génicos, que se hallan envueltos por una cubierta protectora de proteínas y (ocasionalmente) una membrana (**Figura 24–3**A). Los virus no disponen de capacidad para una actividad metabólica independiente y, por lo tanto, dependen por completo de la energía metabólica suministrada por el huésped. Así, utilizan la maquinaria de síntesis proteica de sus huéspedes para su propia replicación y muchos de ellos también dependen de su maquinaria de transcripción.

De todas las bacterias con las que interaccionamos, sólo unas cuantas son agentes patógenos primarios. Mucho más grandes y complejas que los virus, las bacterias son células generalmente libres, que realizan la mayor parte de las funciones metabólicas por sí mismas, dependiendo tan sólo del huésped para el aporte nutritivo (Figura 24–3B).

Otros agentes infecciosos son organismos eucariotas, desde hongos unicelulares y protozoos (Figura 24–3C) hasta metazoos complejos como los nematodos parásitos. Una de las enfermedades infecciosas más comunes, ya que afecta a más de 1000 millones de personas, es una infección del intestino provocada por el nematodo *Ascaris lumbricoides*. *Ascaris* muestra una gran homología con *Caenorhabditis elegans,* el cual es ampliamente utilizado como organismo modelo para la investigación genética y del desarrollo (descrito en Capítulo 22). Sin embargo, *C. elegans* mide aproximadamente 1 mm, mientras que *Ascaris* puede alcanzar los 30 cm (véase la Figura 24–3D).

Algunas raras enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de las "vacas locas", son debidas a unas partículas infectivas poco frecuentes denominadas *priones,* los cuales sólo están constituidos por proteínas. Aunque los priones no disponen de genoma, sí pueden proliferar e, incluso, pueden llegar a matar al huésped.

También existe una gran diversidad dentro de cada una de las clases de patógenos. Así, los virus varían notablemente en cuanto a tamaño, forma y componentes (DNA o RNA, con envuelta membranosa o no, etc.), y esta característica es aplicable a otros agentes patógenos. Así pues, la capacidad para causar enfermedad debe considerarse como un nicho evolutivo y no como un legado sólo compartido por organismos próximos.

Cada agente patógeno causa una enfermedad específica, aunque un mismo patógeno puede ocasionar diferentes enfermedades en diferentes huéspedes, lo cual dificulta nuestro conocimiento sobre la biología básica de la infección. Sin embargo, cuando consideramos las interacciones con sus huéspedes, se ponen de manifiesto algunos aspectos que son comunes entre los agentes infecciosos; este es el el objeto de interés de este capítulo.

En primer lugar, se analizarán las características básicas de cada uno de los principales tipos de patógenos y, posteriormente, examinaremos los mecanismos que utilizan para controlar a sus huéspedes y las respuestas inmunitarias innatas que los huéspedes utilizan para el control de los patógenos.

Las bacterias patógenas son portadoras de genes de virulencia

Las **bacterias** son organismos pequeños y parecen sencillos en términos estructurales. Buena parte se pueden clasificar según su forma, en bacilos, cocos o espirilos (**Figura 24–4**A), y por su respuesta frente a la tinción de **Gram** (Figura 24–4B y C). Su relativamente diminuto

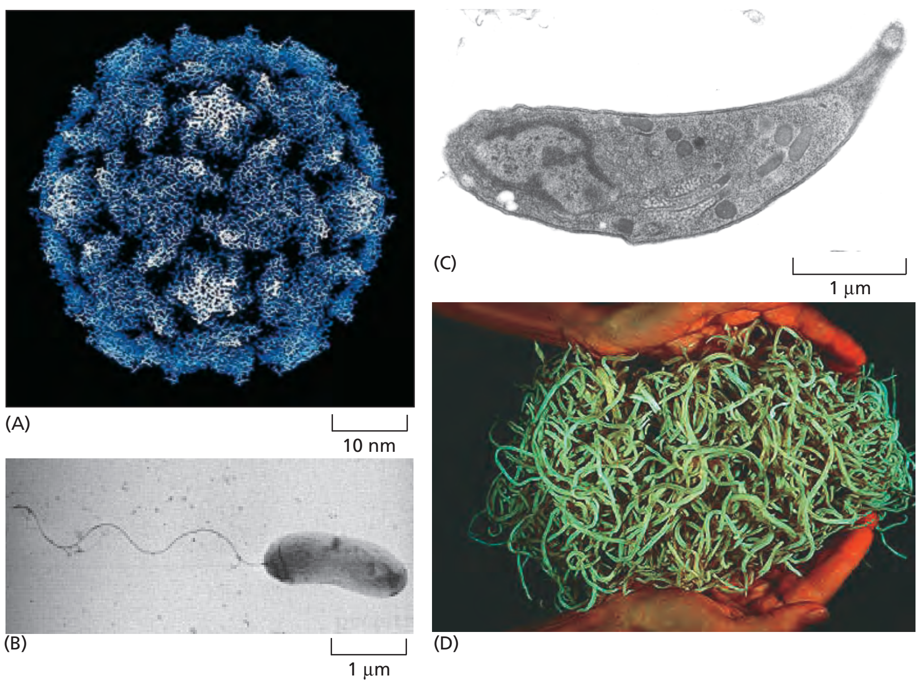


Figura 24–3 Diversidad morfológica entre patógenos. (A) Estructura de la cubierta proteica, o *cápside*, de poliovirus. En su día, su infección fue una causa habitual de parálisis, aunque en la actualidad la enfermedad (poliomielitis) está prácticamente erradicada gracias a la vacunación generalizada. (B) La bacteria *Vibrio cholerae* es el agente etiológico del cólera, una enfermedad epidémica que se acompaña de diarrea. (C) Protozoo parásito *Toxoplasma gondii*. Los mejores huéspedes de este organismo son los felinos, desde gatos hasta tigres, aunque también puede causar graves infecciones musculares y cerebrales en enfermos inmunodeficientes que padecen sida. (D) Esta masa de nematodos *Ascaris* obstruía el intestino de un niño de dos años. (A, cortesía de Robert Grant, Stephan Crainic y James M. Hogle; B, procedencia desconocida; C, cortesía de John Boothroyd y David Ferguson; D, De J.K. Baird et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35:314-3 18, 1986. Fotografiado por Daniel H. Connor.)

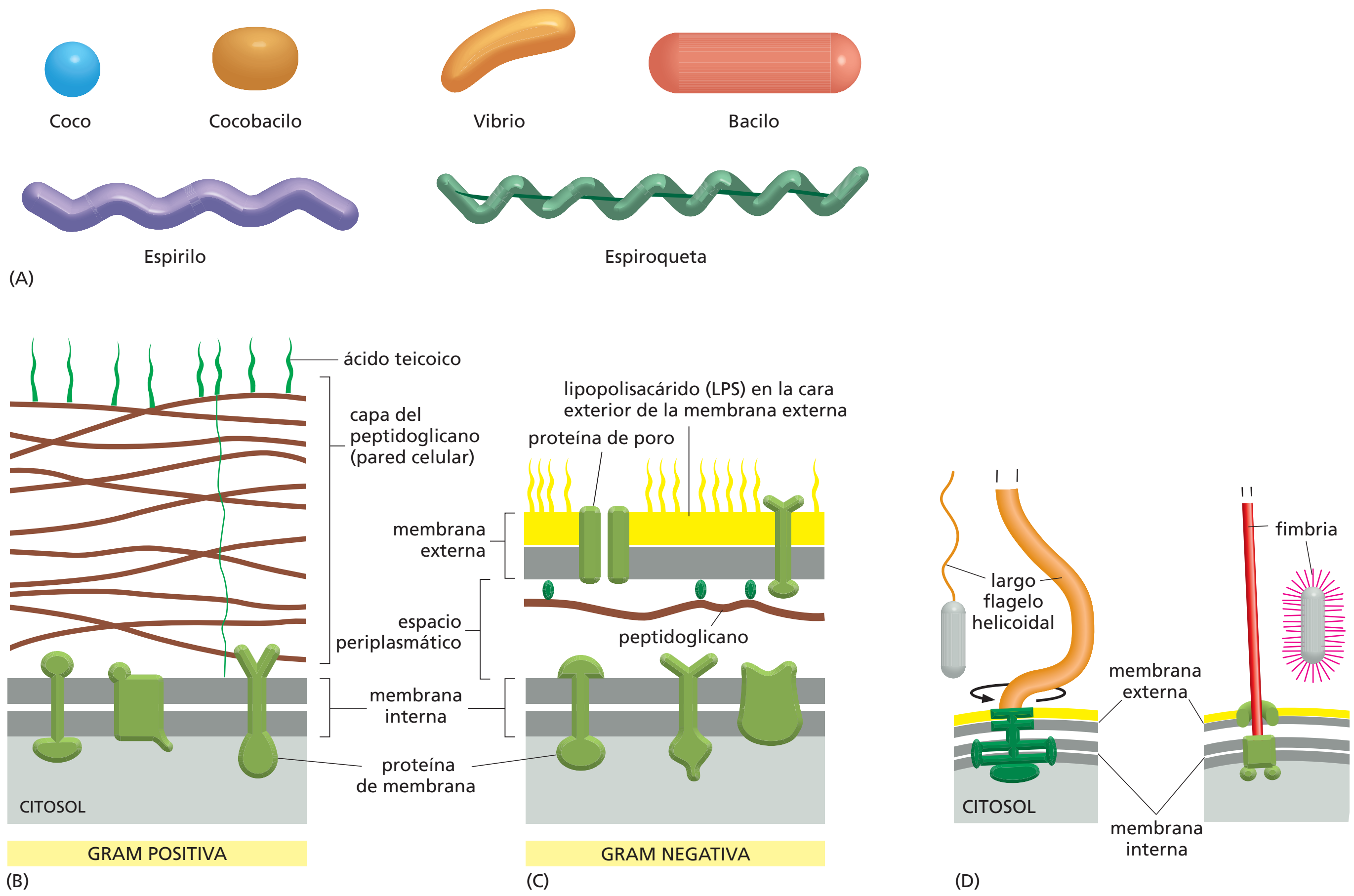


Figura 24–4 Formas bacterianas y estructuras superficiales. (A) Las bacterias se clasifican atendiendo a su morfología. (B y C) También son clasificadas como *Gram-positivas* o *Gram-negativas*. (B) Bacterias como *Staphylococcus* o *Streptococcus* tienen una sola membrana y una gruesa pared celular constituida por *peptidoglicano*, denominándose Gram-positivas porque retienen el colorante de cristal violeta usado en la tinción de Gram. (C) Por el contrario, las bacterias Gram-negativas, como *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Salmonella* disponen de dos membranas separadas por el *espacio periplasmático* (véase la Figura 11–18). La capa de peptidoglicano de la pared celular de estos organismos se encuentra en el espacio periplasmático y es más delgada que la de las bacterias Gram-positivas, por lo que no pueden retener el colorante de la tinción de Gram. La membrana interna de las bacterias Gram-negativas, como la hemimembrana interior de la membrana externa, es una bicapa fosfolipídica. Sin embargo, la hemimembrana exterior está compuesta por un único glucolípido denominado *lipopolisacárido* (*LPS*) (véase la Figura 24–47). (D) Los apéndices superficiales son importantes para el comportamiento bacteriano. Muchas bacterias nadan utilizando la rotación de flagelos helicoidales (véase la Figura 15–71). La bacteria que aquí se muestra dispone de un solo flagelo en uno de los polos; otras, como *E. coli*, tienen varios flagelos. Estas *fimbrias* (también denominadas *pili*) son utilizadas para adherirse a diversas superficies de los huéspedes, así como para facilitar el intercambio genético entre bacterias. Algunos tipos de fimbrias pueden retraerse y generar una fuerza que facilita el desplazamiento de las bacterias sobre las superficies. Tanto flagelos como fimbrias se encuentran anclados a la membrana por grandes complejos multiproteicos.

tamaño y el reducido abanico de formas ocultan su extraordinaria diversidad molecular, metabólica y ecológica. A nivel molecular, las bacterias son mucho más heterogéneas que los eucariotas, por lo que pueden ocupar con éxito nichos ecológicos que presentan unas condiciones extremas de temperatura, salinidad y limitación de nutrientes que intimidarían al más intrépido de los eucariotas. Aunque carecen de la variedad morfológica característica de las células eucariotas, las bacterias presentan un extraordinario conjunto de apéndices superficiales que proporcionan a estas células movilidad o la adhesión a superficies apropiadas (véase la Figura 24–4D). Sus genomas son sencillos, conteniendo típicamente del orden de 1.000.000 a 5.000.000 pares de nucleótidos (compárese con los 12.000.000 de levaduras o los más de 3.000.000.000 de la especie humana).

Como hemos destacado, sólo una minoría de especies bacterianas ha desarrollado la capacidad para causar enfermedades al hombre. Algunas de ellas sólo pueden proliferar dentro de las células, clasificándose como *patógenos obligados*. Las otras proliferan en reservorios ambientales, como agua o suelo y sólo causarán enfermedades si aciertan a encontrar un huésped apropiado; éstos son denominados *patógenos facultativos*. Por último, existen bacterias, denominadas *patógenos oportunistas* que, siendo benignas habitualmen-

te, poseen la capacidad de producir enfermedades en individuos enfermos o inmunodeficientes. Así pues el que una determinada bacteria provoque una enfermedad en un determinado huésped depende de numerosos factores, entre los que se encuentra el estado de salud general del huésped; así, por ejemplo, la flora normal puede causar enfermedades graves en individuos afectados por sida.

Algunas bacterias patógenas son selectivas en cuanto a la elección de huésped y sólo infectarán una sola especie o un grupo de especies relacionadas, mientras que otras manifiestan un comportamiento generalista. *Shigella flexneri*, por ejemplo, que causa epidemias de disentería (*diarrea sangrante*) en regiones que carecen de un abastecimiento adecuado de agua potable, sólo infecta a la especie humana y a otros primates. Por el contrario, una especie estrechamente relacionada con ella, *Salmonella enterica,* que con frecuencia procede de una intoxicación alimentaria en el hombre, también puede infectar a otros vertebrados como tortugas y pollos. Un buen ejemplo de organismo generalista con mucho éxito es el patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa,* el cual es capaz de provocar enfermedades tanto en plantas como animales.

Las diferencias existentes entre una bacteria patógena virulenta y la especie filogenéticamente más próxima no patógena son el resultado de la actividad de un número relativamente pequeño de genes. Los genes que confieren a un organismo la capacidad para causar enfermedades son denominados **genes de virulencia**, mientras que las proteínas codificadas por ellos se denominan **factores de virulencia**. Con frecuencia, los genes de virulencia se encuentran agrupados en el cromosoma bacteriano –denominándose *islotes de patogenicidad*– en *plásmidos de virulencia* extracromosómicos (**Figura 24–5**) o son transportados por *bacteriófagos* (virus bacterianos). Por tanto, parece probable que pueda originarse un nuevo patógeno cuando un grupo de genes de virulencia son transferidos conjuntamente a una bacteria no patógena. Cuantos más genomas de bacterias patógenas y no patógenas sean secuenciados, más claro quedará que la adquisición de grandes fragmentos de DNA, así como otros importantes cambios cromosómicos, han contribuido en conjunto a su evolución, capacitándolas para colonizar nuevos nichos ecológicos y nutricionales, así como ser la causa de enfermedades. Incluso dentro de una misma especie bacteriana, el grado de variación cromosómica es asombroso, como es el caso de *E. coli*, en el que el genoma de algunas cepas puede diferir hasta en un 25% del de otras cepas.

La adquisición de genes y de grupos de genes puede conducir a la rápida evolución de los patógenos y transformar a los inocuos en patógenos. Consideremos el ejemplo de *Vibrio cholerae*, la bacteria Gram-negativa causante de cólera, una enfermedad epidémica que se acompaña de diarrea. Los genes que codifican las dos subunidades de la toxina que causan la diarrea que acompaña a la enfermedad, son transportados por un bacteriófago (**Figura 24–6**A y B). De los centenares de cepas de *Vibrio cholerae* que se encuentran en los lagos de manera natural, las únicas que causan la pandemia en el hombre son aquellas que resultan infectadas por este virus bacteriano. Tal como se resume en la Figura 24–6C, se han identificado hasta ocho pandemias de *V. cholerae* desde el año 1817. Las primeras seis fueron causadas por el rebrote periódico de cepas muy parecidas, denominadas cepas Clásicas. Aparte de las toxinas codificadas por el bacteriófago y los islotes de patogenicidad, estas cepas Clásicas también comparten un antígeno glucídico de superficie, denominado O1, que forma parte del lipopolisacárido de la membrana externa (véase Figura 24–4C). En 1961 se inició la séptima pandemia y fue causada por una nueva cepa (denominada “El Tor”) que difería considerablemente de las cepas Clásicas. El Tor parecía haberse originado cuando una cepa salvaje que expresaba O1 adquirió dos bacteriófagos, además de al menos dos islotes de patogenicidad que no estaban presentes en las cepas Clásicas. Finalmente, El Tor reemplazó por completo a estas cepas a nivel mundial. En 1991 se inició una octava pandemia, esta vez dando un giro aterrador ya que, incluso aquellas personas que habían padecido cólera con anterioridad, no estaban inmunizadas. Este hecho era debido a que la nueva cepa presenta-

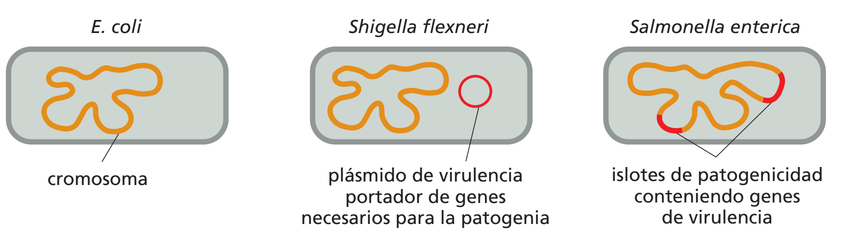


Figura 24–5 Diferencias génicas entre bacterias patógenas y no patógenas. Las cepas de *E. coli* no patógenas presentan un único cromosoma circular. *E. coli* está estrechamente emparentada con otros dos tipos de patógenos alimentarios, *Shigella flexneri*, que produce disentería, y *Salmonella enterica*, que es una causa muy común de intoxicación alimentaria. Si estos tres organismos fueran clasificados basándose en las técnicas moleculares actuales, serían incluidos en un mismo género e incluso como la misma especie. El cromosoma de *S. flexneri* difiere del de *E. coli* en muy pocos loci; la mayoría de los genes necesarios para la patogenia (genes de virulencia) se encuentran en un plásmido de virulencia extracromosómico. El cromosoma de *S. enterica* contiene dos grandes inserciones (islotes de patogenicidad) que no se encuentran en el cromosoma de *E. coli*; estas inserciones contienen numerosos genes de virulencia.

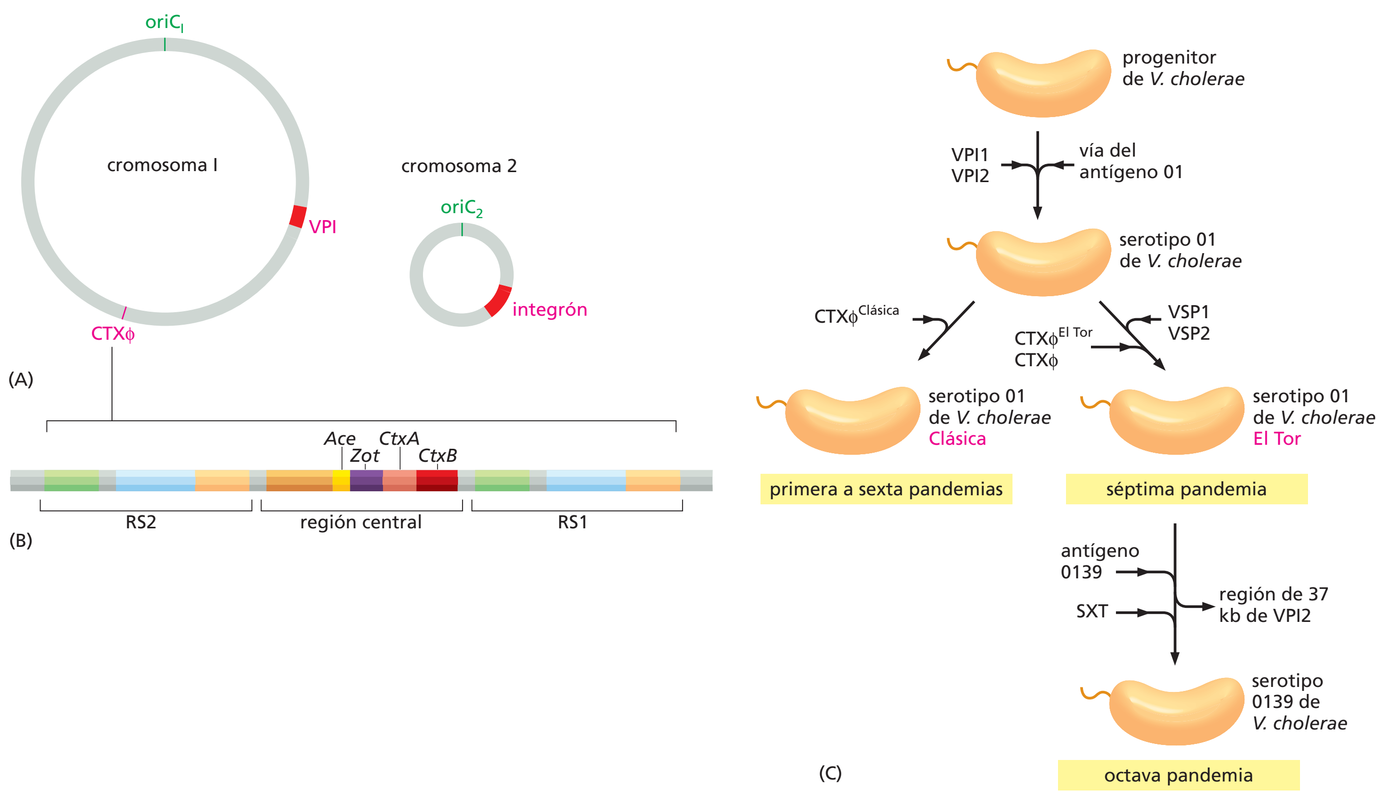


Figura 24–6 Organización génica de *Vibrio cholerae*. La Figura 24–3B muestra una electromicrografía de *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*). (A) La bacteria es poco habitual ya que dispone de dos cromosomas en vez de uno y cada uno de ellos tiene su propio inicio de replicación ($oriC_1$ y $oriC_2$). Las cepas patógenas de *V. cholerae* tienen tres loci que no se hallan en las cepas no patógenas y que parecen haber sido adquiridos recientemente. En el cromosoma 1, CTXϕ es un genoma de un bacteriófago portador de los genes que codifican la toxina del cólera. En el mismo cromosoma, el islote de patogenicidad VPI contiene genes que codifican factores necesarios para la colonización intestinal. El *integrón*, que se encuentra en el cromosoma 2, facilita la inserción de fragmentos de DNA adquiridos en un punto localizado 3' con respecto a un promotor transcripcional fuerte, lo que posibilita la adquisición de nuevos genes. Aunque por el momento no se ha demostrado que el integrón sea necesario para dotar de virulencia a *V. cholerae*, otros islotes similares localizados en muchos otros patógenos, contienen tanto genes que confieren virulencia como genes implicados en la resistencia a antibióticos. (B) Mapa del locus CTXϕ. Los genes que codifican las dos subunidades de la toxina colérica son *CtxA* y *CtxB*. Otros genes localizados en la región núcleo (*Ace* y *Zot*) también están involucrados en la virulencia. Las dos regiones flanqueantes RS1 y RS2 están implicadas en la inserción del genoma del bacteriófago en el cromosoma 1. (C) Modelo evolutivo de las cepas patógenas de *V. cholerae* basado en la comparación de genomas. En primer lugar, las cepas progenitoras salvajes adquirieron la vía biosintética de producción del tipo de oligosacárido denominado antígeno O1 que se expresa en el lipopolisacárido de la membrana externa (véanse las Figuras 24–4C y 24–47) y, probablemente, también incorporaron uno o dos islotes de patogenicidad de *Vibrio* (VPI1 y VPI2). La incorporación del bacteriófago CTXϕ dio lugar a la producción de las cepas patógenas Clásicas, las cuales fueron responsables de las seis epidemias de cólera que tuvieron lugar entre 1817 y 1923. En algún momento del siglo XX, una cepa O1 incorporó de nuevo el bacteriófago CTXϕ junto con el fago RS1ϕ, además de dos nuevos islotes de patogenicidad (VSP1 y VSP2), dando lugar conjuntamente a la cepa El Tor, la cual emergió como la séptima pandemia en 1961. Antes de 1991, una cepa El Tor incorporó un nuevo casete de DNA, lo que favoreció la producción del tipo de oligosacárido denominado antígeno O139 en vez del O1. Este hecho modificó su interacción con el sistema inmunitario humano sin que disminuyera su virulencia, lo que originó la octava pandemia. Esta bacteria también incorporó un nuevo islote de patogenicidad (SXT), mientras perdía la mayor parte del islote VPI2.

ba un tipo de antígeno O diferente, haciendo que los anticuerpos anti-O1 presentes en la sangre de los supervivientes de otras epidemias de cólera no fueran efectivos contra la nueva cepa. En otros aspectos, la nueva cepa era parecida a El Tor y simplemente había incorporado nuevos elementos para la síntesis de un antígeno O diferente.

¿Qué genes hacen posible que una bacteria cause una enfermedad en un huésped sano? Muchos genes de virulencia codifican proteínas que interactúan de forma directa con las células del huésped. Así, por ejemplo, dos de los genes aportados por el fago que infecta *Vibrio cholerae*, codifican las dos subunidades de la **toxina colérica** (véase Figura 24–6B). Una vez secretada, la subunidad B de esta proteína tóxica se une a un componente glucolipídico de la membrana plasmática de los enterocitos del individuo que ha consumido agua contaminada por *Vibrio cholerae*. Posteriormente, esta subunidad B internaliza la subunidad A a través de la membrana plasmática, alcanzando el citoplasma de la célula epitelial. La subunidad A es una enzima que cataliza la transferencia de ADP-ribosa desde NAD^+ hasta la proteína G trimérica G_s, que habitualmente activa la adenilato ciclasa produciendo AMP cíclico (descrito en el Capítulo 15). La ADP-ribosilación de la proteína G produce una sobreproduc-

ción de AMP cíclico y provoca un desequilibrio iónico, que se traduce en la abundante diarrea asociada al cólera. Así, la infección se transmite a nuevos huéspedes siguiendo la ruta fecal-oral a través de alimentos y agua contaminados.

Algunas bacterias patógenas utilizan diversos mecanismos independientes para intoxicar las células de sus huéspedes. Por ejemplo, el *ántrax* (*carbunco*) es una enfermedad contagiosa aguda que afecta a ovejas y a otras especies herbívoras de interés agropecuario y, ocasionalmente, al hombre. La adquisición de la enfermedad se produce por contacto con las esporas de la bacteria Gram-positiva *Bacillus anthracis*. A diferencia del cólera, el ántrax no se transmite directamente de una persona a otra. Las esporas inactivas pueden sobrevivir en el suelo durante largos periodos de tiempo, siendo muy resistentes a las condiciones ambientales adversas como calor, rayos ultravioleta, radiación ionizante, presión y agentes químicos. Tras ser inhaladas, ingeridas o colonizar heridas en la piel, las esporas germinan y las bacterias inician su proliferación. Estas bacterias secretan dos toxinas, denominadas **factor letal** y **factor edematoso**, siendo cualquiera de ellas capaz de causar signos de infección. De manera semejante a la toxina colérica, ambos factores están formados por dos subunidades. La subunidad B es idéntica en ambas toxinas del ántrax, uniéndose a un receptor proteico de la superficie de las células del huésped, lo cual facilita la internalización en estas células de las respectivas subunidades A (**Figura 24–7**). La subunidad A del factor edematoso es una adenilato ciclasa que transforma el ATP de la célula huésped en AMP cíclico y ocasiona un desequilibrio iónico que conduce a la acumulación de líquido extracelular (*edema*) en el pulmón o piel infectados. La subunidad A del factor letal es una metaloproteasa que escinde diversos miembros de la familia MAP-quinasa-quinasa (véase la Figura 15–60). La inyección del factor tóxico en el torrente sanguíneo de un animal provoca un cuadro de *shock* (una caída en la presión sanguínea) que conduce a la muerte. A pesar de ello, los diversos mecanismos moleculares que conducen a la muerte tras la infección por ántrax siguen siendo inciertos.

Estos ejemplos ilustran un aspecto común de los factores de virulencia. Algunos de estos factores son proteínas tóxicas (*toxinas*) que interaccionan de forma directa con proteínas estructurales o de señalización, induciendo una respuesta del huésped que es beneficiosa para la proliferación o colonización del patógeno. Otros factores de virulencia son proteínas necesarias para la internalización de las toxinas en las células del huésped. Un mecanismo, en particular eficiente, descrito en diversos patógenos Gram-negativos es el denominado **sistema de secreción de tipo III**, que actúa como una jeringa inyectando las toxinas directamente, desde el citoplasma de una bacteria al citoplasma de la célula a la que está adherida (**Figura 24–8**). Las proteínas efectoras que son transferidas al citoplasma de las células huésped mediante este mecanismo de inyección pueden provocar diversas respuestas en la célula huésped que facilitan la supervivencia o la infección de la bacteria. Hay un grado notable de similitud estructural entre el sistema de tipo III y la base del flagelo bacteriano

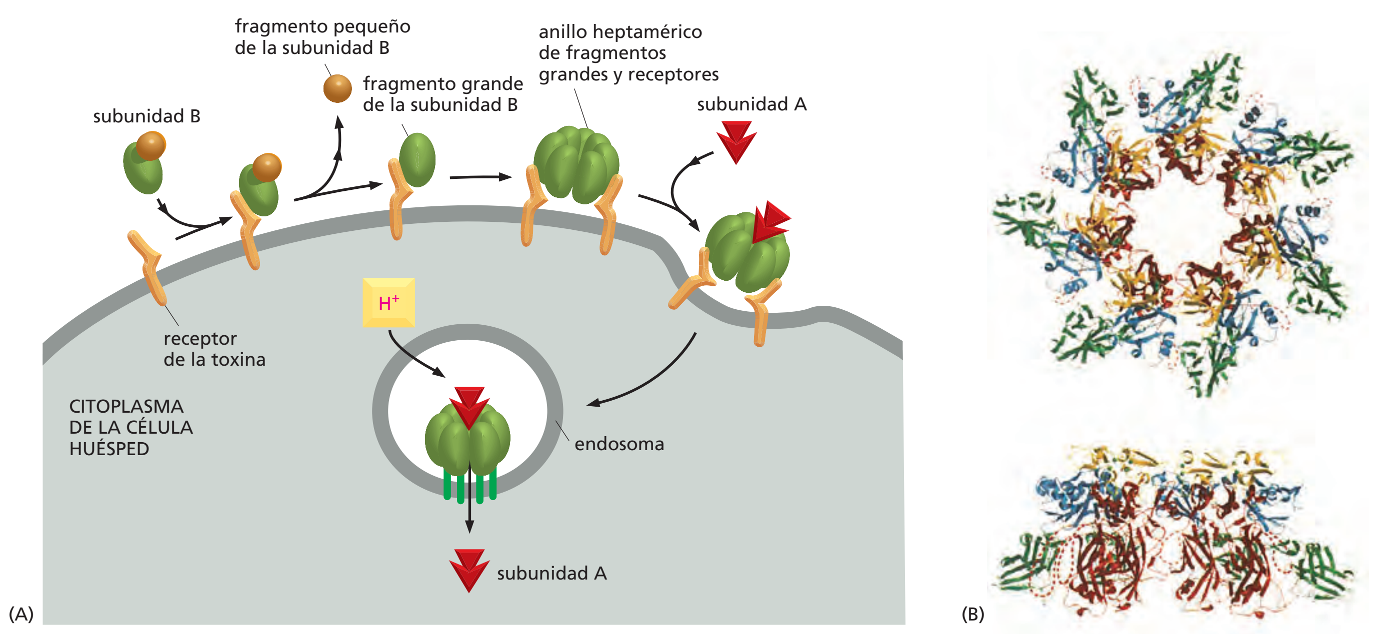


Figura 24–7 Entrada de la toxina del ántrax en las células huésped. (A) Las subunidades B de la toxina forman un poro a través del que es transportada la subunidad A al interior del citoplasma de la célula huésped. La subunidad B se une a un receptor proteico de la superficie celular, tras lo que se escinde de manera autocatalítica dando lugar a un pequeño fragmento soluble y un fragmento grande que permanece unido al receptor. Siete copias del fragmento grande, unidas a sus respectivos receptores, se agregan en la superficie de la célula huésped y dan lugar a una estructura anular heptamérica. Posteriormente, la toxina A se une a esa estructura heptamérica y ambas son endocitadas. A medida que desciende el pH en el endosoma, la estructura anular sufre un espectacular cambio estructural dando lugar a la formación de un poro en la membrana endosomal, lo que facilita su transporte hasta el citoplasma de la célula huésped. (B) Vistas frontal y lateral de la estructura del anillo heptamérico que forman las subunidades B deducidas del análisis de rayos X. (B, de C. Petosa et al., *Nature* 385: 833-838, 1997, con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

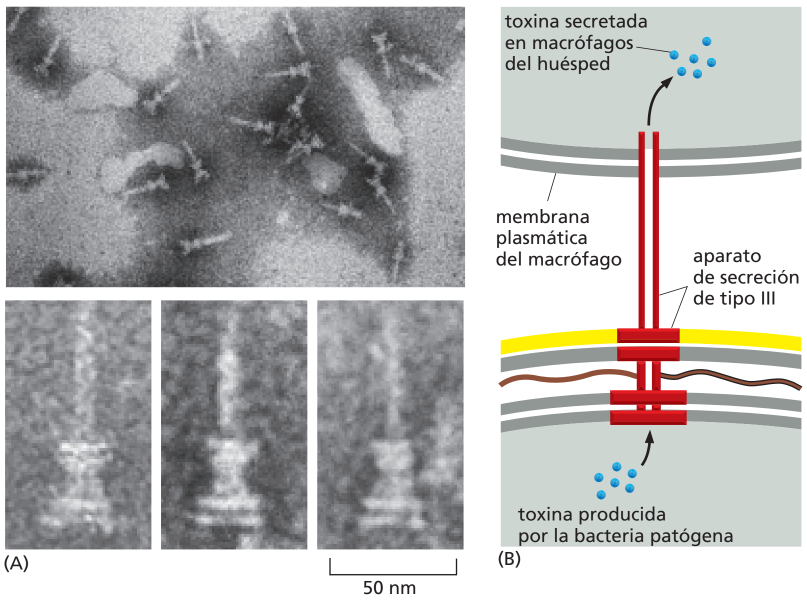


Figura 24–8 Los sistemas de secreción de tipo III pueden liberar factores de virulencia directamente al citosol de una célula huésped. (A) Electromicrografías de aparatos de tipo III una vez purificados. Dos docenas de proteínas forman la estructura completa, la cual se puede observar con detalle en las tres ampliaciones inferiores. (B) El gran anillo inferior se inserta en la membrana bacteriana interna, mientras que el superior lo hace en la membrana bacteriana externa. La larga proyección constituye un tubo a través del cual tiene lugar la secreción de las proteínas. Durante la infección, el contacto del extremo del tubo con la membrana de la célula huésped desencadena la secreción en su interior. En el esquema, la bacteria de la peste, *Yersinia pestis*, inyecta toxinas a un macrófago. (A, de K. Tamano et al., *EMBO J.* 19:3876-3887, 2000. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

(véase la Figura 15–71) y muchas de las proteínas presentes en las dos estructuras presentan una notable homología. Dado que los flagelos se encuentran en un amplio espectro de bacterias con sistemas de secreción del tipo III y que estos sistemas parecen ser adaptaciones específicas dirigidas a la patogénesis, parece más probable que los sistemas de secreción de tipo III hayan evolucionado a partir de los flagelos que por otras vías. Sin embargo, otros sistemas especializados en la transferencia de toxinas presentes en algunos patógenos parecen haber evolucionado de forma independiente. Así por ejemplo, los *sistemas de secreción de tipo IV*, utilizados por diversos patógenos para inyectar las toxinas en el citoplasma de las células huésped de manera análoga a como lo hacen los sistemas de tipo III, están estrechamente relacionados con los aparatos de conjugación que utilizan numerosas bacterias para intercambiar material genético.

Protozoos y hongos parásitos siguen complejos ciclos vitales a través de múltiples formas

Los protozoos y hongos parásitos son organismos eucariotas, por lo que es más difícil la obtención de fármacos que los maten sin afectar al huésped. Por lo tanto, generalmente estos fármacos antifúngicos y antiparasitarios son más tóxicos y menos eficaces que los antibióticos. Una segunda característica que dificulta el tratamiento de las infecciones fúngicas y parasitarias es la habilidad de los organismos infectivos para cambiar entre diferentes formas a lo largo del ciclo vital. Así, un fármaco que es efectivo contra una de las formas es inocuo contra las otras, las cuales sobrevivirán al tratamiento.

El grupo de los **hongos** incluye tanto levaduras unicelulares (como *Saccharomyces cerevisiae y Schizosaccharomyces pombe)* como *hongos* filamentosos pluricelulares (como los encontrados en los mohos del pan o de la fruta). La mayor parte de los hongos patógenos importantes presentan *dimorfismo*, una habilidad para crecer ya sea en forma de levadura o de filamento. Frecuentemente las transiciones de levadura a filamento o de filamento a levadura están asociadas al proceso infeccioso. Por ejemplo, *Histoplasma capsulatum* tiene un crecimiento filamentoso cuando lo hace a las bajas temperaturas que presenta el suelo, pero cambia a una forma de levadura tras ser inhalado y alcanzar el pulmón, donde puede causar la enfermedad histoplasmosis (**Figura 24–9**).

Los **protozoos parásitos** son eucariotas unicelulares y tienen ciclos biológicos aún más elaborados que los hongos y con frecuencia necesitan la colaboración de más de un huésped. La **malaria** es la enfermedad más común causada por protozoos, infectando de 200 a 300 millones de personas al año de las cuales mueren, a causa de la misma, de 1 a 3 millones. El agente etiológico es un grupo de cuatro especies de *Plasmodium*, que es transmitido al hombre al ser picado por una hembra de cualquiera de las 60 especies de mosquito *Anopheles*. *Plasmodium falciparum* –la especie más estudiada de todos los parásitos que causan la malaria– se presenta en no menos de ocho formas distintas, y requiere como hués-

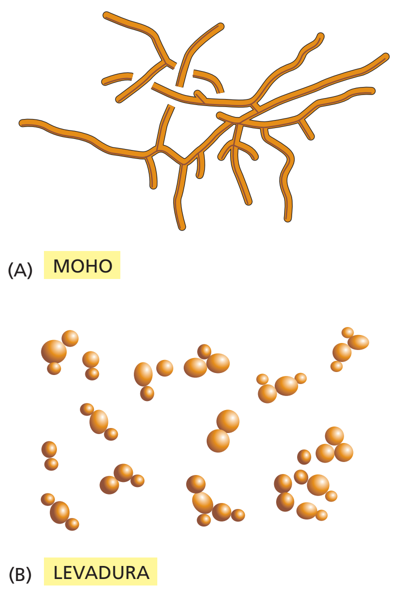


Figura 24–9 Dimorfismo del hongo patógeno *Histoplasma capsulatum*. (A) A la baja temperatura del suelo, *Histoplasma* crece como un moho filamentoso pluricelular. (B) Sin embargo, una vez ha colonizado los pulmones, tras ser inhalado por un mamífero, *Histoplasma* sufre un cambio morfológico a causa del incremento de la temperatura. En la forma de levadura unicelular se asemeja mucho a *Saccharomyces cerevisiae*.

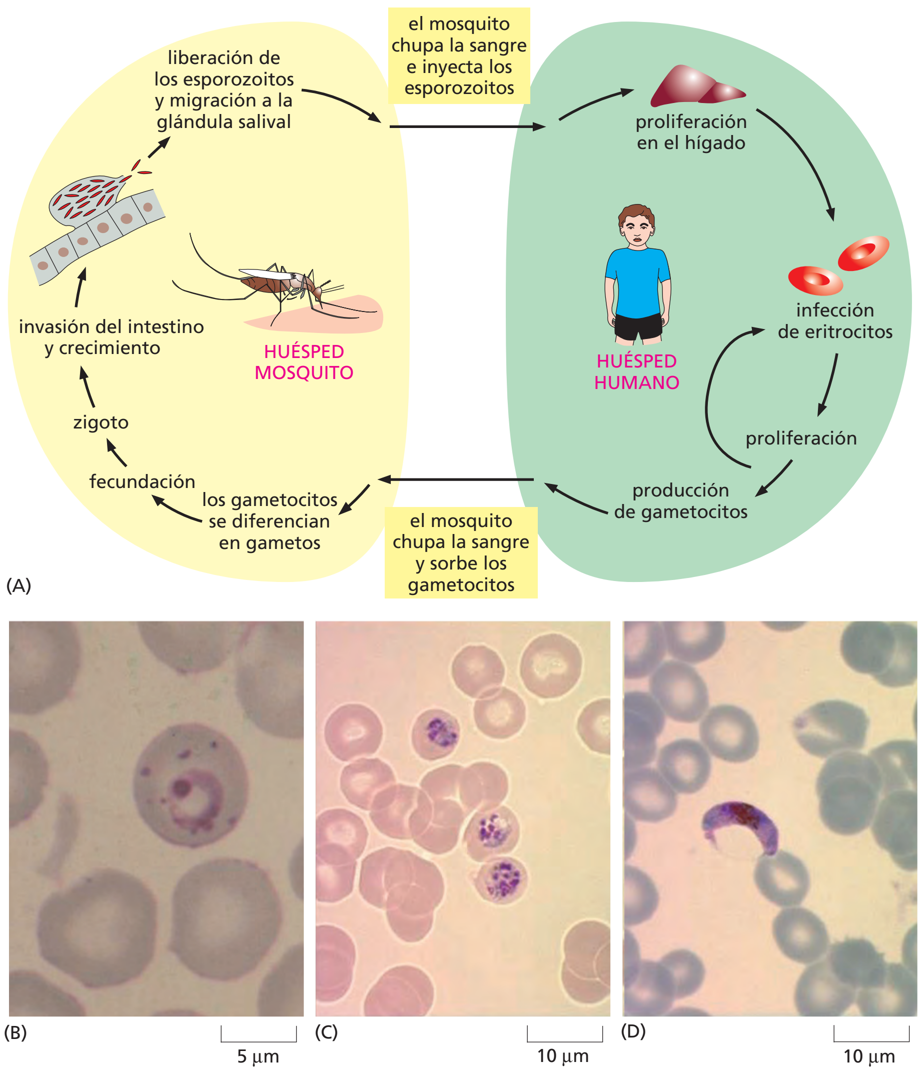


Figura 24–10 El complejo ciclo vital de los parásitos de la malaria. (A) El ciclo sexual de *Plasmodium falciparum* requiere la transmisión entre el huésped humano y el huésped insecto. (B)-(D) Extensiones sanguíneas de personas que padecen malaria permiten mostrar tres formas diferentes del parásito en sus hematíes: (B) forma anular; (C) esquizonte; (D) gametocito. (Micrografías por cortesía de Centers for Disease Control, Division of Parasitic Diseases, DPDx.)

pedes tanto al hombre como al mosquito para completar su ciclo sexual (**Figura 24–10**A). Los gametocitos se forman en el torrente sanguíneo de la persona infectada, pero sólo pueden diferenciarse en gametos y fusionarse formando un zigoto en el intestino del mosquito. Tres de las formas del ciclo vital del *Plasmodium* están especializadas en la invasión y en la reproducción en tejidos específicos, como son el epitelio intestinal del insecto y el hígado y los eritrocitos humanos. Incluso dentro de un único tipo celular, el hematíe, el parásito *Plasmodium* desarrolla una compleja secuencia de etapas en su desarrollo que se reflejan en sorprendentes cambios morfológicos (Figura 24–10B, C, D), así como una regulación en la mayoría de sus transcritos que resulta ser específica de estadio (**Figura 24–11**).

Dada la extensión y la devastación que produce, la malaria ha ejercido una fuerte presión selectiva sobre aquellas poblaciones que habitan las regiones colonizadas por el mosquito *Anopheles*. Así, la *anemia falciforme*, por ejemplo, es un defecto genético de carácter

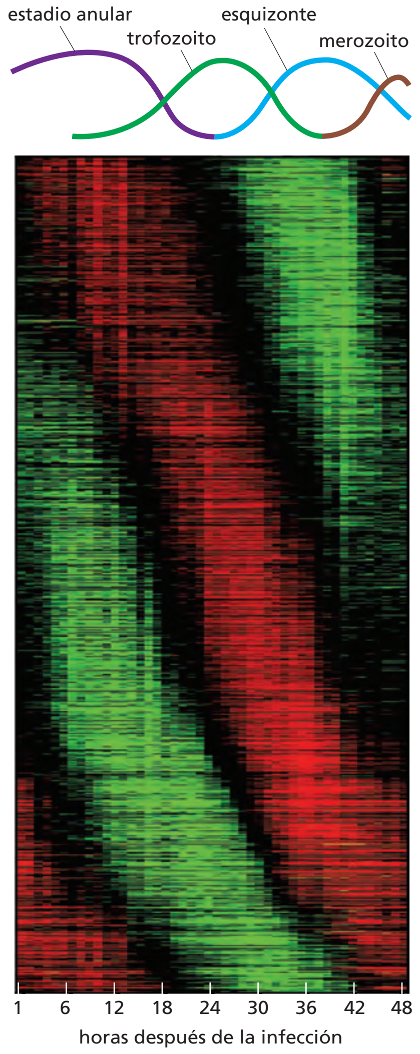


Figura 24–11 Evolución temporal del programa de transcripción de los parásitos de la malaria durante su desarrollo en los hematíes. A lo largo de 48 horas, se aisló el RNA de hematíes infectados con *Plasmodium falciparum* analizando muestras tomadas cada hora. En esta imagen, cada línea horizontal representa uno de los ~2700 genes cuyo nivel transcripcional varió de manera significativa durante el curso de la infección. El color *rojo* indica un incremento sobre la media en la producción de mRNA, mientras que el color *verde* representa un descenso. Los genes fueron ordenados de arriba a abajo según las correspondientes fases de su activación transcripcional. Esta progresión regular y ordenada de la expresión génica es paralela a la diferenciación morfológica que sufre el parásito *Plasmodium* y se manifiesta a través de los estadios anular, trofozoito, esquizonte y merozoito, todos ellos observados en los hematíes de las personas infectadas (véase Figura 24–10B, C, D). (Adaptados de Z. Bozdech et al., *PLoS Biol.* 1:E5, 2003. Con la autorización de Public Library of Science.)

recesivo causado por una mutación puntual del gen que codifica la cadena β de la hemoglobina, siendo común en áreas de África con una alta prevalencia de la forma más grave de malaria (la causada por *Plasmodium falciparum)*. Los parásitos de malaria crecen con dificultad en los glóbulos rojos de las personas homocigotas o heterocigotas para aquella mutación y, en consecuencia, la malaria rara vez es diagnosticada entre los portadores de la mutación. Ésta es la razón por la que la malaria ha hecho que se mantenga una elevada frecuencia de la mutación de la anemia falciforme, que en caso contrario sería deletérea, en estas regiones de África.

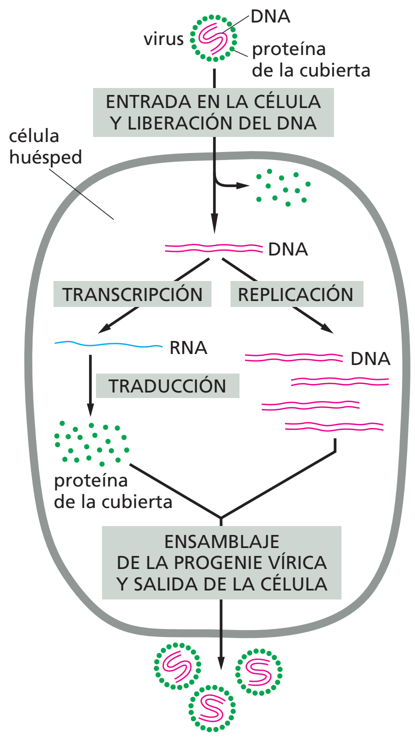


Figura 24–12 Un sencillo ciclo vital vírico. El hipotético virus que se muestra contiene una pequeña molécula de DNA de doble cadena que codifica una sola proteína de la cápside. Ninguno de los virus conocidos es tan sencillo.

Todos los procesos de la propagación vírica dependen de la maquinaria de la célula huésped

Las bacterias, las levaduras y los protozoos patógenos son células. Aun en el caso de ser patógenos intracelulares, siguen utilizando su propia maquinaria para la replicación, la transcripción y la traducción del DNA, disponiendo, además, de sus propias fuentes de energía metabólica.

Los **virus**, en cambio, son los perfectos "autoestopistas" que transportan poca cosa más que la información en forma de ácido nucleico. Esta información es replicada, empaquetada y conservada fundamentalmente por las células huésped (**Figura 24–12**). Los virus tienen un cromosoma pequeño, formado por un tipo de ácido nucleico –DNA o RNA– que, en cualquiera de ambos casos, puede ser monocatenario o bicatenario. El genoma se encuentra empaquetado dentro de una cubierta de proteína, que en algunos tipos de virus está recubierta por una envoltura lipídica.

Los virus se reproducen de diversas maneras. En general, la replicación implica (1) desensamblaje de la partícula vírica infectiva, (2) copia del cromosoma, (3) síntesis de las proteínas víricas por la maquinaria de traducción de la célula huésped, y (4) ensamblaje de estos componentes en partículas víricas hijas. Una sola partícula del virus (un *virión)* que infecte una única célula huésped puede producir miles de viriones en la célula infectada. A menudo una proliferación tan extraordinaria como ésta mata a la célula huésped, ya que la célula infectada se rompe (lisa) facilitando que los nuevos viriones puedan infectar las células huéspedes vecinas. Buena parte de las manifestaciones clínicas de algunos tipos de infección vírica son el reflejo de este *efecto citolítico* del virus. Así, por ejemplo, tanto los herpes labiales (calenturas) que se forman tras la infección por *Herpes simplex* como las lesiones causadas por el virus de la *viruela,* son la consecuencia de la lisis de las células epidérmicas

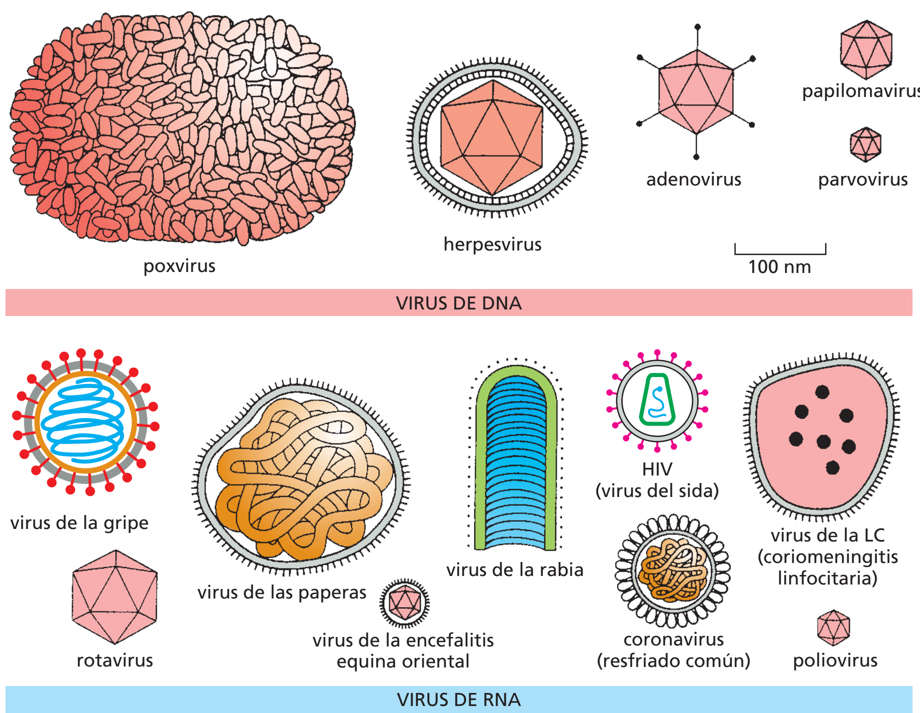


Figura 24–13 Ejemplos de morfología vírica. Como puede observarse, tanto los virus de DNA como los de RNA presentan grandes variaciones en cuanto a tamaño y formas.

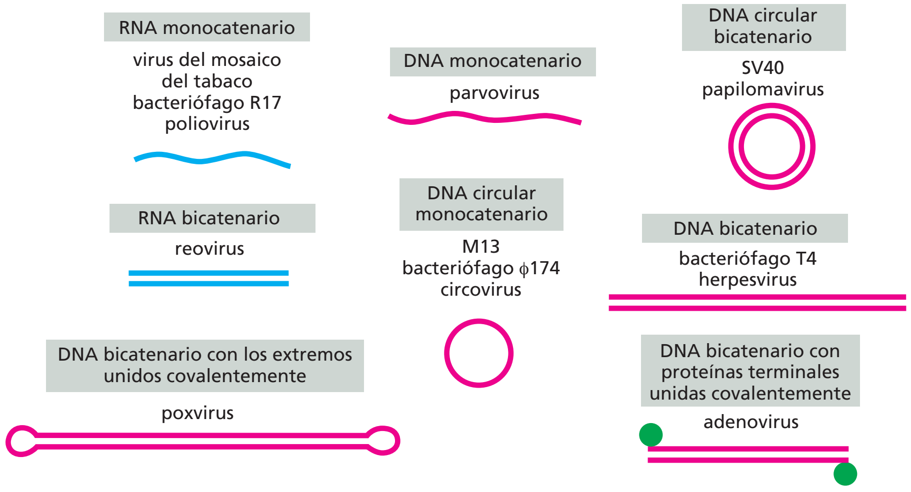


Figura 24–14 Esquemas de diversos tipos de genomas víricos. Los virus más diminutos tan sólo contienen algunos genes y disponen de un genoma de RNA o DNA. Los virus mayores contienen cientos de genes y disponen de un genoma de DNA de doble cadena. Los peculiares extremos de DNA que presentan (así como las formas circulares) solventan la dificultad que representa la replicación de los últimos nucleótidos del extremo de la cadena del ácido nucleico (descrito en el Capítulo 5).

infectadas en un área local de piel infectada. Tal como se indicó y se volverá a señalar posteriormente, parte de las muertes de las células huésped están causadas por las respuestas inmunitarias frente al virus.

Los viriones presentan una gran variedad de formas y tamaños y, a diferencia de las formas de vida celulares, no pueden ser clasificados de forma sistemática en un solo árbol filogenético. Dado el tamaño diminuto de sus genomas, se dispone en la actualidad de las secuencias completas de la práctica totalidad de virus con relevancia clínica. Los viriones de *poxvirus* se encuentran entre los de mayor tamaño, alcanzan los 450 nm que es comparable al tamaño de algunas bacterias pequeñas. Su genoma, constituido por DNA de doble cadena, contiene aproximadamente 270.000 pares de nucleótidos. En el otro extremo de la escala están los viriones de *parvovirus*, que no llegan a los 20 nm de diámetro y poseen un genoma de DNA monocatenario con menos de 5000 nucleótidos (**Figura 24–13**). Además, la información genética de un virus puede estar organizada en diversas formas de ácidos nucleicos poco habituales (**Figura 24–14**).

La **cápside** que encierra el genoma vírico está formada por una o varias proteínas, que se organizan en capas y patrones repetidos regularmente; el genoma vírico junto con la cápside se denomina **nucleocápside**. En el caso de los *virus con envoltura* (*envueltos*), la nu-

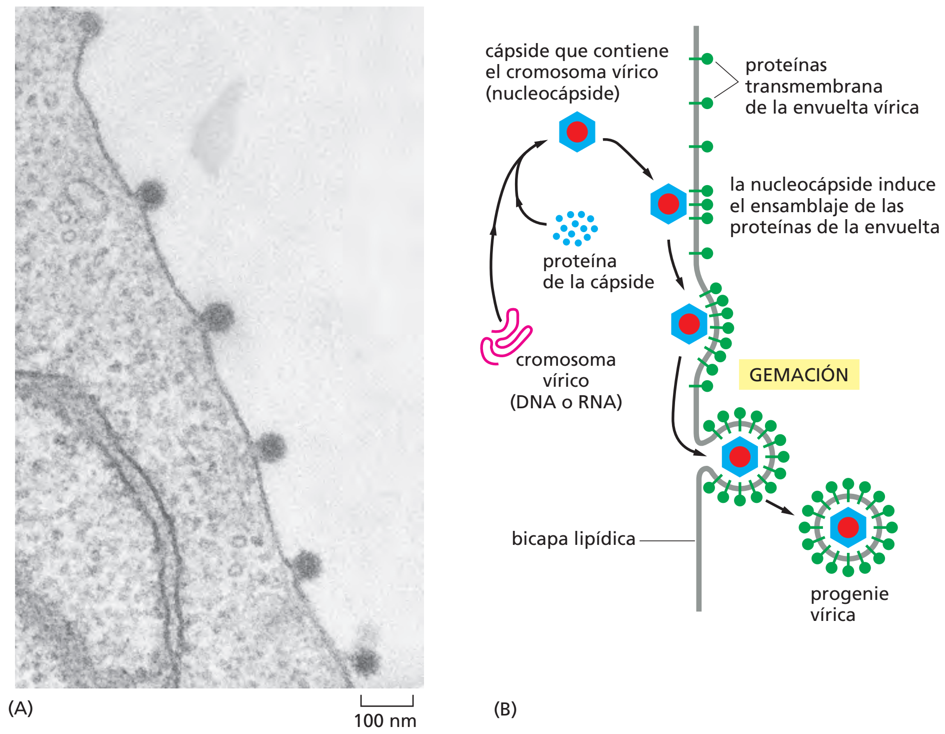


Figura 24–15 Adquisición de una envoltura vírica. (A) Electromicrografía obtenida con el microscopio electrónico de transmisión de una célula animal de la que están gemando seis copias de un virus con envoltura (*virus Semliki Forest*). (B) Esquema que representa el ensamblaje de la envoltura y el proceso de gemación. La bicapa lipídica que envuelve la cápside deriva directamente de la membrana plasmática de la célula huésped. Por el contrario, las proteínas de esta bicapa lipídica (señaladas en *verde*) son codificadas por el genoma vírico. (A, cortesía de M. Olsen y G. Griffith).

cleocápside está envuelta por una bicapa lipídica que el virus adquiere en el curso de la gemación vírica, a partir de la membrana plasmática de la célula huésped (**Figura 24–15**). Mientras que los *virus sin envoltura* (*no envueltos*) abandonan habitualmente la célula infectada tras la lisis de ésta, un virus que disponga de membrana puede abandonarla mediante gemación y, por tanto, sin necesidad de matar a la célula. Los virus con envoltura pueden ser los causantes de infecciones persistentes y pueden permanecer durante años en el huésped sin ocasionarle efectos perjudiciales.

A pesar de esta diversidad, todos los genomas víricos codifican tres tipos de proteínas: proteínas para replicar el genoma, proteínas para empaquetar el ácido nucleico y diseminarlo entre otras células huésped y, finalmente, proteínas que modifican la estructura o la función de la célula huésped para incrementar la replicación de los viriones (**Figura 24–16**). En la segunda parte de este capítulo nos centraremos en el estudio de este último tipo de proteínas. Además, muchos genomas víricos codifican una cuarta clase de proteínas, las cuales modulan o alteran los mecanismos normales de defensa inmunitaria que presenta el huésped. Algunas de ellas están descritas en el apartado final de este capítulo.

Dado que la mayor parte de los pasos críticos en la replicación vírica está llevada a cabo por la maquinaria de las células del huésped, la obtención de fármacos antivirales efectivos es particularmente problemática. Por ejemplo, mientras que el antibiótico tetraciclina provoca la disfunción específica de los ribosomas bacterianos, es imposible la obtención de un fármaco que tenga como diana los ribosomas víricos, ya que para producir sus proteínas los virus utilizan los ribosomas de la célula huésped. La mejor estrategia para controlar las enfermedades víricas es prevenirlas vacunando a los huéspedes potenciales. Así, los programas de vacunación han eliminado totalmente la viruela del planeta, mientras que la erradicación de la poliomielitis puede ser inminente (**Figura 24–17**).

Los priones son proteínas infecciosas

Toda la información contenida en los sistemas biológicos está codificada de forma estructural. Estamos acostumbrados a pensar en la información biológica en forma de secuencias de ácido nucleico (como hemos hecho en la descripción del genoma vírico), pero esta secuencia, en sí misma, es un código abreviado que describe la estructura del ácido nucleico. La replicación y expresión de la información codificada en el DNA y en el RNA dependen estrictamente de la estructura de estos ácidos nucleicos y de sus interacciones con otras macromoléculas. La propagación de la información genética requiere, fundamentalmente, que la información sea almacenada en una estructura que pueda duplicarse a partir de precursores no estructurados. Los ácidos nucleicos constituyen la solución más sencilla y sólida que han encontrado los organismos para resolver el problema de la fidelidad en la replicación estructural.

Sin embargo, los ácidos nucleicos no son la única solución. Los **priones** son agentes infecciosos que se replican en el huésped mediante la copia de una estructura proteica aberrante. Estos agentes se han detectado tanto en levaduras como en nudibranquios o en la especie humana y pueden ser los causantes de diversas enfermedades neurodegenerativas en mamíferos. La infección más conocida causada por priones es la *encefalopatía espongiforme bovina* (BSE: ***b**ovine **s**pongiform **e**ncelophathy*; o enfermedad de las vacas locas), la cual, en ocasiones, es transmitida a las personas que ingieren tejidos infectados de la vaca (**Figura 24–18**); también pueden ser transmitidos entre personas a través de transfusiones sanguíneas. Tanto el aislamiento de los priones contagiosos –que en las ovejas causan la enfermedad conocida como *scrapie*– como la esmerada caracterización de ratones infectados por el prión, permitió establecer definitivamente que el agente infeccioso es la propia proteína.

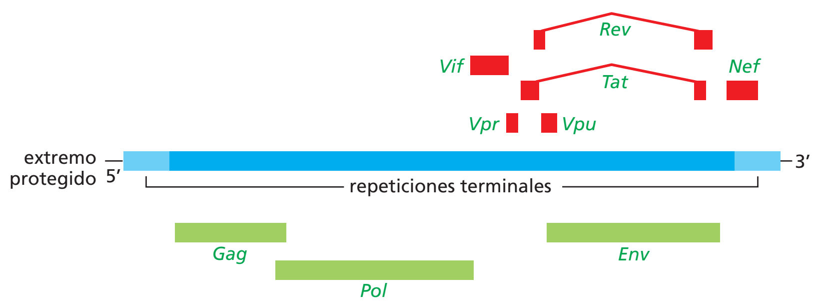


Figura 24–16 Mapa del genoma del HIV. Este genoma retroviral de RNA consiste en unos 9000 nucleótidos y contiene nueve genes, cuyas localizaciones se muestran en *rojo* y *verde*. Tres de ellos son comunes a todos los retrovirus (*verde*): *Gag* codifica proteínas de la cápside, *Env* las de la envoltura y *Pol* tanto la transcriptasa inversa (que copia el RNA en DNA) como la integrasa (la cual integra la copia de DNA en el genoma de la célula huésped) (descritas en el Capítulo 5). El genoma del HIV es extraordinariamente complejo, ya que contiene seis pequeños genes (*rojo*) junto con otros tres mayores (*verde*) que son necesarios para el ciclo vital del retrovirus. Al menos tres de los genes pequeños codifican proteínas que regulan la expresión génica del virus (*Tat* y *Rev*; véase la Figura 7–103); otros codifican proteínas que modifican los procesos celulares del huésped, como el transporte proteico (*Vpu* y *Nef*) y la progresión a través del ciclo celular (*Vpr*). Como se indica con las líneas *rojas*, la maduración del RNA (utilizando los espliceosomas del huésped) es necesaria para producir las proteínas Rev y Tat.

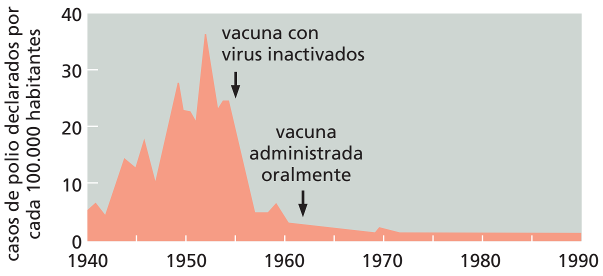


Figura 24–17 Erradicación de una enfermedad vírica mediante programas de vacunación. El gráfico muestra el número de casos anuales de poliomielitis declarados en Estados Unidos. Las *flechas* indican los momentos en que se introdujeron la vacuna de Salk (inyección del virus inactivado) y la vacuna Sabin (administración oral del virus vivo atenuado).

Sorprendentemente, el huésped produce la proteína priónica infecciosa y su secuencia aminoacídica es idéntica a la de la proteína homóloga normal de la célula huésped. Además, tanto el prión como las formas no patógenas de la proteína son indistinguibles en cuanto a las modificaciones postraduccionales. La única diferencia entre ellas parece residir en la conformación tridimensional de su estructura. La proteína priónica, conformada de forma deficiente, tiende a agregarse y formar fibras helicoidales regulares denominadas *amiloides*. Las fibras de amiloide crecen por sus extremos, de manera parecida a como lo hacen los filamentos proteicos del citoesqueleto que tratamos en el Capítulo 16, excepto por el hecho de que las subunidades proteicas del amiloide sufren un cambio estructural, pasando del plegamiento normal de la proteína a la forma plegada de manera incorrecta a medida que va formando parte del polímero de amiloide (véase la Figura 6–95). En otras palabras, la forma priónica plegada de manera incorrecta posee la notable capacidad de inducir la conformación errónea en la proteína normal, por lo que se convierte en contagiosa, lo cual equivale a la replicación del prión en el huésped. Cuando una de las fibrillas de amiloide es escindida en fragmentos más pequeños, cada uno de ellos puede iniciar el proceso de conversión en una nueva célula y, en consecuencia, el prión tanto puede propagarse como replicarse. Por tanto, estos nuevos priones pueden transmitir la infección de un organismo a otro si son ingeridos por un huésped susceptible.

No sabemos de qué forma la mayoría de las proteínas normales pueden alcanzar, entre miles de millones de otras posibilidades, el plegamiento conformacional correcto sin quedarse atascadas en conformaciones intermedias no funcionales (descrito en los Capítulos 3 y 6). Los priones constituyen un buen ejemplo de cómo el plegamiento de las proteínas puede resultar peligrosamente fatal. Pero entonces, ¿por qué son tan raras las enfermedades priónicas? o ¿cuáles son las restricciones que determinan que una proteína mal conformada se comporte como un prión o, sencillamente, vuelva a plegarse o sea degradada por la propia célula que la produjo? Por el momento no disponemos de respuestas para estas preguntas, pero el estudio de priones se mantiene como un área de intensa investigación.

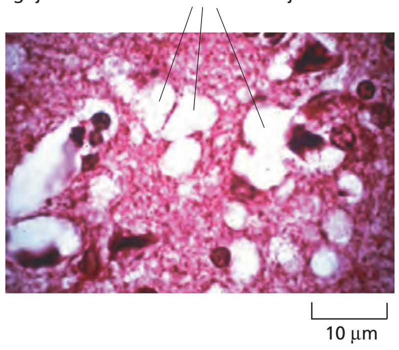


Figura 24–18 Degeneración neuronal a causa de la infección por priones. La microfotografía muestra una sección del cerebro de una persona fallecida por kuru. Se trata de una enfermedad humana muy semejante a la BSE que se transmite entre personas debido a la práctica de ciertos rituales funerarios en Nueva Guinea. Los agujeros repletos de fluido son las áreas de muerte neuronal. Estos característicos agujeros constituyen el motivo por el que las enfermedades neurológicas causadas por priones son denominadas encefalopatías espongiformes. (Cortesía de Gary Baumbach.)

Los agentes infecciosos están relacionados con el cáncer, las enfermedades cardíacas y otras enfermedades crónicas

Hasta ahora, tan sólo se ha considerado los microorganismos en su rol de agentes causantes de enfermedades infecciosas. Sin embargo, es evidente que en muchos casos las infecciones víricas y bacterianas pueden contribuir a la patogénesis de graves enfermedades que no son clasificadas como infecciosas. Un ejemplo es el cáncer. El concepto de oncogén, según el cual algunos genes alterados pueden provocar la transformación celular y el desarrollo de tumores, tiene su inicio en los estudios de la infección por el *virus del sarcoma de Rous*, el cual produce un tipo de cáncer (sarcoma) en pollos. Finalmente, se observó que uno de los genes del virus codificaba para un homólogo, especialmente activo, de la tirosina quinasa Src del huésped, el cual ya había sido relacionado con numerosos tipos de cáncer.

Aunque el virus del sarcoma de Rous no causa cáncer en la especie humana, hoy se sabe que diversos cánceres humanos tienen un origen vírico. El *papilomavirus humano*, por ejemplo, causante de verrugas genitales, también es la causa de más del 90% de cánceres de cuello de útero. A nivel mundial, el cáncer cervical es la segunda causa de cáncer en la mujer y tiene una tasa de mortalidad de alrededor del 40%. En países ricos, la amplia utilización del método de Papanicolau ha reducido la incidencia y gravedad del cáncer cervical, aunque todavía es muy común en los países en desarrollo. El desarrollo reciente de una vacuna contra las cepas más comunes de papilomavirus incrementa la esperanza de que esta forma de cáncer pueda ser prevenida ampliamente con una medida sencilla y barata.

El *virus de Epstein-Barr (EBV)* constituye un ejemplo más complejo de cáncer humano relacionado con una infección vírica. La infección por este virus es tan común que cerca del 90% de los ciudadanos de Estados Unidos con edades superiores a los 40 años presentan niveles detectables de anticuerpos anti-EBV en sangre. El virus EBV muestra su preferencia por infectar los linfocitos B del sistema inmunitario adquirido, especialmente los longevos linfocitos B de memoria (tratados en el Capítulo 25). La mayoría de los niños infectados ignoran que lo están ya que presentan pocos síntomas. Sin embargo, tanto los adolescentes como los jóvenes adultos infectados por primera vez, a menudo desarrollan *mononucleosis infecciosa* (también denominada *fiebre glandular*), una grave enfermedad semejante a la gripe que se desarrolla con fiebre alta, hinchazón dolorosa de los ganglios linfáticos y cansancio, que pueden persistir durante meses. Tras la remisión de los síntomas, el virus EBV puede permanecer latente en los linfocitos B durante toda la vida, con su genoma en forma de plásmido extracromosómico en el núcleo de estas células. Alguno de los productos génicos codificados por el genoma vírico inhibe la apoptosis, evitando, por tanto, que el virus sea eliminado del organismo. De esta manera, cuando un linfocito B adquiere mutaciones que facilitan el desarrollo de cáncer, el mecanismo habitual de eliminación de las células precursoras de cáncer mediante apoptosis es inhibido, y se puede desarrollar un tipo de cáncer de linfocitos B denominado linfoma de Burkitt.

En algunos casos, el daño tisular crónico provocado por una infección incrementa la probabilidad de que se desarrolle un cáncer en el tejido infectado. Así, la bacteria residente en el estómago, *Helicobacter pylori*, es una de las principales causas tanto de cáncer como de úlceras gástricas y los *virus de la hepatitis*, causantes de infecciones hepáticas crónicas (hepatitis crónica), se relacionan con más del 60% de los cánceres de hígado.

Junto con el cáncer, la otra causa de muerte más común en los países ricos e industrializados son las enfermedades cardiovasculares, las cuales a menudo son provocadas por la *arteriosclerosis*, es decir, la acumulación de depósitos grasos en las paredes de los vasos sanguíneos que pueden llegar a obstruir el flujo sanguíneo. La isquemia resultante tiene consecuencias nefastas tanto para el corazón como para el cerebro. Una característica del inicio de la arterioesclerosis es la aparición en las paredes de los vasos de agregados de macrófagos con morfologías extrañas, denominadas células espumosas, ya que están repletas de gotas lipídicas. Las células espumosas secretan citoquinas que reclutan otros leucocitos a la *placa arterioesclerótica* acumulando, además, matriz extracelular. La continua acumulación de células y matriz puede bloquear de forma gradual el flujo sanguíneo o provocar el desprendimiento de la placa, dando lugar a un trombo que bloquea instantáneamente el flujo sanguíneo; además, fragmentos del trombo pueden llegar a obstruir pequeños vasos sanguíneos periféricos. Sorprendentemente, a menudo las células espumosas de las placas arterioscleróticas contienen la bacteria patógena *Chlamydia pneumoniae*, que por lo general causa neumonía en la especie humana (**Figura 24–19**). Numerosas líneas de evidencia sugieren que la infección por *C. pneumoniae* es un factor de riesgo significativo para la arteriosclerosis, tanto en personas como en modelos de experimentación en animales. Así mismo, en las placas arterioscleróticas también se ha encontrado ADN de otras especies bacterianas que habitualmente están relacionadas con dientes y encías, tales como *Porphy-*

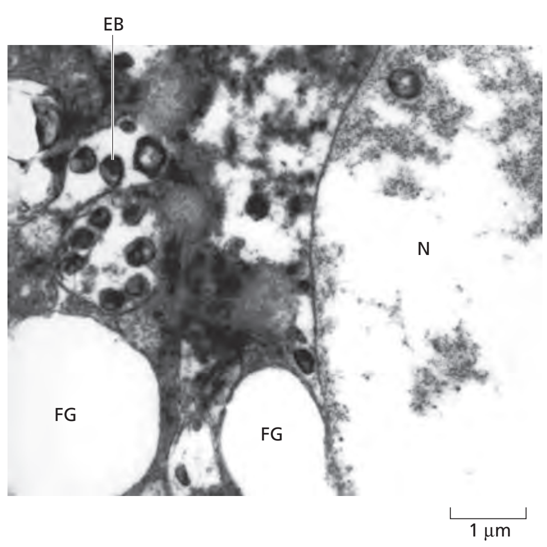


Figura 24–19 ***Chlamydia pneumoniae*** **en el interior de un macrófago de tipo espumoso típico de una placa arteriosclerótica.** Las etiquetas de esta electromicrografía indican: EB, cuerpo elemental (bacteria); FG, gota lipídica; N, núcleo del macrófago. (De L.A. Campbell y C.C. Kuo, *Nat. Rev. Microbiol*. 2:23-32, 2004. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

romonas gingivalis. En la actualidad, la conexión entre agentes infecciosos y arterioesclerosis es un área de investigación activa.

Además de su conexión con las graves enfermedades cardiovasculares y el cáncer, parece que los agentes infecciosos también desempeñan un papel importante en muchas enfermedades crónicas, aunque es difícil saber si lo que causa la enfermedad es la infección o, por el contrario, es el desarrollo de la enfermedad lo que favorece la infección. Un caso claro de infección como causa de una enfermedad crónica es la *enfermedad de Lyme*, una infección bacteriana causada por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*. La infección está causada por la picadura de una garrapata y si no es tratada rápidamente con antibióticos puede causar una dolorosa artritis crónica. Otras infecciones bacterianas, especialmente las debidas a cocos Gram-positivos y a bacterias carentes de pared, denominadas *Mycoplasma*, también inducen respuestas inmunitarias que causan artritis. En algunas personas, *Mycoplasma*, *Chlamydia pneumoniae*, o ambas, se relacionan con el asma crónico. Cuanto más conocemos acerca de las complejas interacciones entre patógenos y la especie humana, más enfermedades crónicas parecen tener una relación con un agente infeccioso. Tal como se ha comprobado con las úlceras pépticas, curando la infección se puede curar la enfermedad o, como mínimo, aliviar los síntomas dolorosos.

Resumen

Las enfermedades infecciosas están causadas por agentes patógenos, entre los que se cuentan bacterias, hongos, protozoos, nematodos, virus e incluso proteínas contagiosas llamadas priones. Todos los agentes patógenos deben tener mecanismos que les permitan infectar el huésped y evitar su inmediata destrucción. La mayoría de las bacterias no son patógenas. Las que lo son contienen genes de virulencia específicos que median interacciones con el huésped, dando lugar a respuestas por parte de las células huésped que estimulan la proliferación y la diseminación del agente patógeno. Los hongos patógenos, protozoos y otros parásitos eucariotas adoptan diversas formas a lo largo del curso de la infección. Habitualmente, el tránsito por esas diferentes formas es una condición necesaria para asegurar tanto la supervivencia de los parásitos en el huésped como para causar la enfermedad. En algunos casos, como la malaria, para completar sus ciclos biológicos los parásitos han de infectar de manera secuencial diversas especies de huéspedes. A diferencia de las bacterias y de los parásitos eucariotas, los virus carecen tanto de metabolismo propio como de capacidad intrínseca para sintetizar las proteínas codificadas por sus genomas de DNA o RNA. Para producir sus proteínas y replicar sus genomas dependen por completo de la subversión de la maquinaria de la célula huésped. Los priones, los agentes patógenos más pequeños y sencillos, no disponen de ácido nucleico. Por el contrario, se trata de proteínas con una conformación rara, aberrante, que se replican catalizando plegamientos erróneos en proteínas normales de la célula huésped y que poseen la misma secuencia de aminoácidos que el prión.

BIOLOGÍA CELULAR DE LA INFECCIÓN

Los mecanismos que utilizan los patógenos para causar enfermedades son tan diversos como los propios patógenos. No obstante, todos los patógenos tienen que llevar a cabo determinadas tareas comunes a todos ellos: la colonización del huésped, alcanzar un nicho apropiado, evadirse de sus defensas, proliferar en su interior, abandonarlo para diseminarse y, finalmente, infectar nuevos huéspedes. En este apartado se examinarán las estrategias que utilizan buena parte de los patógenos para alcanzar esos objetivos.

Los agentes patógenos atraviesan barreras protectoras para colonizar al huésped

La primera etapa de la infección es la colonización del huésped. La mayor parte del organismo humano está protegido de manera adecuada del medio ambiente mediante la piel, un revestimiento grueso y razonablemente resistente. Las capas protectoras de otras regiones (ojos, fosas nasales, tracto respiratorio, boca, tracto digestivo, tracto urinario y tracto genital femenino) son menos resistentes. Por ejemplo, en los pulmones y en el intestino delgado, donde se produce la absorción del oxígeno y los nutrientes respectivamente, la barrera sólo está constituida por una monocapa de células epiteliales.

La piel y muchas otras barreras epiteliales están extensamente colonizadas por la flora normal. Algunos patógenos, ya sean bacterias u hongos, también colonizan estas superficies e intentan competir con la flora normal, aunque la mayoría de ellos evitan dicha competencia atravesando estas barreras superficiales y accediendo a los nichos no ocupados del interior del huésped.

Las heridas localizadas en estos epitelios barrera facilitan el acceso directo de los patógenos a aquellos nichos. Este tipo de acceso no requiere ninguna gran especialización del patógeno; muchos componentes de la flora normal pueden ser causantes de serios perjuicios si entran a través de esas heridas. Así por ejemplo, las bacterias anaerobias del género *Bacteroides* forman parte de la flora inocua que puebla densamente el intestino grueso, pero pueden ser los causantes de graves peritonitis si acceden a la cavidad peritoneal tras una perforación de la pared intestinal causada por un traumatismo, una intervención quirúrgica, o una infección. Otros géneros bacterianos como *Staphylococcus*, que por lo general se encuentran en la piel y en la nariz, o *Streptococcus*, localizados en la garganta y en la boca, también son responsables de graves infecciones producidas por discontinuidades en las barreras epiteliales.

Sin embargo, los principales patógenos no necesitan esperar a que se produzca una herida para acceder al huésped. Una vía particularmente eficiente que facilita al patógeno el atravesar la piel es mezclarse con la saliva de un artrópodo capaz de producir picaduras. Muchos insectos y garrapatas se nutren mediante la succión de la sangre de mamíferos, mientras que diversos géneros de bacterias, virus y protozoos han desarrollado la capacidad de sobrevivir en el interior de estos artrópodos utilizándolos como *vectores* que facilitan su diseminación de un mamífero a otro. Tal como se describió, el protozoo causante de la malaria, *Plasmodium*, se desarrolla a través de diversas formas a lo largo de su ciclo vital, incluyendo algunas especializadas para la supervivencia en un huésped humano y otras que lo están para sobrevivir en el mosquito (véase la Figura 24–10). Los virus que son diseminados por insectos hematófagos incluyen a los agentes etiológicos de diversas fiebres hemorrágicas, como la fiebre amarilla y el Dengue, así como los causantes de diversos tipos de encefalitis (inflamación cerebral). Todos estos virus han adquirido la capacidad de proliferar tanto en las células de los insectos como en las de los mamíferos, lo cual constituye un requisito para su transmisión por un insecto-vector. Los virus transportados por la sangre como el HIV, que son incapaces de proliferar en células de insecto, difícilmente, si es que lo hacen alguna vez, se diseminan desde los insectos a los humanos.

Para que sea eficiente la diseminación de un patógeno a través de un insecto-vector, se requiere que este insecto consuma sangre de varios huéspedes mamíferos. En algunos casos paradigmáticos parece que el patógeno sea capaz de alterar el comportamiento del huésped para facilitar su transmisión. Como otros animales, la mosca tsé-tsé (cuya picadura disemina el protozoo parásito *Trypanosoma brucei,* causante de la enfermedad del sueño en África) detiene la ingestión cuando se sacia. Sin embargo, las moscas tsé-tsé que contienen tripanosomas pican con mayor frecuencia e ingieren mayor volumen de sangre que las que no están infectadas. Este hecho se debe a que la presencia de tripanosomas provoca la disfunción de los mecanorreceptores del insecto que controlan la sangre ingerida y el llenado del estómago, de modo que la mosca se siente continuamente hambrienta. La bacteria *Yersinia pestis,* causante de la peste bubónica, utiliza un mecanismo diferente para asegurarse que la pulga que la transporta pique de forma repetida: la bacteria se multiplica en el intestino anterior de la pulga formando agregados que, finalmente, obliteran el tubo digestivo. Así, el insecto es incapaz de ingerir con normalidad y empieza un periodo de ayuno forzado. Durante los repetidos intentos para satisfacer su apetito, algunas de las bacterias que se encuentran en el intestino anterior son impelidas hacia el lugar de la picadura transmitiendo así la peste a un nuevo huésped (**Figura 24–20**).

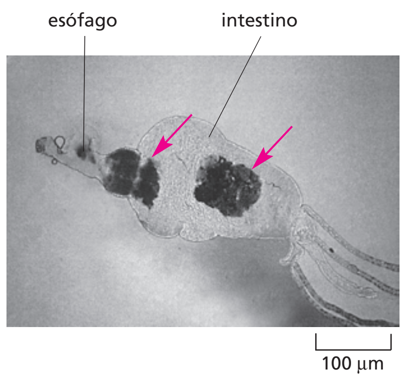


Figura 24–20 Bacterias de la peste en el interior de una pulga. Esta micrografía obtenida mediante microscopía óptica muestra, una vez diseccionado, el tracto digestivo de una pulga dos semanas después de chupar un animal infectado con la bacteria de la peste, *Yersinia pestis*. La bacteria prolifera en el intestino de la pulga formando grandes agregados cohesivos (*flechas rojas*); la masa de la izquierda está obliterando el paso entre el esófago y el intestino. Este bloqueo impide que la pulga pueda alimentarse de la sangre que chupa, de manera que el hambre la induce a picar repetidamente, transmitiendo así la infección. (De B.J. Hinnebusch, E.R. Fischer y T.G. Schwann, *J. Infect. Dis*. 178:1406-1415, 1998. Con la autorización de University Chicago Press.)

Los patógenos que colonizan los epitelios han de evitar su eliminación por parte del huésped

Atravesar la piel mediante la probóscide de un insecto es tan sólo una estrategia que utilizan los patógenos para traspasar las barreras del huésped. Muchas de estas barreras epiteliales, como la piel y los recubrimientos de la boca y del intestino grueso, están densamente pobladas por la flora normal, mientras que otras, como el recubrimiento de las vías aéreas bajas, el intestino delgado o la vejiga urinaria, permanecen casi estériles, a pesar de que mantienen accesos relativamente directos con el medio externo. ¿Cómo evitan estos epite-

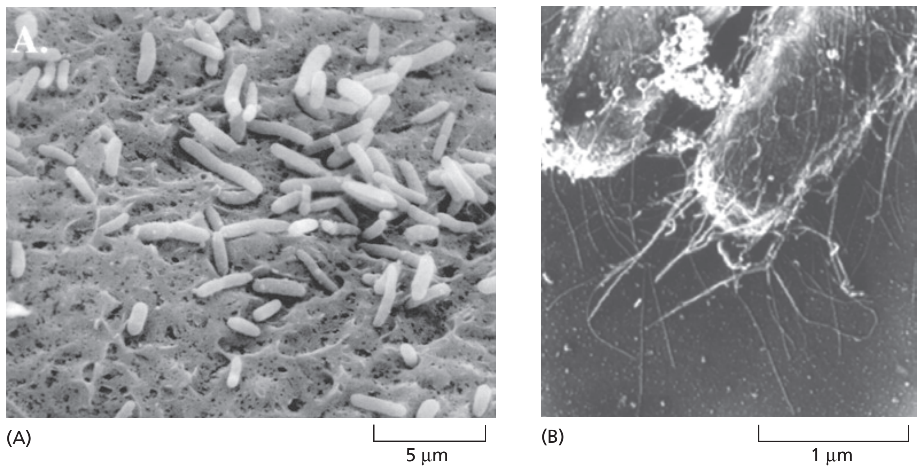


Figura 24–21 ***E. coli* uropatogénica en la vejiga infectada de ratón.** (A) Micrografía, obtenida con el microscopio electrónico de barrido, de *E. coli* uropatogénica, un agente etiológico común de las infecciones de riñón y vejiga. Las bacterias permanecen adheridas a las superficies epiteliales que recubren la vejiga infectada. (B) Una ampliación de la imagen de una bacteria mostrando las fimbrias en su superficie. (A, de G.E. Soto y S.J. Hultgren, *J. Bact.* 181:1059-1071, 1999; B, cortesía de D.G. Thanassi y S.J. Hultgren, *Meth. Comp. Meth. Enzym.* 20:111-126, 2000. Con la autorización de Academic Press.)

lios la colonización bacteriana? Tal como se explicó en el Capítulo 23, el epitelio respiratorio está recubierto por una capa de moco protector que atrapa bacterias y otros restos, eliminándolos del pulmón mediante un movimiento ciliar coordinado. Así mismo, los epitelios que limitan la vejiga y el tracto gastrointestinal también disponen de una gruesa capa de moco; estos órganos se vacían de manera periódica mediante la micción y peristalsis, respectivamente, lo que elimina los microorganismos indeseables. Las bacterias patógenas y los parásitos que infectan estas superficies poseen mecanismos específicos que evitan estos procesos de limpieza por parte del huésped. Así por ejemplo, aquellos que infectan el tracto urinario resisten la acción limpiadora de la orina al adherirse con fuerza al epitelio que recubre el tracto mediante **adhesinas**; estas sustancias son proteínas o complejos proteicos que reconocen y se unen a receptores de la membrana de la célula huésped. En cepas de *E. coli* que infectan el riñón, un importante grupo de adhesinas son componentes de las fimbrias *P*, que facilitan la adhesión de la bacteria a las células epiteliales del riñón. Dado que estas proyecciones superficiales pueden alcanzar varios micrómetros, permiten superar con facilidad el grosor de la capa de moco (véase la Figura 24–4D). En el extremo de cada fimbria se encuentra una adhesina que se une fuertemente a un disacárido perteneciente a un glucolípido expresado en la membrana de las células de riñón. Las cepas de *E. coli* que infectan con preferencia la vejiga al riñón expresan un segundo tipo de fimbria que les permite adherirse a las células del epitelio de la vejiga. Es la especificidad de las adhesinas localizadas en los extremos de las fimbrias la que determina la colonización bacteriana de las diferentes partes del tracto urinario (**Figura 24–21**). La especificidad de las adhesinas también restringe el abanico de huéspedes para éstas y otras muchas bacterias patógenas.

Uno de los órganos que presenta mayor resistencia a la colonización bacteriana es el estómago. Aparte del lavado peristáltico y la protección de una gruesa capa de moco, el medio estomacal es ácido (pH medio ~2). Este ambiente extremo es letal para la mayoría de las bacterias ingeridas con los alimentos. Pese a ello, el estómago está colonizado por *Helicobacter pylori*, una bacteria muy resistente que tan sólo muy recientemente ha sido identificada como el principal agente causante de las úlceras gástricas y, en algunos casos, del cáncer de estómago. Sorprendentemente, la bacteria es capaz de resistir de por vida como un comensal inocuo en la mayoría de sus huéspedes. Aunque los antiguos tratamientos para la úlcera (fármacos que disminuyen la secreción ácida y dietas suaves) todavía se utilizan para reducir la inflamación, un protocolo antibiótico corto y barato permite curar, de una manera efectiva, las úlceras recurrentes. La hipótesis de que las úlceras podían ser causadas por una infección persistente del epitelio gástrico topó, al principio, con una gran dosis de escepticismo. El joven doctor australiano que había realizado el descubrimiento demostró de forma definitiva su hipótesis: ingirió un frasco de cultivo de *H. pylori* y desarrolló una gastritis. Uno de los motivos por los que *H. pylori* sobrevive en el estómago es la expresión de la enzima *ureasa*, que convierte la urea en amoníaco y dióxido de carbono; de esta manera, la bacteria se rodea de amoníaco, que neutraliza el ácido en su entorno más inmediato. Además, la bacteria expresa un mínimo de cinco tipos de adhesinas, las cuales facilitan su adhesión al epitelio del estómago, así como diversas toxinas que destruyen parte de este epitelio dando lugar a dolorosas úlceras. La inflamación crónica resultante induce la proliferación celular y predispone así al individuo infectado a padecer cáncer gástrico.

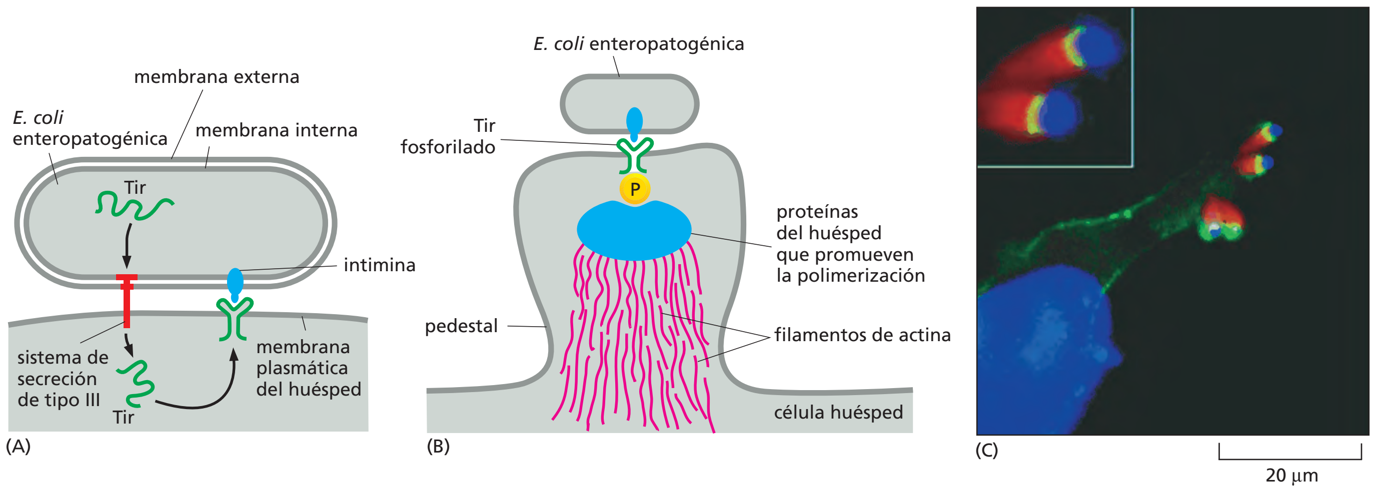


Figura 24–22 Interacción de *E. coli* enteropatogénica (EPEC) con las células huésped del intestino. (A) Cuando la EPEC entra en contacto con una célula epitelial del intestino humano, inyecta la proteína Tir a través de un sistema de secreción de tipo III. Posteriormente, Tir se inserta en la membrana donde ejercerá de receptor de la adhesina bacteriana intimina. (B) Una proteína tirosina quinasa de la célula huésped fosforila residuos de tirosina en el dominio intracelular. A su vez, Tir fosforilado recluta diversas proteínas de la célula huésped, lo que desencadenará la polimerización de actina. En consecuencia, bajo la bacteria se van acumulando filamentos de actina, que formarán un pedestal. (C) EPEC sobre un pedestal de actina. En esta micrografía de fluorescencia, el DNA de EPEC y del huésped están marcados en *azul*, la proteína Tir lo está en *verde* y los filamentos de actina del huésped en *rojo*. El recuadro muestra con detalle dos bacterias sobre sus pedestales. (C, de D. Goosney et al., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 16:173-189, 2000. Con la autorización de Annual Reviews.)

Bordetella pertussis, la bacteria causante de la tos ferina, proporciona el ejemplo más extremo de colonización activa. El primer paso en la infección por *B. pertussis* es la colonización del epitelio respiratorio. La bacteria sortea el mecanismo normal de eliminación que limpia el tracto respiratorio (la *escalera mucociliar* descrita en el Capítulo 23), uniéndose fuertemente a la superficie de las células ciliadas que recubren el tracto y proliferando sobre ellas. *B. pertussis* expresa un mínimo de cuatro tipos de adhesinas que se unen con fuerza a determinados glucolípidos que expresan las células ciliadas. Una vez adheridas, las bacterias producen toxinas que finalmente provocan la muerte de las células ciliadas y disminuyen la capacidad del huésped para eliminar la infección. La toxina más conocida de éstas es la *toxina pertúsica*, la cual –como la toxina colérica– es una enzima que transfiere grupos ADP-ribosilo. De esta forma modifica la subunidad α de la proteína G_i, inhibiendo la proteína G que suprime la actividad de la adenilato ciclasa de la célula huésped e incrementa por tanto, la producción de AMP cíclico (tratado en el Capítulo 15). Esta toxina también interfiere la vía quimiotáctica que utilizan los neutrófilos para detectar y destruir las bacterias durante la infección (véase Figura 16–101). *B. pertussis* también expresa una adenilato ciclasa propia que se activa sólo cuando, en el citoplasma del huésped, se une a la proteína eucariota calmodulina, un receptor intracelular de Ca^{2+}. Además *B. pertussis* y *V. cholerae* producen una adenilato ciclasa que sólo es activa cuando se une a la calmodulina –proteína de unión a calcio– del citoplasma de la célula huésped. A pesar de que tanto *B. pertussis* como *V. cholerae* incrementan en gran medida los niveles citoplasmáticos de AMP cíclico en las células a las que se adhieren, los síntomas producidos por ambas son muy diferentes, ya que las dos colonizan regiones diferentes del huésped: mientras *B. pertussis* coloniza el tracto respiratorio y produce ataques paroxísticos de tos, *V. cholerae* coloniza el intestino y da lugar a diarrea acuosa.

En los casos de colonización específica no siempre se requiere la expresión de adhesinas bacterianas para que interaccionen con proteínas y glicolípidos de la célula huésped. Así, cepas enteropatógenas de *E. coli*, causantes de diarreas infantiles, utilizan un sistema de secreción de tipo III (véase Figura 24–8) para transferir su propio receptor proteico (denominado Tir) a la célula huésped (**Figura 24–22**A). Una vez insertado en la membrana de la célula huésped, el dominio extracelular de Tir reconoce una proteína de la superficie bacteriana y desencadena una serie de procesos importantes en el citoplasma de aquélla. En primer lugar, el receptor Tir es fosforilado por una tirosina quinasa del huésped, lo cual es inusual dado que las bacterias no tienen capacidad para fosforilar estos residuos en las proteínas. Parece que una vez fosforilado, Tir recluta un miembro de la familia de GTPasas Rho, el cual estimula y dirige la polimerización local de actina a través de diversas etapas intermedias (descrito en el Capítulo 16). A continuación, la actina polimerizada forma una única protrusión membranosa denominada *pedestal*, que empuja a la bacteria, fuertemente unida a la misma, hasta unos 10 μm de la superficie de la célula huésped (Figura 24–22B, C).

Estos ejemplos de colonización del huésped ilustran la importancia de la comunicación huésped-patógeno tanto en el proceso de infección como en su evolución. Los organismos patógenos han adquirido genes que codifican proteínas que interactúan de forma específica con moléculas particulares de las células del huésped. En algunos casos, como el de la adenilato ciclasa de *B. pertussis*, un ancestro del patógeno debió adquirir el gen de la ciclasa

de su huésped, mientras que en otros casos, como en el de Tir, mutaciones al azar debieron producir motivos proteicos que son reconocidos por una tirosina quinasa eucariota.

Los patógenos intracelulares disponen de mecanismos tanto para entrar como para abandonar las células huésped

Muchos agentes patógenos, como *V. cholerae y B. pertussis,* infectan a su huésped sin necesidad de entrar en las células del mismo; son denominados *patógenos extracelulares*. Otros, sin embargo, como virus y numerosas especies de bacterias y protozoos, son **patógenos intracelulares**. Sus nichos preferidos para proliferar y sobrevivir son tanto el citosol como cualquiera de los compartimientos de determinadas células del huésped. Esta estrategia presenta algunas ventajas, ya que los patógenos no son accesibles a los *anticuerpos* (descrito en el Capítulo 25), como tampoco lo son a las células fagocitarias (se trata más adelante). Además están inmersas en un medio rico en glúcidos, aminoácidos y otros nutrientes como es el citoplasma de la célula huésped. Sin embargo, este estilo de vida requiere que el patógeno desarrolle mecanismos que le permitan acceder al interior celular donde debe encontrar un nicho favorable que facilite su proliferación y, finalmente, le permitan abandonar la célula para diseminar la infección. Así pues se dedicará el resto del apartado a estudiar algunas de las miles de vías de las células huésped que los patógenos intracelulares utilizan y modifican para satisfacer estos requisitos.

Las partículas víricas se adhieren a moléculas expresadas en la superficie de las células huésped

La primera etapa para cualquiera de los patógenos intracelulares es la adhesión a la superficie de la célula huésped. Los virus cumplen con este requisito a través de la asociación de una proteína de la superficie vírica con un receptor específico de la superficie celular. Evidentemente, estos receptores tienen otras funciones y no han evolucionado con el fin de permitir el anclaje de un patógeno. El primero de tales “receptores víricos” en ser identificado fue la proteína de *E. coli* que facilita la adhesión del bacteriófago lambda a la bacteria. En este caso, su función normal es la de facilitar la captación de maltosa por la bacteria. Sin embargo, los receptores no siempre son proteínas; así, por ejemplo, los virus que causan herpes simple se unen a proteoglicanos de heparán sulfato a través de proteínas específicas de la membrana vírica.

Los viriones que infectan células animales utilizan como receptores moléculas de la superficie celular que son muy abundantes (como los oligosacáridos que contienen ácido siálico, en el caso de los virus de la gripe) o sólo se expresan en las células que les permiten la proliferación (como el receptor para NGF, el receptor nicotínico para la acetilcolina, o la proteína de adhesión intercelular N-CAM, todos ellos utilizados por el virus de la rabia para infectar neuronas de manera específica). A menudo, muchos tipos de virus utilizan un único tipo de receptor, aunque un determinado virus puede utilizar también diversos receptores. Incluso diferentes virus que infectan una misma célula utilizan receptores diferentes. Así por ejemplo, se han identificado un mínimo de seis familias de virus que se replican de manera preferente en las células del hígado (hepatocitos) y causan, por tanto, hepatitis. Se ha identificado los receptores para cuatro de estos virus y han resultando ser diferentes. Por otra parte, muchos viriones se unen a receptores expresados en las células del sistema inmune; la paradoja es que al inducir una respuesta inmunitaria deberíamos esperar que el virus disminuyera su supervivencia y, sin embargo, el resultado es que la aumenta. Este hecho se debe a que la infección de una célula del sistema inmunitario resulta un mecanismo muy útil para recorrer el organismo y alcanzar los órganos linfáticos, los cuales están repletos de otras células inmunitarias que pueden ser infectadas.

Con frecuencia, los viriones requieren tanto un receptor primario como otro secundario para poder adherirse y entrar de forma eficiente en las células huésped. Un buen ejemplo de ello es el virus del sida, el HIV. Su receptor primario es CD4, una proteína de la superficie celular de linfocitos T colaboradores y de macrófagos que se encuentra involucrada en el reconocimiento inmunitario (descrito en el Capítulo 25). Sin embargo, la entrada del virus requiere de un correceptor, ya sea CCR5 (un receptor para β-quimioquinas) o CXCR4 (un receptor para α-quimioquinas), dependiendo de la variante del virus de que se trate (**Figura 24–23**). Los macrófagos sólo son sensibles a las variantes de HIV que utilizan

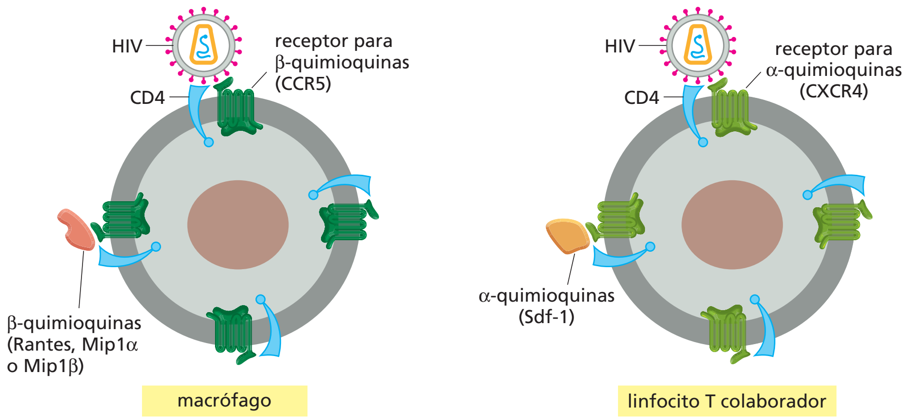


Figura 24–23 Receptor y correceptores de HIV. Todas las cepas de HIV requieren la proteína CD4 como receptor primario. En una etapa temprana de la infección, la mayoría de los virus utilizan CCR5 como correceptor, lo que les permite infectar macrófagos y sus precursores monocitarios. A medida que la infección progresa, se originan variantes víricas por mutación que utilizan CXCR4 como correceptor, permitiéndoles entonces infectar eficientemente linfocitos T colaboradores. Los ligandos naturales de ambos receptores (Sdf1 para CXCR4; Rantes, Mip1α o Mip1β para CCR5) bloquean la función de los correceptores y evitan la invasión vírica.

como correceptor CCR5, mientras que los linfocitos T colaboradores son más susceptibles a las variantes que utilizan CXCR4. Los virus aislados en los primeros meses tras la infección por HIV muestran, invariablemente, una dependencia de CCR5, lo cual explicaría por qué aquellas afortunadas personas que son deficientes para el gen *Ccr5* también son resistentes a la infección. Sin embargo, en estadios avanzados de la enfermedad, los virus pueden cambiar y utilizar CXCR4 como correceptor o, incluso, utilizar ambos correceptores. De esta manera el virus puede cambiar los tipos celulares que infecta mientras la enfermedad progresa.

Los viriones entran en las células huésped mediante la fusión de membranas, la formación de poros o la disrupción de la membrana

Tras el reconocimiento y la adhesión a la célula huésped, las siguientes etapas que siguen los viriones son la entrada en la célula y la liberación de su genoma de la cubierta proteica que lo protege y, en algunos casos, de la envoltura membranosa. Por lo general, el ácido nucleico liberado permanece acomplejado con algunas proteínas víricas. Los **virus con envoltura** entran en la célula huésped fusionándose directamente con la membrana plasmática o con la membrana endosómica tras la endocitosis (**Figura 24–24**A, B). Se cree que la fusión membranosa tiene lugar a través de un mecanismo semejante a la fusión de vesículas intracelulares, dependiente de proteínas SNARE, que se produce durante el tráfico de membrana intracelular (véase Capítulo 13). <ATAG>

Los virus regulan la fusión no solamente asegurando que sus partículas sólo se fusionen con la membrana adecuada de la célula huésped sino también evitando la fusión entre las propias partículas. En el caso de virus como el HIV, que fusiona su envoltura lipídica con la membrana de la célula huésped a pH neutro, es habitual que la unión a los receptores o correceptores produzca un cambio conformacional en una proteína de la envoltura vírica que provoca la exposición de un péptido fusiogénico oculto (véase la Figura 13–16). Otros virus con envoltura, como el de la gripe, sólo se fusionan con la membrana de la célula huésped hasta que tiene lugar la endocitosis. En este caso, es el medio ácido de los endosomas tempranos el que estimula el cambio conformacional que facilitará la exposición del péptido fusiogénico (véase la Figura 24–24B). Los H^+ bombeados al interior del endosoma penetran en la partícula del virus a través de un canal iónico provocando la *pérdida de la cubierta* del RNA vírico, el cual es liberado de manera directa en el citoplasma cuando el virus se fusiona con la membrana endosómica. Sin embargo, algunos virus pierden su cubierta una vez instalados en el citoplasma. Es el caso, por ejemplo, del virus Semliki Forest, en el que la interacción entre los ribosomas del huésped y la cápside provoca la separación del genoma de las proteínas de la cubierta.

Es más difícil hacerse una idea de cómo entran en las células huésped los **virus sin envoltura**, ya que no se entiende cómo estos grandes complejos de proteína y ácido nucleico pueden atravesar las membrana plasmática o endosómica. A pesar de que se desconoce el mecanismo de entrada, sabemos que los virus sin envoltura forman un poro en la membrana plasmática inyectando su genoma en el citoplasma o desorganizan localmente la membrana endosomal tras la endocitosis.

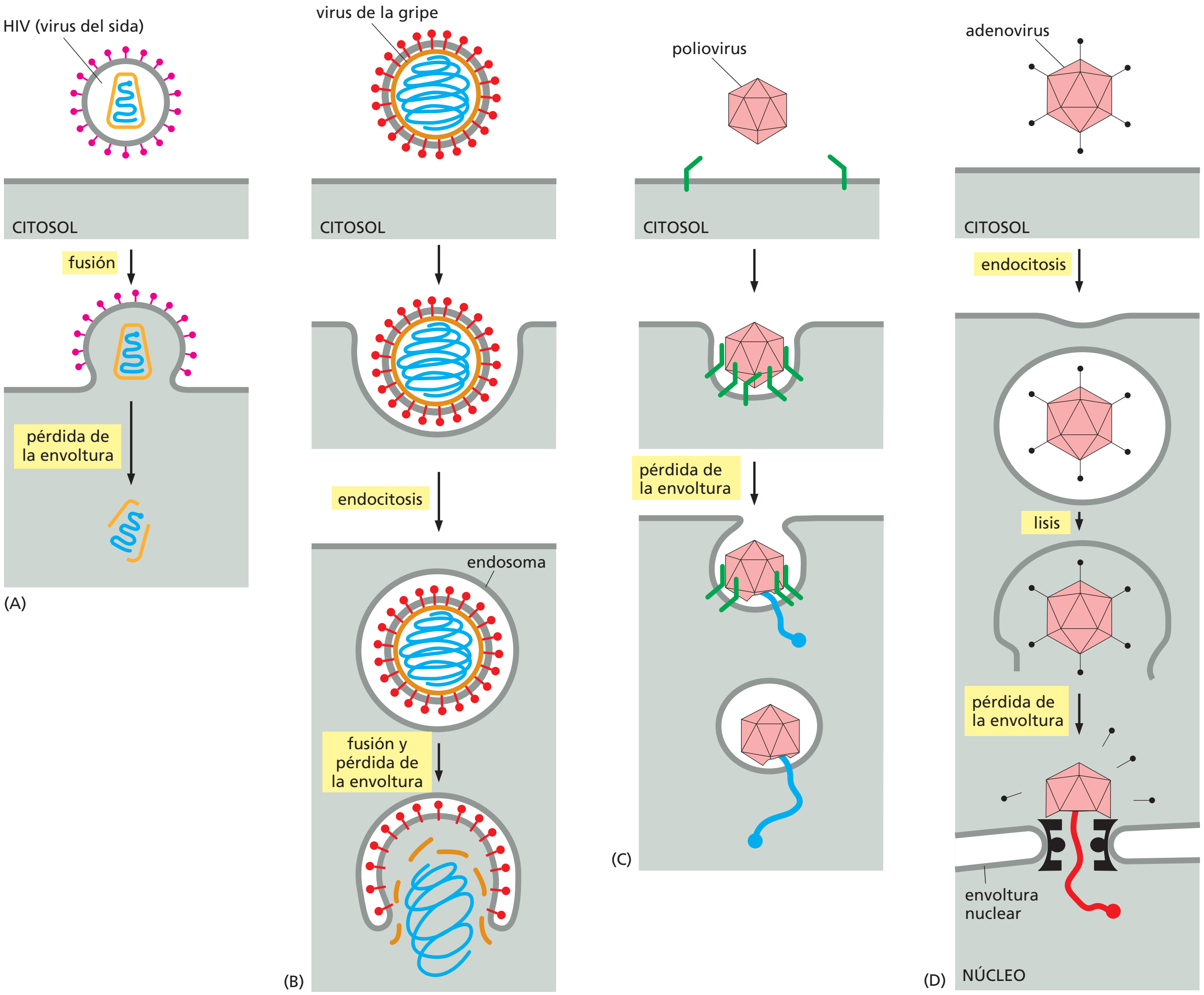


Figura 24–24 Cuatro estrategias para liberar el genoma vírico. (A) Algunos virus con envoltura, como HIV, fusionan directamente esta envoltura con la membrana del huésped, liberando en el citosol su genoma (*azul*) y las proteínas de la cápside (*anaranjado*). (B) Otros virus con envoltura, como el de la gripe, primero se unen a receptores de superficie provocando su endocitosis. Cuando el endosoma se acidifica, el virus fusiona su envoltura con la membrana endosomal y libera el genoma vírico (*azul*) y las proteínas de la cápside (*anaranjado*) en el citosol. (C) Los poliovirus, que no poseen envoltura, se unen a un receptor (*verde*) de la membrana del huésped, formando un poro (no mostrado) en esta membrana por donde liberarán su genoma de RNA (*azul*). (D) Los adenovirus, también sin envoltura, siguen una estrategia más complicada. Inducen una endocitosis mediada por receptor y desorganizan la membrana endosomal liberando en el citosol parte de la cápside y su genoma de DNA. El virus aligerado queda anclado finalmente en un poro nuclear, liberando su DNA (*rojo*) de forma directa en el interior del núcleo.

Los *poliovirus* utilizan la primera estrategia. La interacción del virus con su receptor provoca un proceso de endocitosis mediada por receptor, así como un cambio conformacional en la partícula vírica. Como consecuencia, queda expuesta una región hidrofóbica de una de las proteínas de la cápside la cual se inserta en la membrana endosómica formando un poro. Este proceso conduce a la liberación del genoma vírico en el citoplasma y al abandono de la cápside en el endosoma, la membrana plasmática o en ambas localizaciones (véase la Figura 24–24C).

Por el contrario, los *adenovirus* utilizan la segunda estrategia. Así, tras su endocitosis mediada por receptor, y mientras el endosoma madura y va acidificándose, el virus va perdiendo su cubierta al ser extraídas de manera secuencial las proteínas que forman la cápside. Alguna de estas etapas necesita de la intervención de una proteasa vírica, la cual se mantiene inactiva mientras la partícula es extracelular (probablemente debido a la presencia de enlaces disulfuro), pero que se activa en el ambiente reductor del endosoma. Una de

las proteínas liberadas de la cápside, lisa la membrana endosomal liberando los restos de virus en el citoplasma. Este virus, parcialmente desorganizado, queda anclado sobre un complejo de poro nuclear y transporta a través del mismo su DNA genómico al interior del núcleo, donde será transcrito (véase la Figura 24–24D).

En todas estas estrategias, los virus aprovechan una gran variedad de moléculas y procesos de la célula huésped, los cuales incluyen elementos de la superficie celular, endocitosis mediada por receptor, etapas de la maduración endosómica y transporte nuclear. De nuevo, estas estrategias ilustran las sofisticadas vías que han evolucionado en los patógenos con el fin de utilizar la biología celular básica de sus huéspedes.

Las bacterias entran en la célula huésped por fagocitosis

Las bacterias tienen un mayor tamaño que los virus, por lo que son demasiado grandes para ser endocitadas a través de poros o por medio de un receptor. En lugar de ello, las bacterias acceden al interior celular mediante fagocitosis; ésta es una función habitual de los macrófagos, que patrullan los tejidos del organismo endocitando y destruyendo microorganismos indeseados. Sin embargo, algunos patógenos han adquirido la capacidad de sobrevivir y proliferar en el interior de los macrófagos una vez fagocitados.

Mycobacterium tuberculosis es uno de estos patógenos. Tal como se indicó, es el agente etiológico de la **tuberculosis**, una grave infección pulmonar muy extendida en algunas poblaciones urbanas. Habitualmente esta bacteria alcanza los pulmones por inhalación, donde será fagocitada por macrófagos alveolares. Aunque la bacteria puede sobrevivir y proliferar en el interior de los macrófagos, en la mayoría de personas sanas los macrófagos detienen la infección dentro de los límites de una lesión llamada *tubérculo*, con la colaboración del sistema inmunitario adquirido. Por lo general, la lesión queda delimitada por una cápsula fibrosa que finalmente se calcifica, por lo que es fácil observarla mediante una radiografía pulmonar. Una característica extraordinaria de *M. tuberculosis* es su capacidad para sobrevivir durante décadas dentro de los macrófagos presentes en tales lesiones. Posteriormente, la infección puede ser reactivada si el sistema inmunitario se debilita a causa de una enfermedad o por la ingesta de fármacos, pudiéndose propagar por el pulmón e incluso alcanzar otros órganos.

Mientras la tuberculosis ha infectado a las poblaciones humanas durante miles de años, otra bacteria que también vive en el interior de macrófagos alveolares sólo fue reconocida como agente patógeno a partir de 1976. Esta bacteria, *Legionella pneumophila,* es un parásito habitual de amebas de agua dulce, las cuales la endocitan mediante fagocitosis. Cuando gotitas de agua que contienen *L. pneumophila* o amebas infectadas por esta bacteria son inhaladas y alcanzan el pulmón, las bacterias pueden infectar y vivir dentro de los macrófagos alveolares (**Figura 24–25**) que, para las bacterias, deben ser similares a grandes amebas. La infección por esta bacteria conduce a la neumonía conocida como **enfermedad del legionario**. Habitualmente el agente patógeno es diseminado por los sistemas de aire acondicionado centralizados, ya que las amebas, que son el huésped normal de la bacteria, están especialmente adaptadas para colonizar las torres de refrigeración de estos sistemas, los cuales, además, producen microgotas de agua que son inhaladas con facilidad. La incidencia de la enfermedad del legionario ha aumentado de manera drástica en las últimas décadas, provocando brotes epidémicos que se asocian al funcionamiento de los sistemas de aire acondicionado instalados en edificios de oficinas, hospitales y hoteles. Otras formas modernas de formación de aerosoles, como son las fuentes decorativas y los nebulizadores de los supermercados, también son responsables de algunos brotes de la enfermedad.

Algunas bacterias invaden células que normalmente no tienen capacidad fagocitaria. Una vía por la que las bacterias pueden inducir en tales células su fagocitosis es expresando una adhesina que se une a una proteína de adhesión de la célula huésped, que por lo general media la adhesión intercelular o con la matriz (descrito en el Capítulo 19). Así, por ejemplo, una bacteria causante de diarrea como *Yersinia pseudotuberculosis* (un pariente cercano de la bacteria de la peste *Yersinia pestis),* expresa una proteína denominada *invasina* que es reconocida por las integrinas β1, mientras que *Listeria monocytogenes,* una bacteria causante de una rara y grave intoxicación alimentaria, expresa una proteína que reconoce E-cadherina. La unión de las proteínas bacterianas con las proteínas transmembrana de adhesión confunde a la célula huésped que intenta formar en esta área un complejo de unión, por lo que moviliza actina y otros componentes citoesqueléticos hacia el lugar de la adhesión bacteriana. Dado que la bacteria es más pequeña que la célula huésped, el intento de

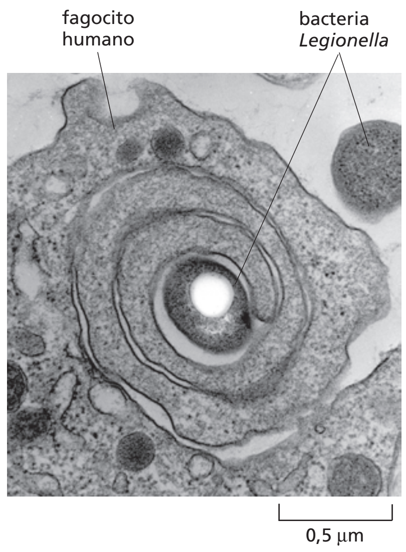


Figura 24–25 Captura de *Legionella pneumophila* por un fagocito humano. Esta micrografía obtenida mediante el microscopio electrónico de transmisión muestra la extraordinaria estructura enroscada que es inducida por la bacteria en la superficie de la célula fagocitaria. Otros patógenos, como la bacteria *Borrelia burgdorferi*, causante de la enfermedad de Lyme, el patógeno eucariota *Leishmania* y la levadura *Candida albicans*, pueden infectar células utilizando este tipo de fagocitosis (De M.A. Horwitz, *Cell* 36:27-33,1984. Con la autorización de Elsevier.)

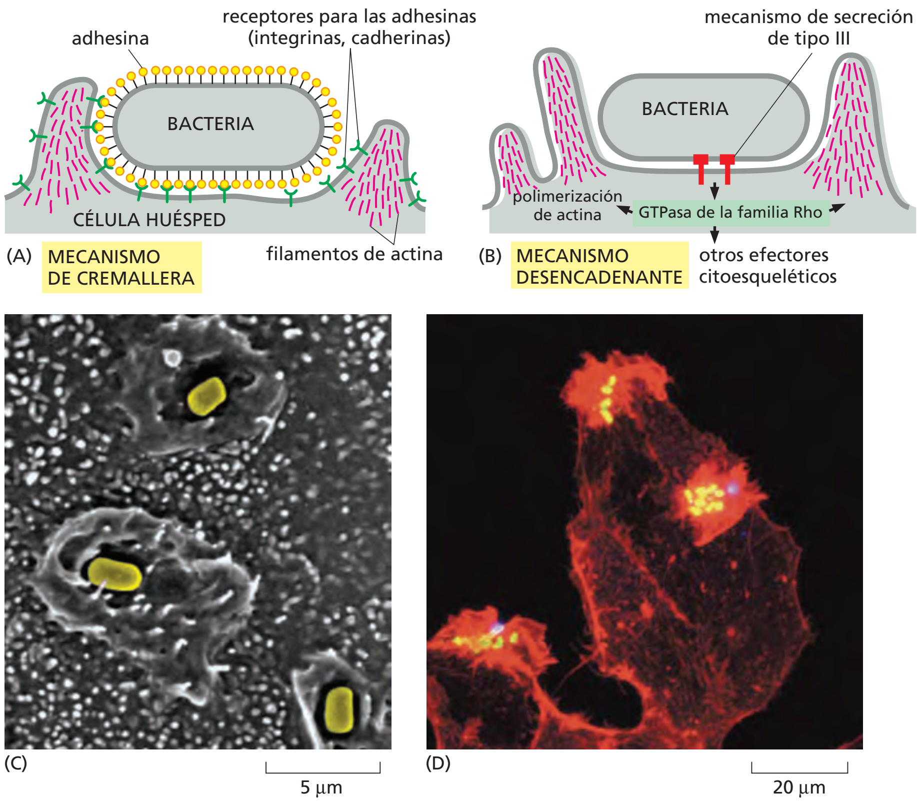


Figura 24–26 Mecanismos utilizados por las bacterias para inducir fagocitosis en células que no son fagocitarias. Los mecanismos fagocitarios de cremallera (A) e inductor (B) activados por los patógenos requieren la polimerización de actina en el lugar de entrada de la bacteria. (C) Micrografía obtenida con un microscopio de barrido que muestra un estadio muy precoz de la infección de *Salmonella enterica* mediante el mecanismo inductor. Cada una de las bacterias (identificadas por el falso color *amarillo*) es rodeada por una pequeña ondulación. (D) Micrografía de fluorescencia demostrando que es la actina la que organiza las gigantescas ondulaciones que endocitan las bacterias de *Salmonella*. Las bacterias están teñidas de *verde*, mientras que los filamentos de actina son *rojos*; dado que ambos se solapan, las bacterias aparecen en *amarillo*. (De J.E. Galan, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 53-86, 2001. Con la autorización de Annual Reviews.)

ésta de extenderse por la superficie adhesiva de la bacteria genera su fagocitosis –un proceso conocido como el *mecanismo invasivo de tipo cremallera* (**Figura 24–26**A). La determinación de la estructura tridimensional de la invasina reveló la similitud existente entre este mecanismo de invasión y el proceso normal de adhesión celular. La proteína bacteriana tiene un motivo RGD, cuya estructura es prácticamente idéntica a la del motivo RGD de la laminina que es reconocido por las integrinas (descrito en el Capítulo 19).

Una segunda vía mediante la cual algunas bacterias acceden a células no fagocitarias es conocida como *mecanismo inductor* (Figura 24–26B). Es una vía utilizada por diversos agentes patógenos incluyendo *Salmonella enterica* que es causante de intoxicaciones alimentarias. Cuando la bacteria inyecta un conjunto de moléculas efectoras en el citoplasma de la célula huésped a través de un sistema de secreción de tipo III, se inicia esta espectacular forma de invasión. Algunas de estas moléculas efectoras activan GTPasas de la familia Rho, las cuales estimulan la polimerización de actina (tratado en el Capítulo 16). Otras, en cambio, interactúan directamente con elementos del citoesqueleto, fragmentan los filamentos de actina y provocan la reorganización de las proteínas de entrecruzamiento. El efecto neto del proceso es la inducción de ondulaciones en la superficie de la célula huésped (véase la Figura 24–26C), las cuales facilitan la formación de largas protrusiones membranosas ricas en actina que envuelven a la bacteria, lo que permite atraparlas dentro de una gran vesícula endocítica denominada *macropinosoma* (Figura 24–26D). El aspecto global que ofrecen las células que son invadidas mediante este mecanismo inductor es parecido a las espectaculares ondulaciones membranosas producidas por algunos factores de crecimiento extracelulares, sugiriendo que los mecanismos de señalización intracelulares que subyacen a ambos procesos son similares.

Los parásitos intracelulares eucariotas invaden las células huésped de manera activa

La célula huésped proporciona la energía necesaria para la internalización de los virus a través de la endocitosis mediada por receptor o la de las bacterias por fagocitosis o macropinocitosis. En este aspecto, el agente patógeno es un participante relativamente pasivo, ya que por lo general proporciona un mecanismo desencadenante del inicio del proceso. Por el contrario, los parásitos eucariotas intracelulares, que de manera habitual son de mayor ta-

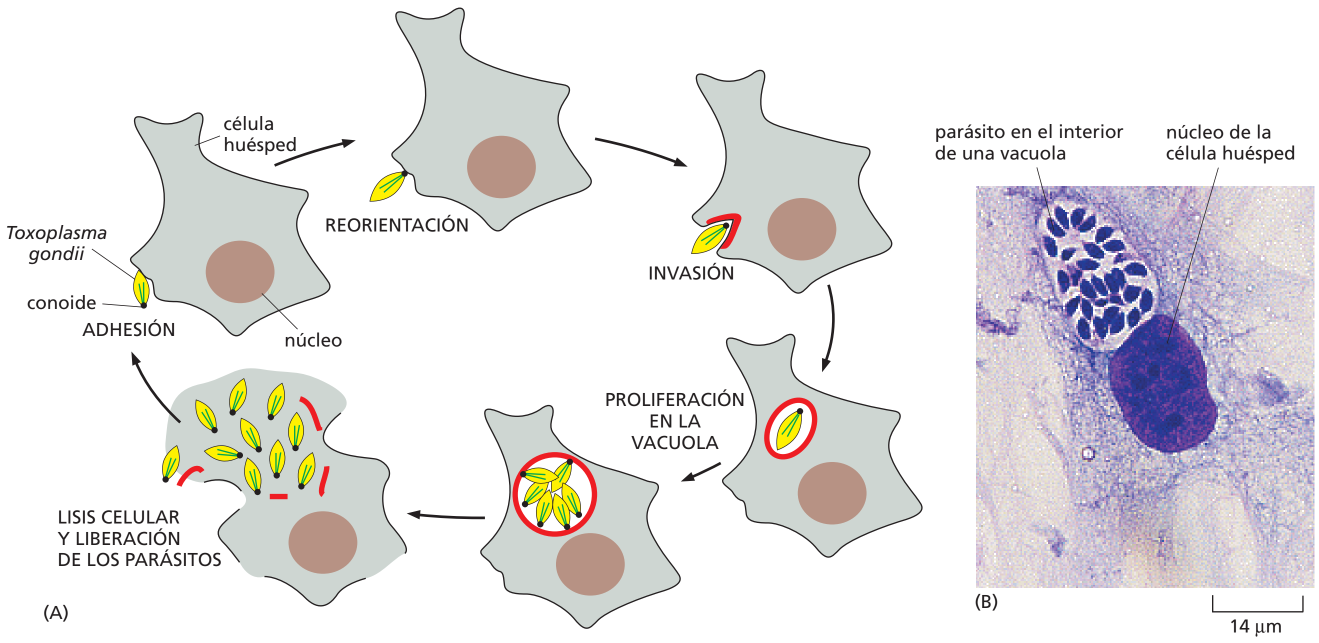


Figura 24–27 Ciclo vital del parásito intracelular *Toxoplasma gondii*. (A) Tras la adhesión a la célula huésped, *T. gondii* utiliza su conoide para introducirse en la célula huésped. A medida que la membrana plasmática del huésped se va invaginando, lo envuelve y, de alguna manera, va extrayendo proteínas del endosoma o fagosoma de manera que el compartimiento que lo contiene (en *rojo*) no se fusiona con los lisosomas. Tras varias rondas de duplicación, el parásito provoca la rotura de este compartimiento y la lisis de la célula huésped, liberando su progenie en el espacio extracelular que podrá infectar otras células. (B) Micrografía obtenida por microscopía óptica de *T. gondii* proliferando en el interior de un compartimiento membranoso en una célula en cultivo. (B, cortesía de Manuel Camps y John Boothroyd.)

maño que las bacterias, infectan las células huésped a través de una serie de complicadas vías que, en general, requieren de un importante gasto energético por parte del parásito.

Toxoplasma gondii, un parásito del gato que también causa graves infecciones en la población humana, constituye un buen ejemplo de ello. Cuando este protozoo entra en contacto con una célula huésped, evagina una estructura microtubular particular denominada *conoide*, que utiliza para introducirse lentamente en la célula huésped. Parece que la energía necesaria para llevar a cabo este tipo de invasión procede del parásito y requiere la participación de al menos una miosina poco habitual (Clase XIV, véase Figura 16–57); el proceso puede ser bloqueado despolimerizando el citoesqueleto de actina del parásito, pero no el del huésped. A medida que el parásito avanzan dentro de la célula huésped, va siendo envuelto por la membrana plasmática de la misma que se invagina. Curiosamente, el parásito elimina las proteínas transmembrana de la envoltura proporcionada por el huésped, de manera que queda protegido por un compartimiento membranoso que no participa del tráfico de membrana e impide así su fusión con los lisosomas (**Figura 24–27**). Esta membrana especializada le permite al parásito incorporar intermediarios metabólicos y nutrientes de la célula huésped pero excluyendo las macromoléculas. Por otra parte, los parásitos de la malaria también infectan los hematíes mediante un mecanismo parecido.

El protozoo *Trypanosoma cruzi*, que da lugar a una enfermedad multiorgánica (enfermedad de Chagas) extendida por México, América Central y Sudamérica, utiliza una estrategia por completo diferente, aunque no menos peculiar. Tras la interacción con receptores de la membrana de la célula huésped, el parásito induce una elevación local de Ca^{2+} en el citosol de la misma. Este aumento en la concentración de Ca^{2+} induce el reclutamiento de lisosomas en la zona adyacente a la de adhesión del parásito, los cuales se fusionan con la membrana plasmática de la célula huésped durante el proceso de internalización, permitiendo la rápida entrada del parásito al compartimiento lisosomal (**Figura 24–28**). Como comentaremos más adelante, mientras la mayoría de agentes patógenos intracelulares hacen lo imposible con tal de no exponerse al ambiente proteolítico y claramente hostil de los lisosomas, *Trypanosoma cruzi* utiliza este compartimiento como un medio de entrada a la célula. En los lisosomas, el parásito secreta una enzima con actividad transialidasa, que, tras hidrolizar los residuos de ácido siálico presentes en las glucoproteínas lisosomales, los transfiere a sus propias moléculas de superficie, con lo que se cubre con glúcidos de la célula huésped. Entonces, el parásito secreta una toxina formadora de poros, los cuales provocan la lisis de la membrana lisosomal, liberando al parásito en el citosol de la célula huésped, donde prolifera.

Los *microsporidios* utilizan el mecanismo de invasión activa quizás más raro que se conoce. Estos minúsculos y obligados parásitos eucariotas intracelulares, de tan sólo 5 µm, poseen uno de los genomas más pequeños de un organismo eucariota, alcanzando tan sólo los 2.900.000 pares de nucleótidos. Habitualmente, los microsporidios infectan insectos,

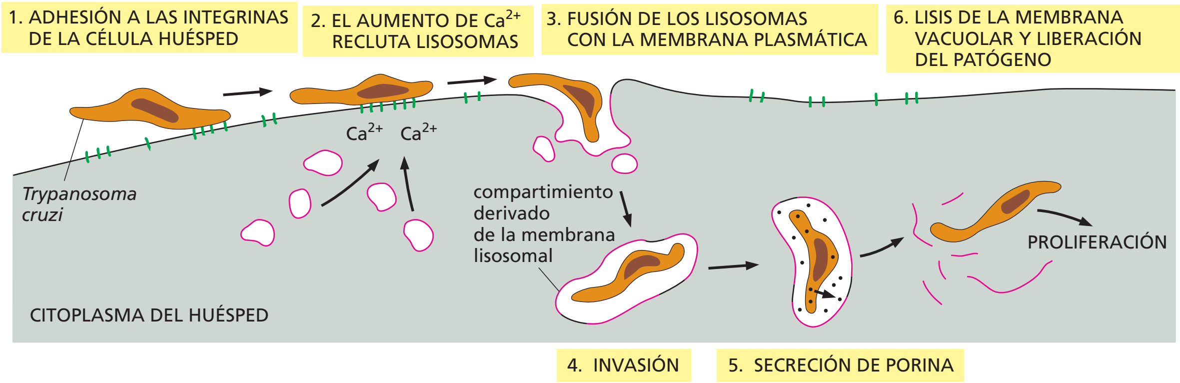


Figura 24–28 Invasión de las células huésped por *Trypanosoma cruzi*. Este parásito recluta lisosomas de la célula huésped hacia el lugar donde se ha adherido. Los lisosomas se fusionan con la invaginación de membrana plasmática y generan un compartimiento intracelular cuya membrana es prácticamente de origen lisosomal. Tras una breve estancia en este compartimiento, el parásito secreta una proteína formadora de poros que desorganiza la membrana que lo envuelve, permitiendo que el parásito sea liberado en el citoplasma de la célula huésped, donde proliferará.

aunque también pueden causar infecciones oportunistas en personas afectadas por sida. Dado que se han adaptado durante un largo periodo de tiempo a una vida parásita, dependen de las células huésped para algunas funciones metabólicas, ya que han perdido muchos de los genes y estructuras celulares necesarias para la vida libre. Así, aunque carecen de mitocondrias o de peroxisomas, disponen de un extraño aparato de extrusión, el *filamento polar*, el cual le permite infectar las células huésped. En el estadio de espora, que es especialmente resistente al medio ambiente, el tubo polar está enrollado formando una bobina alrededor del núcleo (**Figura 24–29**A). En contacto con una célula huésped apropiada, el filamento polar se dispara de manera explosiva, desenrollándose en menos de 2 segundos y formando una estructura madura que puede alcanzar una longitud diez veces superior a la de la espora. La punta del tubo polar, al desplazarse a una velocidad de 100 μm/segundo, penetra en la célula huésped y libera (aparentemente debido a la presión osmótica) el contenido de la espora, incluyendo el núcleo del microsporidio. De esta manera, el parásito prolifera en el citoplasma de la célula huésped dando lugar a centenares de descendientes (Figura 24–29B y C). Finalmente, la progenie madura y forman esporas, las cuales serán liberadas tras la lisis de la célula huésped. Las esporas de microsporidios son lo bastante pequeñas como para ser fagocitadas por macrófagos. Una vez en el fagosoma, las esporas disparan sus filamentos polares y liberan de nuevo su contenido en el citosol de la célula huésped.

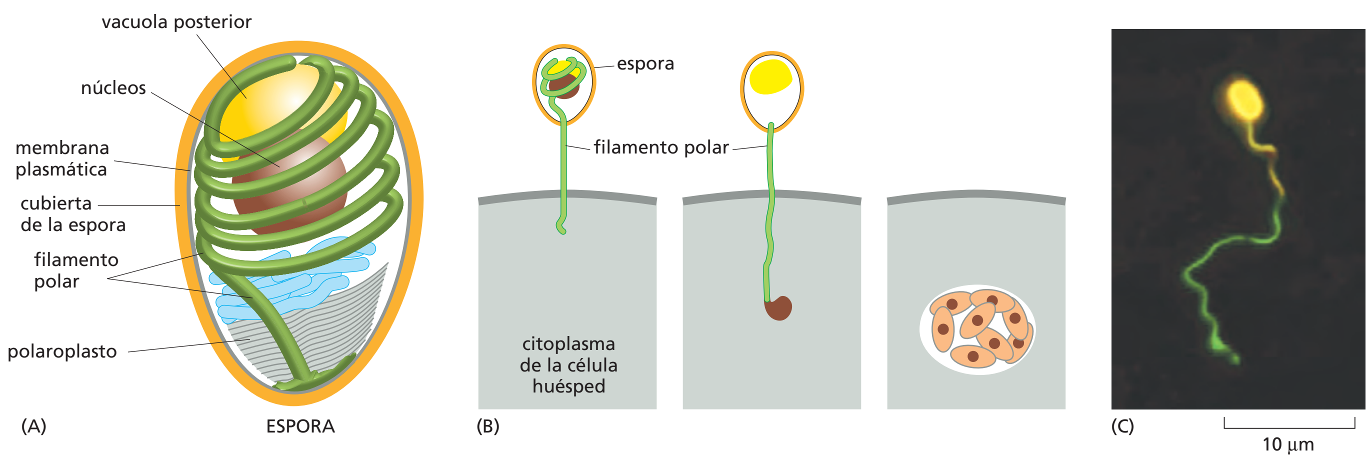


Figura 24–29 Invasión de células huésped por microsporidios. (A) La espora de este parásito está recubierta por una capa rígida que dispone de un tubo polar enrollado que rodea varias veces al núcleo. (B) El filamento polar se dispara de manera explosiva cuando entra en contacto con una célula huésped apropiada, penetrando en ella y liberando el núcleo y otros componentes de la espora en el citoplasma de la célula huésped. A partir de ese momento el microsporidio prolifera en la célula huésped. (C) Micrografía obtenida mediante un microscopio de fluorescencia de una espora de *Encephalitozoon cuniculi*. Las regiones de la espora que se encuentran fuera de la célula huésped están teñidas de *amarillo* y las que se encuentran en el interior, en *verde*. El filamento polar expulsado cambia de amarillo a verde en el punto donde penetra en la célula huésped, la cual no es visible. Barra de escala, 10 μm. (C, de C. Franzen, *Trends Parasitol.* 20:275-279, 2004. Con la autorización de Elsevier.)

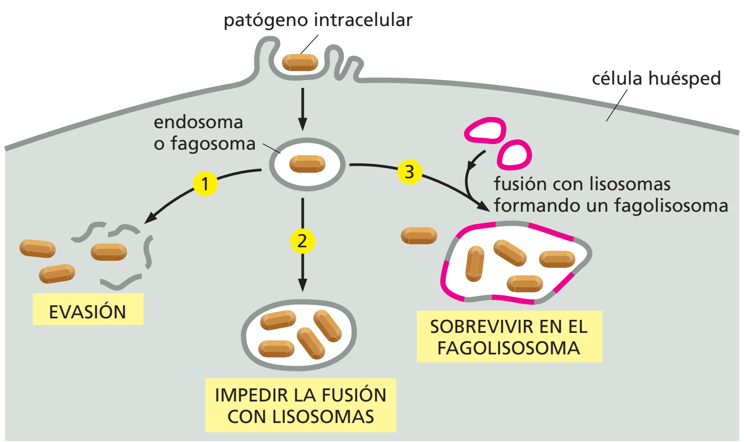


Figura 24–30 Alternativas seguidas por los patógenos intracelulares. Tras su entrada en un compartimiento membranoso de la célula huésped, ya sea por endocitosis o por fagocitosis, los patógenos intracelulares pueden seguir cualquiera de estas tres estrategias para sobrevivir y proliferar. Los que siguen la estrategia (1) comprenden todos los virus, *Trypanosoma cruzi*, *Listeria monocytogenes* y *Shigella flexneri*. Los que siguen la (2) como *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica*, *Legionella pneumophila* y *Chlamydia trachomatis*. Finalmente los que siguen la (3) comprenden a *Coxiella burnetii* y *Leishmania*.

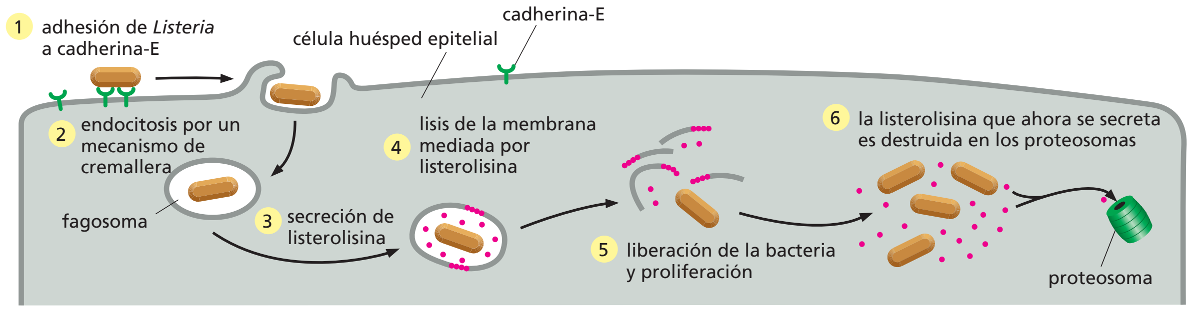
Muchos patógenos alteran el tráfico de membranas de la célula huésped

Los tres ejemplos de parásitos intracelulares que acabamos de comentar ponen de manifiesto un problema al que se enfrentan todos los parásitos intracelulares ya sean virus, bacterias o parásitos eucariotas. En efecto, en un momento u otro han de interaccionar con el tráfico de membrana de la célula huésped. Tras la endocitosis, los patógenos se encuentran en un compartimiento endosomal que, por lo general, acabaría fusionándose con los lisosomas dando lugar a un fagolisosoma. Por tanto, se ven abocados a modificar las características de este compartimiento para evitar la fusión con los lisosomas, a escapar del compartimiento antes de que se produzca dicha fusión, a escapar tras la fusión pero antes de ser digeridos o, fundamentalmente, a adoptar estrategias para sobrevivir en el ambiente hostil que constituye un fagolisosoma (**Figura 24–30**).

La mayoría de agentes patógenos conocidos siguen una de las dos primeras estrategias indicadas. Como hemos visto, *Trypanosoma cruzi* sigue la estrategia del escape, como la mayoría de virus (véase la Figura 24–24). También sigue esta estrategia la bacteria *Listeria monocytogenes*. En efecto, tras ser endocitada por las células mediante el mecanismo de cremallera descrito, secretan una proteína denominada *listerolisina O* que forma grandes poros en la membrana del fagosoma, facilitando así la liberación de la bacteria en el citoplasma antes de ser digerida. Una vez alcanzado el citosol, la bacteria continúa secretando listerolisina O, pero ésta ya no desorganiza otras membranas plasmáticas por dos razones: la primera es que es 10 veces más activa al pH ácido del fagosoma que al pH neutro del citosol; la segunda es que es rápidamente degradada en el citosol por los proteosomas de las células huésped (véase la Figura 6–80) los cuales no podían acceder a la listerolisina O mientras permanecía en el fagolisosoma (**Figura 24–31**).

Si un patógeno tiene que sobrevivir y proliferar en un compartimiento membranoso de una célula huésped, tiene que modificar el tráfico de membrana de esta célula mediante varios métodos. Esta modificación del compartimiento se produce al menos en dos aspectos: en primer lugar, debe evitar la fusión lisosomal y, en segundo lugar, debe conseguir alguna vía para importar nutrientes del citosol. Además, muchos patógenos (sobre todo virus) modifican las vías de tráfico membranoso evitando la presentación de sus antígenos delatores

Figura 24–31 Destrucción selectiva de la membrana fagosómica por la bacteria *Listeria monocytogenes*. *L. monocytogenes* se adhiere a la cadherina-E en la membrana de las células epiteliales e induce su propia endocitosis mediante un mecanismo de cremallera (véase la Figura 24–26A). Dentro ya del fagosoma, la bacteria secreta la proteína hidrofóbica listerolisina O, la cual forma oligómeros que se insertan en la membrana y generan grandes poros que acaban por lisar el fagosoma. Una vez en el citoplasma, la bacteria prolifera y continúa secretando listerolisina O. Sin embargo, esta listerolisina O es degradada rápidamente en los proteosomas, por lo que la membrana celular permanece intacta.



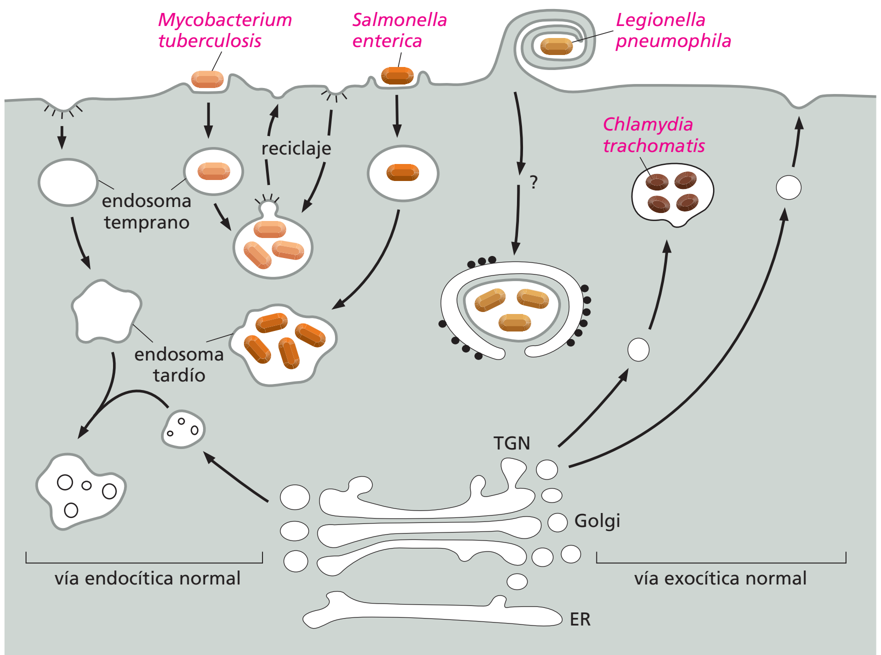


Figura 24–32 Modificación del tráfico de membrana en la célula huésped por parte de bacterias patógenas. Las bacterias patógenas intracelulares, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica*, *Legionella pneumophila* y *Chlamydia trachomatis*, proliferan en diferentes compartimientos membranosos. Así, *M. tuberculosis* permanece en un compartimiento que tiene marcadores de endosoma temprano y un activo intercambio con la membrana plasmática a través de vesículas de transporte. *S. enterica* se replica en un compartimiento que tiene marcadores de endosoma tardío y no presenta intercambio con la membrana plasmática. *L. pneumophila* prolifera por su parte en un compartimiento atípico rodeado por capas de membrana de retículo endoplasmático rugoso (ER); tan sólo se muestra una de las capas en aras de la sencillez. *C. trachomatis* prolifera en un compartimiento exocítico que se fusiona con vesículas procedentes de la red del *trans* Golgi (TGN).

en la superficie de la célula huésped, ya que de lo contrario, los linfocitos T podrían detectar su presencia y matar la célula huésped (tratado en el Capítulo 25).

Diversos patógenos presentan diferentes estrategias que les permiten alterar el tráfico de membranas en la célula huésped (**Figura 24–32**). Como se ha indicado, *Toxoplasma gondii* genera un compartimiento membranoso, excluyéndolo del tráfico normal del huésped, al tiempo que permite la importación de nutrientes de manera específica. *Mycobacterium tuberculosis* impide de alguna manera la maduración del endosoma temprano que la contiene, de manera que no se acidifica ni adquiera las características de endosoma tardío o lisosoma. Por el contrario, los endosomas que contienen *Salmonella enterica* se acidifican y adquieren marcadores de endosomas tardíos, pero detienen su maduración en una etapa previa a la fusión con los lisosomas. Otras bacterias parecen encontrar refugio en compartimientos intracelulares que son completamente diferentes a los que constituyen la vía endocítica. Así, por ejemplo, *Legionella pneumophila* prolifera en compartimientos rodeados por capas de sáculos de retículo endoplasmático rugoso (**Figura 24–33**). *Chlamydia trachomatis,* una bacteria patógena de transmisión sexual que puede llegar a producir ceguera y esterilidad, prolifera en un compartimiento homólogo a los de la vía exocítica. Parece que algunos patógenos bacterianos intracelulares pueden manipular la localización de otros compartimientos que no se encuentran en contacto directo con el suyo propio. Por ejemplo, los endosomas tardíos que contienen bacterias de *Salmonella* siempre se encuentran en estrecha aposición al complejo de Golgi (**Figura 24–34**). Hasta el momento se conocen mal los me-

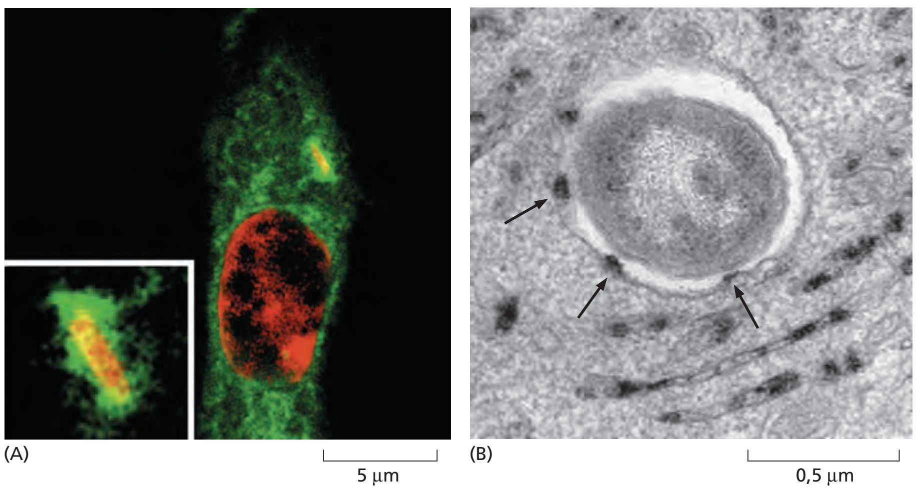


Figura 24–33 Asociación de las membranas de retículo endoplasmático (ER) de la célula huésped con patógenos bacterianos intracelulares. (A) Tras la infección por *Legionella pneumophila*, el ER (*verde*) de la célula huésped es reclutado para envolver a la bacteria. El DNA de la bacteria y el del huésped están marcados en *rojo*. El recuadro muestra la estrecha asociación entre el ER y la bacteria. (B) *Brucella abortus*, una bacteria Gram-negativa que causa abortos en el ganado, también prolifera dentro de un compartimiento derivado del ER. En esta electromicrografía, el precipitado negro dentro del retículo indica la presencia de la enzima glucosa-6-fosfatasa, que es específica de ER. Las *flechas negras* muestran la expresión de la enzima en la membrana que envuelve a la bacteria, indicando su fusión directa con ER. (A, de J.C. Kagan y C.R. Roy, *Nat. Cell Biol.* 4: 945-954, 2002. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd; B, de J. Celli y J.P. Gorvel *Curr. Opin. Microbiol.* 7:93-97, 2004. Con la autorización de Elsevier.)



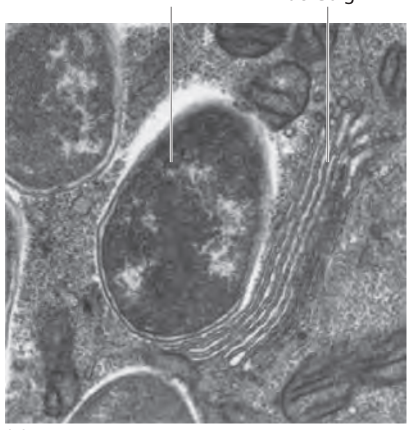


Figura 24–34 Proximidad de las cisternas del complejo de Golgi a los endosomas que contienen *Salmonella enterica*. (A) En esta célula infectada, las bacterias se muestran en *verde*, mientras que el complejo ha sido marcado en *rojo* mediante anticuerpos contra una proteína estructural de este complejo. (B) Electromicrografía que muestra la estrecha aposición de una cisterna del complejo de Golgi y un endosoma conteniendo la bacteria. (De S.P. Salcedo y D.W. Holden, *EMBO J.* 22: 5003-5014, 2003. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

canismos que permiten a estos organismos alterar sus compartimientos membranosos, así como otros aspectos del tráfico de membrana en la célula huésped.

A menudo, los virus también alteran el tráfico de membrana en la célula huésped. Los virus con envoltura lipídica la adquieren a partir de los fosfolípidos de la célula huésped. En los casos más sencillos, las proteínas codificadas por los virus son insertadas en la membrana del ER y siguen la ruta tradicional a través del complejo de Golgi hasta la membrana plasmática, experimentando *durante su transporte* diversas modificaciones postraduccionales. Posteriormente, la cápside vírica y el genoma se ensamblan en la membrana plasmática y dan lugar al proceso de gemación en su superficie. Este es uno de los mecanismos utilizados por el HIV. Otros virus con envuelta interaccionan de forma compleja con las vías de tráfico membranoso de la célula huésped (**Figura 24–35**). Incluso algunos virus que no disponen de envoltura lipídica alteran el tráfico de membrana en el sentido de satisfacer sus propios requisitos. Así, por ejemplo, la replicación del genoma de los poliovirus la lleva a cabo una RNA polimerasa vírica asociada a membrana. Dadas estas características, la replicación resultará tanto más rápida cuanto mayor sea la superficie membranosa del huésped. Para conseguir este objetivo, el virus induce la síntesis de lípidos de membrana en el huésped y bloquea el transporte membranoso del ER. El resultado de todo ello es la acumulación de membrana de retículo endoplásmico y el incremento de la superficie en la cual tiene lugar la replicación del RNA (**Figura 24–36**). Habitualmente muchos patógenos víricos y bacterianos se encuentran asociados con los autofagosomas, los cuales se forman a consecuencia de la autofagia (tratado en el Capítulo 13). En la mayoría de los casos, no hay evidencias de que el huésped inicie la inducción de la autofagia como una respuesta protectora o, por el contrario, sea el patógeno quien la induce para facilitar su proliferación.

Virus y bacterias utilizan el citoesqueleto de la célula huésped para desplazarse dentro de las células

El citoplasma de las células de mamífero es muy viscoso. Está lleno de compartimientos y atravesado por redes de filamentos del citoesqueleto que, en conjunto, dificultan la difusión de partículas del tamaño de una bacteria o una cápside vírica. Si un agente patógeno tiene que alcanzar una determinada región celular, para llevar a cabo una etapa de su proliferación, es necesario que se desplace activamente. De manera semejante al transporte de endomembranas, los agentes patógenos utilizan por lo general el citoesqueleto de la célula huésped para su desplazamiento activo.

Diversas bacterias que proliferan en el citoplasma de la célula huésped han adoptado un extraordinario mecanismo para desplazarse, que depende de la polimerización de la actina. Estas bacterias, entre las que se encuentran *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Rickettsia rickettsii* (causante de la fiebre de las Montañas Rocosas), *Burkholderia pseudomallei* (causante de la melioidosis) y *Mycobacterium marinum* (un pariente de la bacteria causante de la tuberculosis) inducen, en la célula huésped, la nucleación y el ensamblaje de los filamentos de actina en uno de los extremos de la bacteria. Al polimerizar, los filamentos generan fuerza suficiente para empujar la bacteria a través del citoplasma a velocidades de hasta 1 µm/segundo. Los nuevos filamentos que polimerizan tras la bacteria van formando una estela a medida que la bacteria avanza y son despolimerizados –aproximadamente un minuto después– por los factores despolimerizadores citoplasmáticos. Cuando la bacteria en movimiento alcanza la membrana plasmática, continúa su desplazamiento hacia el exterior, induciendo en la célula huésped la formación de una evaginación larga y delgada que

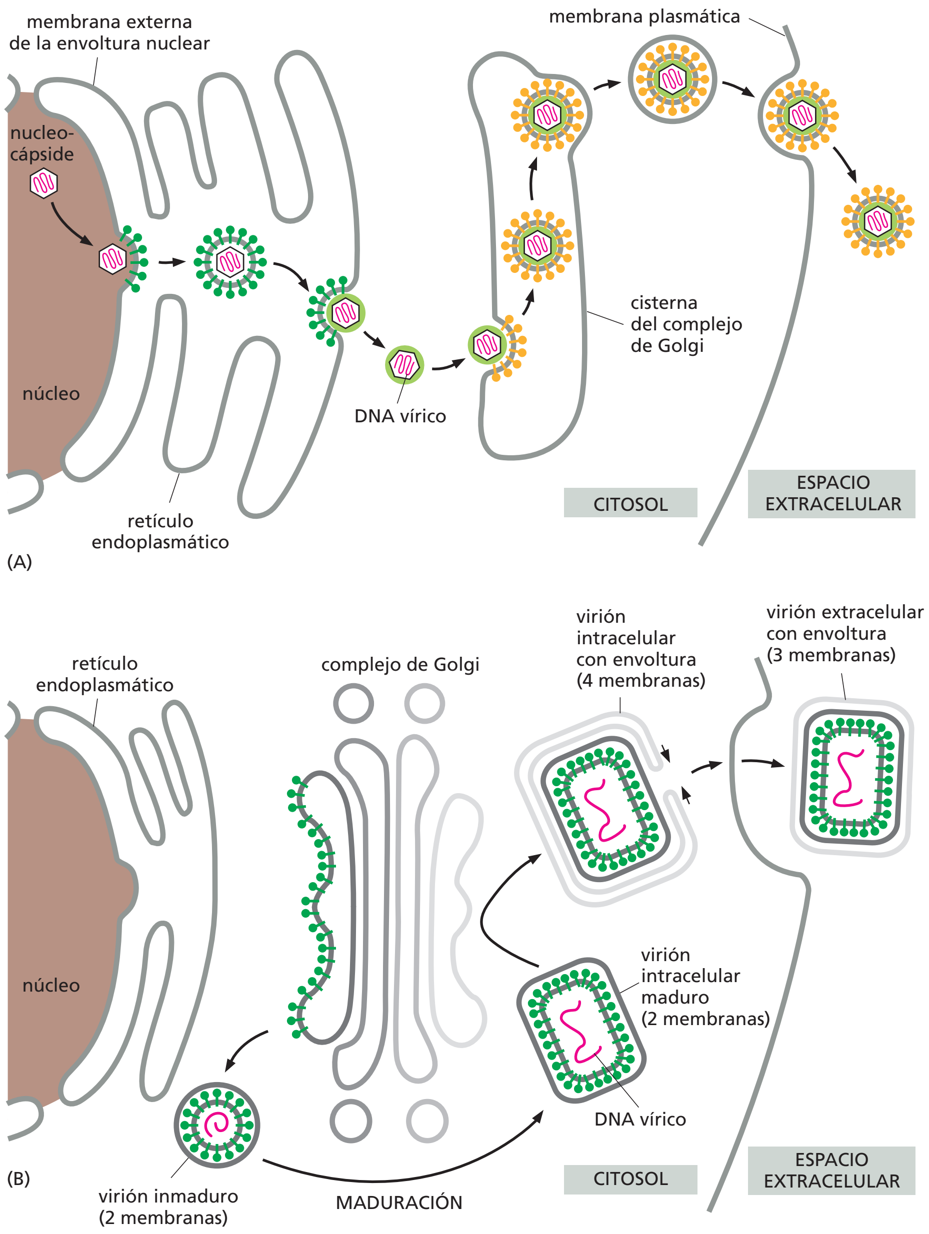
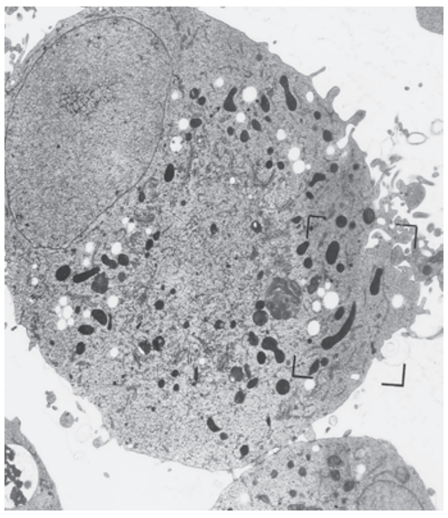


Figura 24–35 Estrategias complejas para la adquisición de la envoltura vírica. (A) Las nucleocápsides del virus Herpes son ensambladas en el núcleo y geman hacia la membrana interna nuclear, dentro del espacio intermembranoso, adquiriendo una envoltura. Parece que las partículas víricas pierden esta envoltura cuando se fusionan con la membrana externa nuclear escapando al citoplasma. Posteriormente, las nucleocápsides geman dentro del complejo de Golgi y lo vuelven a hacer en la otra cara, adquiriendo así dos nuevas cubiertas. Entonces geman a partir de la membrana plasmática con una sola envoltura, cuando fusionan su membrana externa con la membrana plasmática. (B) El virus vaccinia (estrechamente relacionado con el que produce la viruela y utilizado para su vacunación) se ensambla en "factorías de proliferación" localizadas en las regiones del citoplasma alejadas de la membrana plasmática. La primera estructura que se ensambla posee dos membranas derivadas del complejo de Golgi y transferidas por un mecanismo desconocido. Algunas de estas partículas son incorporadas por un segundo compartimiento membranoso intracelular. Estas partículas tienen un total de cuatro membranas. Tras la fusión con la membrana plasmática, el virus escapa de la célula llevando consigo tres capas membranosas.



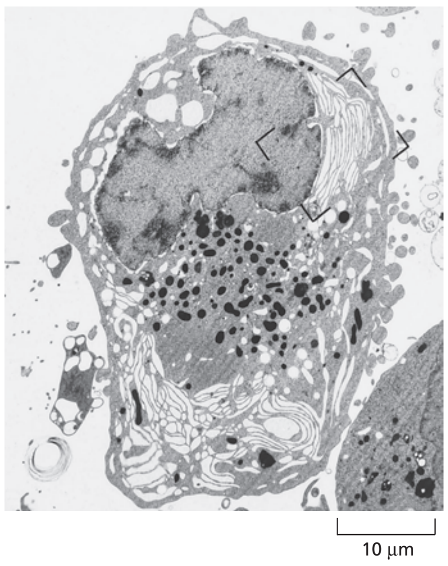


Figura 24–36 Alteraciones de las membranas intracelulares inducidas por una proteína de poliovirus. Los poliovirus, de manera semejante a otros virus que tienen cadenas sencillas de RNA, replican su genoma mediante una polimerasa que se asocia a las membranas intracelulares. Algunas de las proteínas codificadas por su genoma alteran la estructura o el comportamiento dinámico de los compartimientos membranosos de la célula huésped. Estas electromicrografías, obtenidas por microscopía electrónica de transmisión, muestran una célula de mono no transfectada (*izquierda*) y otra que expresa un transgén que codifica la proteína 3A de poliovirus (*derecha*). En la célula transfectada, el ER está dilatado ya que la proteína codificada por el transgén bloquea el tráfico entre el Golgi y el ER. (De J.J.R. Doedens, T.H. Giddings Jr. y K. Kirkegaard, *J. Virol.* 71:9054-9064, 1997.)

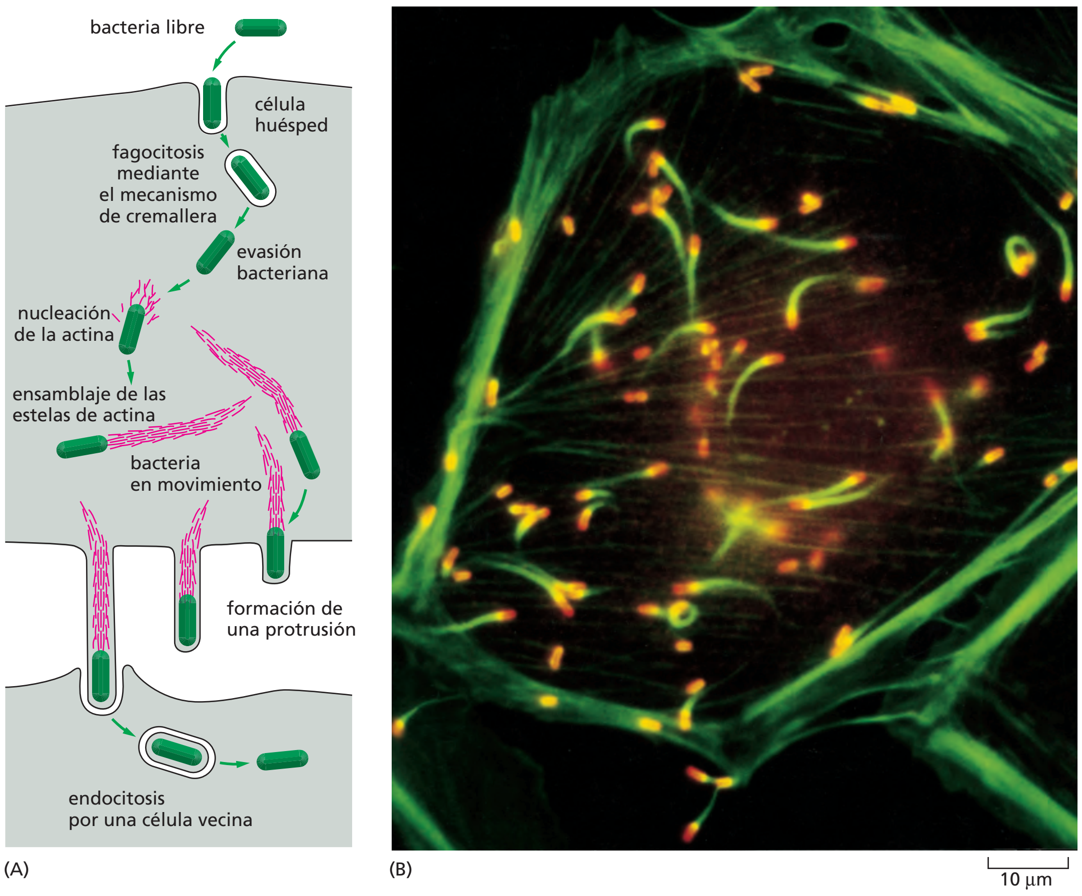


Figura 24–37 Movimiento dependiente de actina que presenta *Listeria monocytogenes* en sus desplazamientos por el interior y entre las células que infecta. <GTAT>
(A) Estas bacterias inducen el ensamblaje de haces de actina en forma de estela dentro del citoplasma de la célula huésped, lo que les permite desplazarse rápidamente. Estas bacterias se desplazan de una célula a otra formando protrusiones membranosas que son endocitadas por las células vecinas.
(B) Micrografía de fluorescencia de las bacterias desplazándose por el interior de una célula que ha sido teñida para poder observarlas en *rojo* junto con los filamentos de actina en *verde*. Obsérvese las estelas de las colas de filamentos de actina tras los cuales hay una bacteria en movimiento. Las regiones de solapamiento entre la fluorescencia roja y verde aparecen en *amarillo*. (B, por cortesía de Julie Theriot y Tim Mitchison.)

contiene la bacteria en su extremo distal. A menudo, esta proyección es endocitada por una célula vecina, facilitando la entrada en su citoplasma sin quedar expuesta al ambiente extracelular, evitando así su reconocimiento por anticuerpos producidos por el sistema inmunitario adquirido del huésped (**Figura 24–37**).

El mecanismo molecular de ensamblaje de la actina inducido por el patógeno ha sido caracterizado en diversos microorganismos. Estos mecanismos son diferentes para cada patógeno, lo cual sugiere que han evolucionado de forma independiente. Aunque todos utilizan la misma vía reguladora que habitualmente controla la nucleación de los filamentos de actina en la célula huésped, cada uno de ellos aprovecha un aspecto diferente de la misma. Tal como se describió en el Capítulo 16, la activación de la GTPasa Cdc42 por algunas señales extracelulares induce la activación de N-WASp, que provoca, a su vez, la activación de un complejo ARP que nuclea el crecimiento de los nuevos filamentos de actina. Una proteína externa de *L. monocytogenes* se une directamente al complejo ARP activándolo e inicia así la formación de la estela de actina. *B. pseudomallei* y *R. rickettsii* utilizan una estrategia similar a ésta, aunque la secuencia de proteínas activadoras difiere en los tres casos. Por el contrario, una proteína externa de *S. flexneri*, no relacionada con la anterior, se une a N-WASp activándola, la cual activará el complejo ARP. Curiosamente el virus vaccinia utiliza otro mecanismo de polimerización de actina para desplazarse por dentro de la célula, aunque también aprovecha la misma vía de regulación (**Figura 24–38**).

Otros patógenos se desplazan por dentro de la célula mediante el transporte dependiente de microtúbulos. Esta estrategia está en particular bien ilustrada por los virus que infectan neuronas. En este sentido, los *alfa herpes virus neurotrópicos*, a los que pertenece el virus de la varicela, constituyen un notable ejemplo. Los virus infectan a las neuronas sensoriales en las regiones distales de sus axones, siendo transportadas las nucleocápsides hasta el núcleo celular mediante un mecanismo dependiente de microtúbulos, que probablemente se produce por la interacción de proteínas de la cápside y la proteína motora dineína. Tras la replicación y ensamblaje en el núcleo, el virión con envoltura es transportado desde el soma neuronal por los microtúbulos axonales hasta el axón, mediante la interacción de un componente de la cubierta con la proteína motora quinesina (**Figura 24–39**). Se ha demostrado que un gran número de viriones, incluidos los del HIV, la rabia, la gripe, adenovirus, parvovirus canino y vaccinia (el pariente de la viruela utilizado para la vacunación

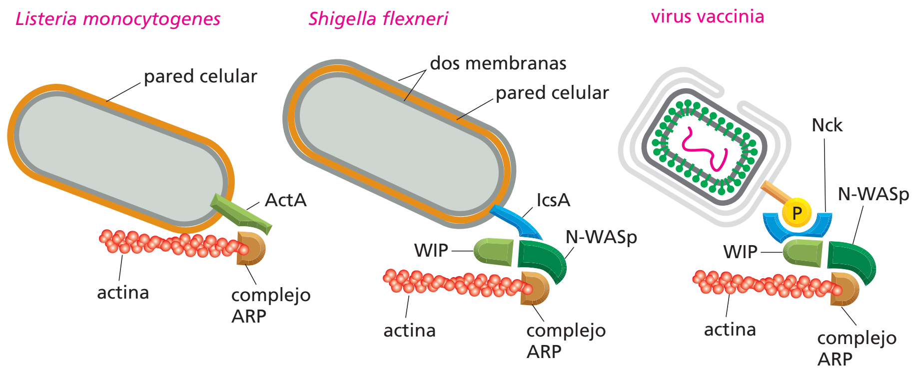


Figura 24–38 Mecanismos de nucleación de actina inducidos por diversos patógenos. Las bacterias *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* y el virus vaccinia se desplazan por el interior de la célula utilizando la actina del huésped. Para inducir su nucleación todos ellos reclutan y activan el complejo ARP (véase la Figura 16–34), aunque cada uno de ellos sigue una estrategia característica. *L. monocytogenes* expresa una proteína en su superficie, ActA, que recluta y activa directamente el complejo ARP. *S. flexneri* también expresa una proteína de superficie, IcsA (no relacionada con ActA) que recluta la proteína de señalización N-WASp. Ésta, a su vez, recluta el complejo ARP junto con otras proteínas como WIP (proteína de interacción con WASp). El virus vaccinia expresa una proteína en su envoltura que es fosforilada por una tirosina quinasa del huésped. Una vez fosforilada, recluta Nck, la cual hace lo propio con WIP. Éste se une a N-WASp, que recluta y activa el complejo ARP. Este complicado mecanismo que sigue el virus vaccinia es muy semejante al que se ha observado en células eucariotas en movimiento cuando se activa su complejo ARP mediante factores quimiotácticos. A pesar de las diferentes estrategias utilizadas en su ensamblaje, las estelas de actina inducidas por los tres patógenos son muy parecidas, semejanza que se extiende a la velocidad de desplazamiento intracelular.

contra la misma), en alguna etapa de su replicación interaccionan con las proteínas motoras dineía o quinesina desplazándose de manera activa a lo largo de los microtúbulos. Una función básica de las "autopistas" microtubulares de las células eucariotas es la de actuar como pistas orientadas destinadas al tráfico de membrana, de manera que no resulta sorprendente que muchos virus hayan adquirido, de manera independiente, la habilidad de utilizar estos sistemas de transporte para incrementar su propia replicación.

Una bacteria conocida por su asociación con microtúbulos es *Wolbachia*. Este fascinante género comprende muchas especies que, siendo parásitos o simbiontes de insectos y de otros invertebrados, viven en el citoplasma de cada una de las células del animal. La infección es transmitida verticalmente de madre a hijos ya que *Wolbachia* también está presente en los óvulos. La bacteria asegura su diseminación a cada una de las células mediante su interacción con los microtúbulos, de manera que son segregadas por el huso mitótico cuando lo hacen los cromosomas en una célula infectada en división (**Figura 24–40**). Como se describirá más alante, la infección por *Wolbachia* puede alterar de manera significativa el comportamiento reproductivo de los insectos huéspedes.

Las infecciones víricas se hacen con el control del metabolismo de las células huésped

La mayoría de las bacterias de los parásitos intracelulares son portadores de la información genética básica necesaria para atender a su propio metabolismo y reproducción, de forma que sólo dependen del huésped para el aporte de nutrientes. Por el contrario, los virus utilizan la maquinaria básica de la célula huésped para atender a la mayoría de aspectos de su re-

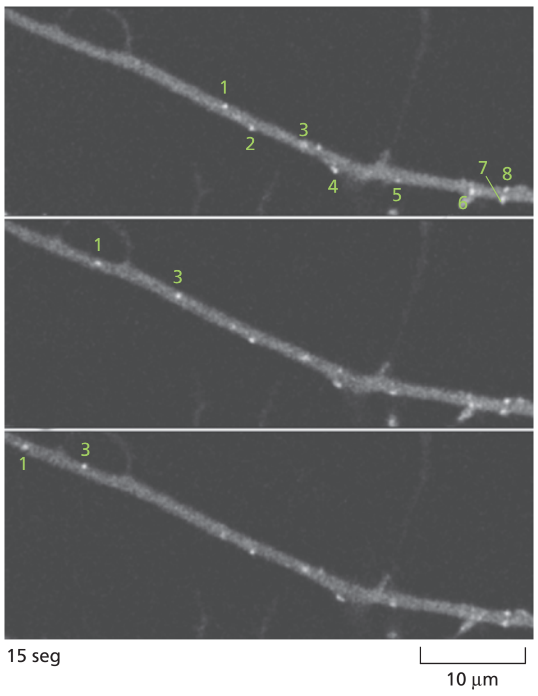


Figura 24–39 Micrografías de microscopía de fluorescencia que ilustran el desplazamiento de herpes virus en un axón. Esta neurona ha sido infectada con un alfa herpes virus, modificado genéticamente para que exprese la proteína fluorescente verde (GFP) gracias a su fusión con una proteína de la cápside. En este segmento de axón son observables diversas partículas víricas, dos de las cuales (los números 1 y 3) se desplazan a partir del soma neuronal, el cual se encuentra fuera de la imagen y a la derecha. (De G.A. Smith, S.P. Gross y L.W. Enquist, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:3466-3470, 2001. Con la autorización de National Academy of Sciences.)

producción. Así dependen de los ribosomas celulares para producir sus proteínas e incluso algunos de ellos utilizan las polimerasas de DNA y RNA para la replicación y transcripción.

Muchos virus codifican proteínas que modifican los aparatos de transcripción o traducción del huésped favoreciendo la síntesis de las proteínas víricas en detrimento de las del huésped. El resultado de ello es que la capacidad sintética del huésped es dirigida sobre todo hacia la producción de nuevas partículas víricas. Así los poliovirus expresan una proteasa que hidroliza específicamente el factor de unión a TATA que es un componente de TFIID (véase la Figura 6–18), bloqueando de manera muy efectiva la transcripción celular dependiente de la RNA polimerasa II. Por su parte, el virus de la gripe expresa una proteína que bloquea tanto la maduración como la poliadenilación de los transcritos de mRNA, lo que conlleva la imposibilidad de su exportación desde el núcleo (véase la Figura 6–40).

El inicio de la traducción de la mayoría de los mRNA de la célula depende del reconocimiento de su extremo 5' por parte de un grupo de factores de iniciación de la traducción (véase la Figura 6–72). A menudo este inicio de la traducción de los mRNA del huésped permanece bloqueado durante el curso de la infección, lo cual favorece que los ribosomas del huésped sean utilizados para la traducción de las proteínas víricas. Algunos genomas víricos, tales como el del virus de la gripe, codifican endonucleasas que escinden el extremo 5' de los mRNA del huésped. Incluso los hay que van más allá y utilizan estos extremos recién liberados como cebadores para la síntesis de mRNA víricos, un proceso denominado *robo del extremo 5'*. Otros genomas víricos de RNA codifican proteasas que hidrolizan determinados factores de iniciación de la traducción. Estos virus traducen su RNA mediante un mecanismo independiente del extremo 5' que utiliza secuencias internas para la entrada del ribosoma (IRES: ***i****nternal* ***r****ibosome* ***e****ntry* ***s****ites*) (véase la Figura 7–108).

Algunos virus de DNA utilizan la DNA polimerasa de la célula huésped para replicar su genoma. Desgraciadamente para estos viriones, la DNA polimerasa sólo es expresada a niveles elevados durante la fase S del ciclo y la mayoría de las células que se pueden infectar por estas partículas víricas tienen una fase G_1 muy larga. Los adenovirus han desarrollado un mecanismo que induce la entrada en fase S de la célula huésped y que produce así grandes cantidades de DNA polimerasa, replicándose entonces el genoma vírico. El genoma del adenovirus codifica proteínas que inactivan tanto a Rb como a p53, dos supresores clave de la progresión del ciclo celular (descrito en el Capítulo 17). Tal como podría esperarse para cualquier mecanismo que induce la desregulación de la replicación del DNA, en algunas circunstancias estos virus facilitan el desarrollo de cáncer.

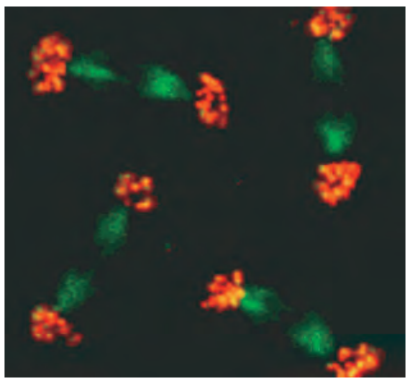


Figura 24–40 Asociación de *Wolbachia* con microtúbulos. Micrografía de fluorescencia de *Wolbachia* (*rojo*) que muestra su asociación con los microtúbulos (*verde*) de cuatro husos mitóticos en un sincitio embrionario de *Drosophila*. Al estar localizados en los polos del huso, los agregados de bacterias pueden ser distribuidos junto con los cromosomas (no visibles pero situados en el ecuador del huso) cuando los cromosomas se segregan. (De H. Kose y T. L. Karr, *Mech. Cell Dev.* 5 1:275-288, 1995. Con la autorización de Elsevier.)

Los agentes patógenos pueden alterar el comportamiento del organismo huésped con el fin de facilitar su diseminación

Es frecuente que los patógenos alteren el comportamiento de las células huésped en el sentido de facilitar su supervivencia y proliferación. De manera parecida, los agentes patógenos pueden modificar el comportamiento del organismo huésped facilitando su diseminación, como hemos comentado para los casos de *Trypanosoma brucei y Yersinia pestis*. En algunos casos resulta difícil asegurar si una respuesta particular del huésped es más beneficiosa para él o para el agente patógeno. Así, por ejemplo, patógenos que causan diarreas, como *Salmonella enterica*, muy a menudo producen infecciones limitadas ya que la propia diarrea constituye un medio eficaz para eliminar al patógeno. Sin embargo, las diarreas portadoras de bacterias facilitan la diseminación a nuevos huéspedes. De manera semejante, la tos y el estornudo facilitan la eliminación de patógenos del tracto respiratorio, pero al mismo tiempo favorecen la diseminación de la infección a otros individuos. Una persona que padezca un resfriado común puede producir hasta 20.000 gotitas en un solo estornudo y cada una de ellas transporta algunos rinovirus o coronavirus.

Un ejemplo espantoso de modificación del comportamiento en un huésped es el ofrecido por la rabia, enfermedad ya descrita por los egipcios hace más de 3000 años. El virus causante de la enfermedad se replica en las neuronas y provoca que las personas o animales infectados se vuelvan "rabiosos", esto es, adopten un comportamiento muy agresivo. El virus, que se halla en la saliva, alcanza el torrente sanguíneo de la víctima a través de la herida producida por la mordedura y se disemina así a nuevos huéspedes.

Sin embargo, *Wolbachia* ofrece el ejemplo más dramático de modificación del comportamiento de un huésped por parte de un agente patógeno. Estas bacterias manipulan el comportamiento sexual de su huésped aumentando su diseminación. Como ya se describió anteriormente, *Wolbachia* se transmite verticalmente a la descendencia a través de los óvulos.

Sin embargo, cuando infectan a un macho se encuentran en un callejón sin salida, ya que la bacteria es excluida de los espermatozoides. En algunas especies de *Drosophila*, *Wolbachia* modifica los espermatozoides de su huésped de manera que sólo pueden fecundar con éxito los óvulos de hembras infectadas. Esta modificación da lugar a una ventaja reproductiva a las hembras infectadas con respecto a las no infectadas, de manera que la proporción de portadores de *Wolbachia* se ve incrementada. En otros huéspedes, la infección por *Wolbachia* provoca la muerte de los machos, pero no de las hembras, de manera que se incrementa el número de hembras en la población y, por tanto, el número de individuos que pueden producir óvulos para diseminar la infección. En algunos tipos de avispa la infección por *Wolbachia* faculta a las hembras a producir óvulos que se desarrollan partenogenéticamente sin que se precise la fecundación por espermatozoides, lo que ha conducido a la desaparición de los machos en estas especies. Sin embargo, para alguno de sus huéspedes, *Wolbachia* se ha convertido en un simbionte indispensable, de forma que la eliminación de la infección provoca la muerte del huésped. Existe un caso en el que la especie humana se beneficia de esa dependencia de *Wolbachia*. En efecto, el nematodo *Onchocerca*, causante en África de la filariasis denominada "ceguera de los ríos", es difícil de eliminar con fármacos antiparasitarios, pero cuando las personas afectadas por esta enfermedad son tratadas con antibióticos que eliminan la infección por *Wolbachia* que padece el nematodo, también se detiene la filariasis.

Los agentes patógenos evolucionan rápidamente

La complejidad y la especificidad de las interacciones moleculares entre agentes patógenos y sus células huésped sugieren que la virulencia podría ser difícil de adquirir por mutación aleatoria. De hecho, constantemente aparecen nuevos agentes patógenos y los antiguos cambian sin cesar; el resultado es que las enfermedades más habituales son difíciles de tratar. Los agentes patógenos presentan dos grandes ventajas que les posibilitan evolucionar rápidamente. En primer lugar, se replican muy rápido aportando así una gran cantidad de material al motor de la selección natural. Mientras que la especie humana y los chimpancés han necesitado unos 8 millones de años para alcanzar una diferencia de un 2% entre sus genomas, los poliovirus generan un cambio de la misma magnitud en 5 días, que es el tiempo que tarda el virus en pasar de la boca al intestino. En segundo lugar, la presión selectiva favorece esta rápida capacidad de variación. El sistema inmunitario adquirido del huésped y los modernos fármacos antipatógeno que destruyen a aquellos patógenos que no son capaces de cambiar son la principal fuente de estas presiones selectivas.

En muchos casos, los cambios en el comportamiento humano exacerban la aparición y evolución de nuevas enfermedades infecciosas. Así, por ejemplo, las condiciones de vida, de hacinamiento y suciedad, características de las ciudades medievales, contribuyeron a la diseminación de la bacteria *Yersinia pestis* desde los roedores huéspedes hasta los humanos, ocasionando la peste. Así mismo, la tendencia de los humanos modernos a vivir en condiciones de alta densidad en grandes ciudades también ha generado en los organismos infecciosos la oportunidad de iniciar epidemias tales como la gripe, la tuberculosis y el sida, las cuales no se habrían diseminado tan rápidamente o habrían llegado tan lejos si la población humana hubiera estado más diseminada. Además, los viajes por avión facilitan que, en cuestión de horas o días, un huésped recién infectado y asintomático pueda ser portador de una epidemia hasta alguna población no expuesta previamente.

La variación antigénica en los patógenos está producida por diversos mecanismos

Un ejemplo a pequeña escala de la constante batalla que se libra entre infección e inmunidad es el fenómeno de **variación antigénica**. Una importante respuesta inmunitaria de tipo adquirido es la producción, por parte del huésped, de anticuerpos que reconocen moléculas específicas (*antígenos*) de la superficie del agente patógeno (descrito en Capítulo 25). Muchos de ellos alteran estos antígenos durante el curso de la infección y evitan así su eliminación por anticuerpos. Por ejemplo, algunos parásitos eucariotas llevan a cabo reordenaciones programadas de los genes que codifican sus antígenos superficiales. Uno de los ejemplos más notables de ello lo proporcionan tripanosomas africanos como *Trypanosoma brucei*, un protozoo parásito que causa la enfermedad del sueño y es diseminado por un insecto vector (*T. brucei* es un pariente cercano de *T. cruzi* –véase la Figura 24–28– pero se dife-

rencia de éste en que se reproduce de forma extracelular en vez de intracelular). *T. brucei* presenta un solo tipo de glucoproteína superficial, la denominada *variante específica de glucoproteica* (*VSG*: ***v**ariant-**s**pecific **g**lycoprotein*), la cual produce en el huésped una respuesta protectora por anticuerpos que rápidamente elimina la mayoría de parásitos. Sin embargo, el cromosoma del tripanosoma contiene unos 1000 genes *Vsg*, cada uno de los cuales codifica una VSG que presenta propiedades antigénicas diferentes. Sólo uno de estos genes se expresa de forma simultánea, siendo copiado e insertado en un lugar del genoma que exhibe expresión activa. Los reordenamientos génicos que copian e insertan nuevos alelos en el lugar de expresión cambian de forma repetida el gen *Vsg* que se está expresando. De este modo, unos cuantos tripanosomas que expresen una VSG alterada escapan de la eliminación mediada por anticuerpos, se reproducen y provocan la recurrencia de la enfermedad, ocasionando una infección crónica cíclica (**Figura 24–41**). Muchos otros parásitos eucariotas, incluyendo el protozoo *Plasmodium falciparum*, causante de la malaria, y el hongo *Pneumocystis carinii*, que es el causante de neumonía en enfermos de sida, utilizan estrategias parecidas para evadirse de las respuestas de la inmunidad adquirida del huésped.

Los patógenos bacterianos también pueden cambiar con rapidez sus antígenos de superficie. En esta capacidad las ganadoras son las especies del género *Neisseria*. Estos cocos Gram-positivos son los causantes de meningitis y de enfermedades de transmisión sexual, empleando en todos los casos una sorprendente variedad de mecanismos promotores de variación antigénica. En primer lugar, padecen recombinación génica muy similar a la que acabamos de describir para los patógenos eucariotas, permitiéndoles variar (con el tiempo) la proteína *pilina* que utilizan para producir las fimbrias de la superficie celular: mediante la recombinación de muchas copias silenciosas de variantes génicas de la pilina en un único locus de expresión, pueden expresar docenas de versiones ligeramente diferentes de la proteína. En segundo lugar, muchas proteínas de la superficie celular, así como muchas de las enzimas involucradas en la síntesis de los carbohidratos de la superficie celular, varían continuamente los niveles de expresión como consecuencia de desplazamientos al azar de secuencias repetidas de nucleótidos dispuestas en tándem que se hallan en la región promotora o codificante de sus genes, lo cual es un factor regulador de su transcripción o traducción. Así, por ejemplo, *Neisseria* presenta alrededor de 10 genes diferentes que codifican variantes de la familia de proteínas de membrana externa Opa, cada una de las cuales sufre variaciones al azar en su expresión, dando lugar a una gran cantidad de diferentes combinaciones proteicas que despistan al sistema inmunitario adquirido del huésped. El análisis de la secuencia del genoma de varias especies de *Neisseria* hace a suponer que utilizando alguna versión de este mecanismo pueden variar sus niveles de expresión más de 100 genes diferentes. En tercer lugar, *Neisseria* es extremadamente experta en tomar DNA del medio e incorporarlo a su propio genoma, lo cual contribuye también a su extraordinaria variabilidad. Por último *Neisseria* carece de algunos de los mecanismos de reparación de DNA que poseen otras bacterias como *E. coli*, de manera que es muy probable que la tasa de adquisición de nuevas mutaciones debida a errores en la replicación supere a la media. Con todos estos me-

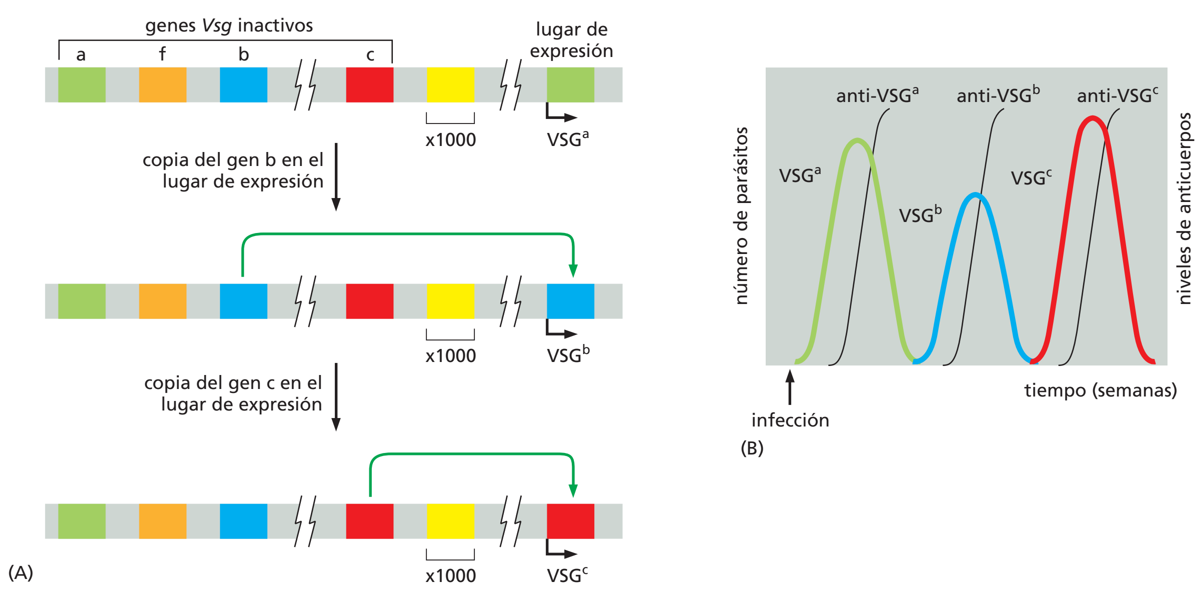


Figura 24–41 Variación antigénica entre los tripanosomas. (A) Aunque *Trypanosoma brucei* dispone de unos 1000 genes *Vsg* diferentes, sólo existe un lugar para su expresión. Uno de los genes inactivos es copiado en ese lugar mediante conversión génica, expresándose a partir de entonces. Cada *gen Vsg* codifica una proteína superficial diferente (antígeno). Sucesos de intercambio poco habituales permiten al tripanosoma cambiar de manera repetida el antígeno superficial que expresa. (B) Una persona infectada con tripanosomas que expresen VSG^a, rápidamente desarrolla una respuesta mediada por anticuerpos que eliminan la mayoría de los parásitos que expresan este antígeno. Sin embargo, algunos parásitos pueden haber cambiado su expresión a VSG^b, lo que les permite proliferar hasta que sean eliminados por los anticuerpos anti-VSG^b. Pero, para cuando eso suceda habrá parásitos que habrán cambiado su expresión a VSG^c, repitiéndose el ciclo, en apariencia, de forma indefinida.

canismos trabajando conjuntamente no nos debe sorprender que todavía no se haya desarrollado una vacuna eficiente contra las infecciones por *Neisseria*.

Aunque *Neisseria* es un caso extremo, muchos otros patógenos bacterianos utilizan uno o más de estos mecanismos para incrementar la variación de sus genes. Es más, algunos estudios han mostrado que es mucho más probable que tengan mecanismos de reparación de DNA defectuosos aquellas bacterias patogénicas que han sido aisladas de pacientes sintomáticos que esas mismas especies bacterianas aisladas de otros reservorios. Ello sugiere que el sistema inmunitario humano puede actuar acelerando la evolución bacteriana.

La *transferencia génica horizontal* en las bacterias causa una evolución más rápida que la aportada por las mutaciones puntuales. Esta transferencia está mediada en gran medida por la adquisición de bacteriófagos y de plásmidos. Las bacterias incorporan rápidamente islotes de patogenicidad y plásmidos de virulencia procedentes de otras bacterias (véase la Figura 24–5). Cuando la bacteria ha adquirido un conjunto de genes relacionados con la virulencia, puede constituirse muy rápidamente como un agente epidémico. Así, por ejemplo, *Yersinia pestis* es una bacteria endémica de ratas que apareció en la historia humana en el año 542 de nuestra era, cuando Constantinopla fue devastada por la peste. La comparación de la secuencia de *Y. pestis* con *Y. pseudotuberculosis*, causante de una grave enfermedad diarreica, sugiere que *Y. pestis* puede haber aparecido como cepa diferenciada hace tan sólo algunos centenares de años, no mucho antes de su debut como plaga.

La evolución vírica está dominada por la replicación que favorece errores

Los mecanismos que favorecen los errores durante la replicación son los principales responsables de la variación antigénica en los virus. Por ejemplo, los genomas de los retrovirus adquieren por término medio una mutación puntual por cada ciclo replicativo, debido a que la transcriptasa inversa que produce DNA a partir del RNA vírico carece de capacidad para corregir los errores en la incorporación de nucleótidos. Una infección típica de HIV sin tratar puede originar tantos genomas diferentes de HIV como mutaciones puntuales es capaz de incorporar. En algunos aspectos, esta elevada velocidad de mutación es beneficiosa para este patógeno. Así, mediante estos procesos de mutación y selección microevolutivos que tienen lugar en cada uno de los huéspedes, muchos virus cambian a lo largo del tiempo su eficiencia en la infección de macrófagos por la de linfocitos T, tal como se describió anteriormente (véase la Figura 24–23). De manera parecida, cuando el paciente ha iniciado un tratamiento con fármacos antivirales, el genoma vírico puede mutar rápidamente y ser seleccionado por su resistencia a los mismos. Sin embargo, si la tasa de errores de la transcriptasa inversa fuera demasiado alta, las mutaciones se acumularían tan rápido que comprometerían la supervivencia del propio virus. Además, una variante exitosa en un huésped no se disemina de forma necesaria a otros huéspedes, ya que el virión mutado puede ser incapaz de infectar a un nuevo huésped. En el caso del HIV-1 se puede estimar la importancia de esta restricción examinando la diversidad de secuencias que presentan diversos individuos infectados por el virus. Sorprendentemente, sólo una tercera parte de las posiciones de los nucleótidos permanecen invariables, mientras que algunas regiones del genoma vírico, como el gen *env*, pueden diferir hasta en un 30%. Esta extraordinaria plasticidad genómica complica de manera importante los intentos de desarrollar vacunas contra el HIV, además de conducir a una rápida resistencia a los fármacos (tratado más adelante). Este hecho ha conducido a la aparición de nuevas cepas de HIV. La comparación de secuencias entre varias cepas de HIV y sus homólogos, los virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV: ***s****imian* ***i****mmunodeficiency* ***v****irus*) obtenidos de diversas especies de primates, sugieren que el HIV más virulento, el HIV-1, pudo haber sido transmitido de los chimpancés al hombre en una fecha tan reciente como 1930 (**Figura 24–42**).

Los virus de la gripe constituyen una importante excepción a la regla que considera la replicación errónea como el principal mecanismo evolutivo de los virus. En efecto, los de la gripe son virus poco comunes ya que, de manera característica, su genoma contiene varias cadenas de RNA (generalmente, ocho). Cuando dos cepas del virus infectan al mismo huésped, las cadenas de ambas cepas pueden recombinarse dando lugar a un nuevo tipo de virus de la gripe. Antes de 1900, la cepa de virus de la gripe que infectaba al hombre producía una enfermedad muy suave. Al mismo tiempo, otra cepa del virus infectaba algunas aves, como patos y pollos, pero en raras ocasiones a la especie humana. En 1918, una variante de la gripe aviar, especialmente virulenta, cruzó la barrera de la especie e infectó a algunas personas,

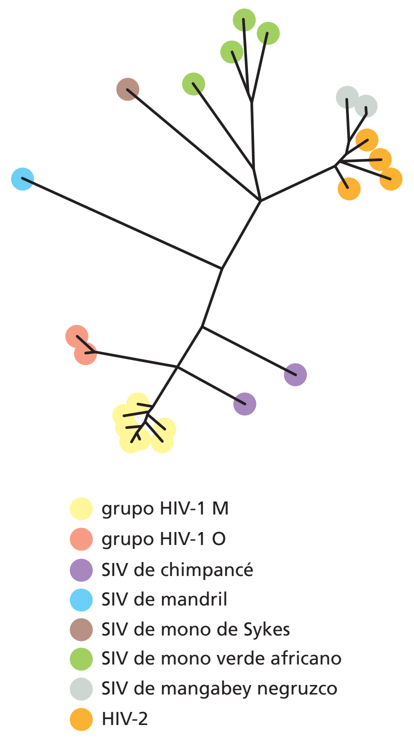


Figura 24–42 Diversificación de HIV-1, HIV-2 y cepas relacionadas de SIV. La distancia genética entre dos de los virus representados es la más corta que los une siguiendo el árbol. HIV-1 está dividido en dos grupos, el principal (M: ***m****ajor*) y el atípico (O: ***o****utlier*). El grupo HIV-1 M es responsable de la pandemia del sida y se subdivide en varios subtipos (de A hasta G, no identificados en la figura). De ellos, el subtipo B es el dominante en América y Europa; los B, C y E son dominantes en Asia, mientras que en África es detectable cualquiera de ellos. Al menos dos virus de simios, de chimpancé y de mandril, son más parecidos a HIV-1, que a HIV-2, lo que sugiere que los dos virus humanos se originaron independientemente uno de otro. Se estima que HIV-1 y SIV (chimpancé) divergieron alrededor de 1930. Este árbol se ha construido a partir de las secuencias de nucleótidos del gen *Gag*, utilizando una base de datos que contenía alrededor de 16.000 secuencias de virus obtenidas en todo el mundo.

dando lugar a la catastrófica epidemia de 1918 denominada "gripe española", a causa de la cual murieron entre 20 y 50 millones de personas en el mundo, muchas más que en la Primera Guerra Mundial. Las siguientes pandemias de gripe han sido producidas por recombinación mediante las que un nuevo segmento de DNA de la forma aviar del virus reemplazaba a uno o más segmentos de DNA vírico que codifican antígenos reconocidos por el sistema inmunitario humano (**Figura 24–43**). Tales sucesos recombinatorios permitían a los nuevos virus proliferar con rapidez y expandirse entre la población humana que, de nuevo, era inmunológicamente virgen. De manera general, en cuestión de dos o tres años las poblaciones humanas son capaces de adquirir inmunidad contra la nueva cepa recombinante del virus, dando como resultado que la tasa de infección caiga hasta un nivel basal. En los años normales, la gripe es una enfermedad leve para los adultos sanos, pero puede constituir una seria amenaza para niños y ancianos. Sin embargo, en los años de pandemia y sobre todo durante la pandemia de 1918, los adultos sanos parecen extrañamente susceptibles a la infección letal de la gripe, debido quizás a que el daño tisular causado por una respuesta inmunitaria sobredimensionada. Dado que los fenómenos de recombinación son impredecibles, no es posible predecir cuándo ocurrirá o de qué gravedad será la próxima pandemia de gripe.

Los patógenos resistentes a los fármacos constituyen un problema creciente

Mientras que algunas actividades humanas, como los viajes en avión, han favorecido la diseminación de ciertas enfermedades contagiosas, los avances en la sanidad pública y en la medicina han prevenido o aliviado los sufrimientos causados por muchas otras. La eficiencia de las vacunas y de los programas mundiales de vacunación han eliminado la viruela y han reducido significativamente la poliomielitis, mientras que muchas infecciones infantiles que antes eran mortíferas –como las paperas y el sarampión– ahora son rarezas en los países industrializados ricos. No obstante, aún existen enfermedades infecciosas devastadoras, ampliamente distribuidas, como es el caso de la malaria, para las cuales no existen vacunas efectivas.

El desarrollo de fármacos que curan las infecciones en vez de prevenirlas ha tenido un extraordinario impacto en la salud humana. Los **antibióticos**, los cuales destruyen las bacterias, constituyen la clase de fármacos que ha tenido más éxito. La penicilina fue uno de los primeros antibióticos utilizados para tratar infecciones que afectaban al hombre, introducida en los protocolos clínicos justo a tiempo para evitar decenas de miles de muertes a causa de las heridas producidas durante el desarrollo de la II Guerra Mundial. Dado que las bacterias pertenecen a un reino diferente de aquellos organismos a los cuales infectan, buena parte de la maquinaria para la replicación del DNA, la transcripción, la traducción y el metabolismo básico difiere del de su huésped. Estas diferencias permiten hallar fármacos antibacterianos que inhiben específicamente estos procesos en las bacterias, sin alterar los del

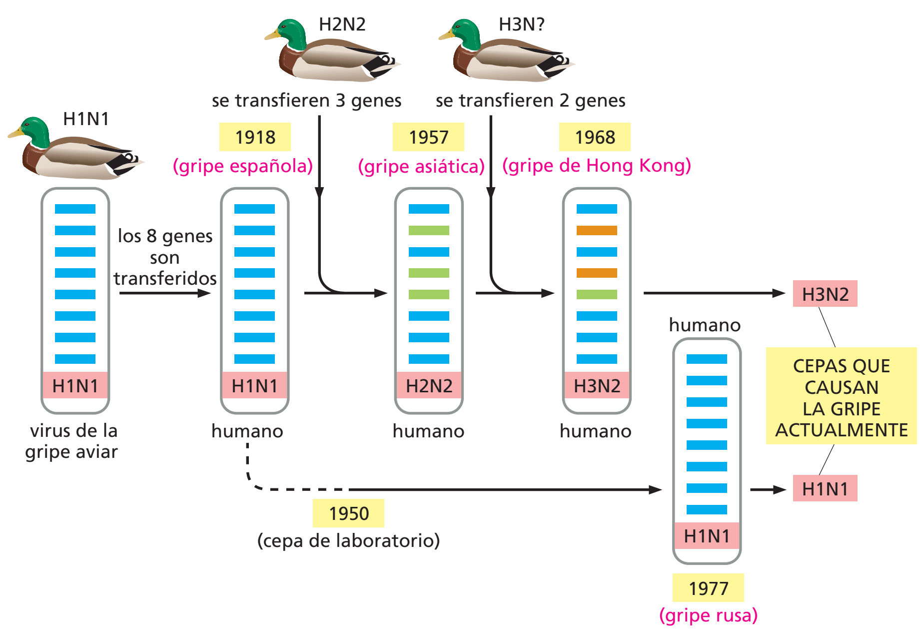


Figura 24–43 Modelo recombinatorio que explica la evolución de las cepas del virus de la gripe que han producido pandemias. El virus A de la gripe es un patógeno natural de aves, especialmente de las acuáticas, y que siempre ha estado presente en sus poblaciones naturales. Antes de 1900, el virus de la gripe sólo ocasionaba leves patologías en la especie humana y de manera ocasional. En 1918 una forma vírica especialmente virulenta cruzó la barrera entre aves y humanos causando una epidemia mundial devastadora. Esta cepa se designó como H1N1, haciendo referencia a sus principales antígenos, hemaglutinina (HA o H) y neuraminidasa (NA o N).
Los cambios originados en el propio virus, que lo volvió menos virulento, junto con un incremento en la eficacia de la inmmunidad adquirida humana, previno la pandemia en años sucesivos, aunque las cepas H1N1 de la gripe continuaron ocasionando cuadros gripales graves tanto en la población anciana como en niños. En 1957 tuvo lugar una nueva pandemia cuando los genes que codificaban HA y NA fueron reemplazados por genes equivalentes procedentes de un virus aviar (*barras verdes*); la nueva cepa (denominada H2N2) no podía ser eliminada de manera eficaz por los anticuerpos producidos en personas que habían sido infectados previamente por la cepa H1N1. En 1968, se inició otra pandemia cuando el gen para HA (pero no el gen para NA) de la cepa H2N2 fue reemplazado por otro procedente del virus aviar; la nueva cepa se denominó H3N2. En 1977, hubo un resurgimiento de la gripe H1N1, la cual había sido prácticamente reemplazada por las cepas N2. La información proporcionada por la secuenciación sugiere que esta pandemia menor fue producida por la liberación accidental de cepas víricas que habían sido mantenidas en el laboratorio desde 1950. Tal como se indica, la mayor parte de la gripe actual es producida por las cepas víricas H1N1 y H3N2.

La práctica avícola implica un estrecho contacto entre las personas y grandes poblaciones de aves, las cuales pueden ser portadoras de diferentes versiones del virus de la gripe. Estos virus aviares pueden causar, de manera ocasional, enfermedades que resultan fatales para las personas que han entrado en contacto directo con las aves infectadas (por la denominada gripe aviar), aunque por el momento estos virus no han adquirido la capacidad de diseminarse directamente entre las personas. El control de estos saltos interespecie, así como el intento de predecir el origen de la próxima pandemia de gripe, siguen siendo importantes retos en el área de la salud pública.

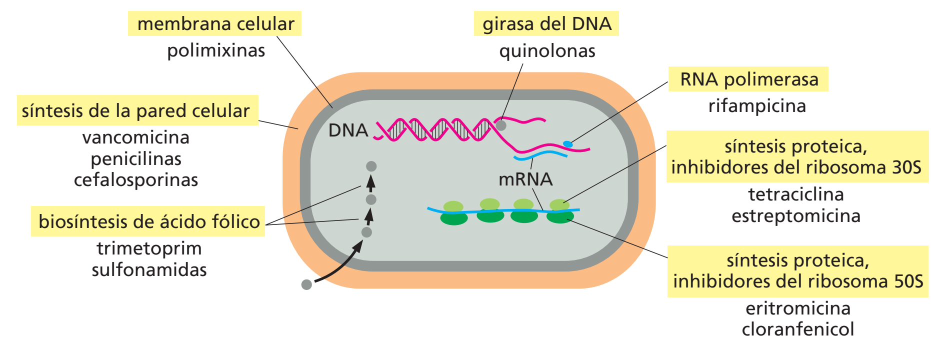


Figura 24–44 Dianas de los antibióticos. Aunque existen muchos antibióticos de uso clínico, el abanico de sus dianas, destacadas en *amarillo*, es reducido. Se adjuntan listas de los antibióticos más representativos para cada clase. Prácticamente todos los antibióticos utilizados en el tratamiento de las infecciones en humanos están incluidos en alguna de estas categorías. La inmensa mayoría inhiben la síntesis proteica o la síntesis de la pared bacteriana.

huésped. La mayoría de los antibióticos que se utilizan para tratar las infecciones bacterianas son pequeñas moléculas que inhiben este tipo de procesos en las bacterias, ya que sus dianas son enzimas que o son diferentes de sus homólogas eucariotas o están involucradas en vías que se hallan ausentes en los humanos, tales como la síntesis de la pared celular (**Figura 24–44** y Tabla 6–3).

Sin embargo, la rápida evolución de los agentes patógenos ha provocado que las bacterias hayan desarrollado rápidamente una resistencia a los antibióticos. La velocidad de ese desarrollo es tal que el tiempo que media entre la introducción de un antibiótico y la aparición de una cepa resistente al mismo sólo es de unos cuantos años. Un proceso semejante tiene lugar en los virus cuando las infecciones que causan son tratadas con agentes antivirales. Así, por ejemplo, la población vírica de una persona infectada con HIV tratada con el inhibidor de la transcriptasa inversa AZT, adquiere resistencia al fármaco al cabo de unos cuantos meses. Los protocolos actuales para el tratamiento de las infecciones por HIV incorporan la utilización simultánea de tres fármacos, lo cual minimiza la adquisición de resistencia.

Las estrategias mediante las cuales los agentes patógenos desarrollan la resistencia a los fármacos son tres. En efecto, pueden (1) alterar la diana molecular del fármaco de manera que se vuelven insensibles al mismo, (2) producir una enzima que degrade el fármaco o (3) evitar el acceso del fármaco a su diana por ejemplo mediante el bombeo activo de dicho fármaco fuera del patógeno (**Figura 24–45**).

Cuando el patógeno encuentra una estrategia efectiva de resistencia a los fármacos, los nuevos genes, mutados o adquiridos, que confieren la resistencia son diseminados al conjunto de la población de patógenos, siendo incluso transferidos a patógenos de otras especies que son tratadas con el mismo fármaco. Este es el caso del antibiótico *vancomicina*, tan efectivo como caro, que ha sido utilizado como último recurso para tratar infecciones hospitalarias resistentes a los otros antibióticos. La vancomicina inhibe una etapa de la síntesis de la pared bacteriana al unirse a la cadena naciente de peptidoglicano e impidiendo que forme puentes cruzados con otras cadenas (véase la Figura 24–4). La resistencia se puede originar cuando la bacteria sintetiza un tipo diferente de pared, utilizando otras subunida-

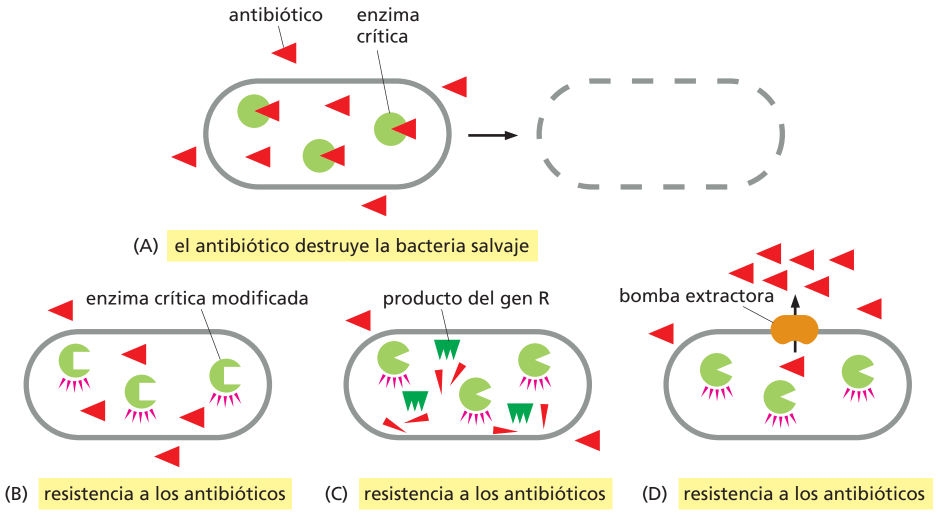


Figura 24–45 Tres mecanismos comunes que generan resistencia a antibióticos. (A) Las bacterias no resistentes que se hallan en contacto con un fármaco (*triángulos rojos*) que se une e inhibe a una enzima crítica (*verde claro*), serán destruidas a consecuencia de la inhibición enzimática. (B) Las bacterias que presentan una diana enzimática modificada, de manera que no pueden interaccionar con el fármaco, sobrevivirán y proliferarán. En muchos casos, una mutación puntual en el gen que codifica la proteína diana, puede generar la resistencia. (C) Las bacterias que expresan un gen de resistencia (factor-R) que codifica una enzima (*verde oscuro*) que degrada o modifica covalentemente el fármaco, sobrevivirán y proliferarán. Así, por ejemplo, algunas bacterias resistentes producen beta-lactamasa, la cual degrada la penicilina y otros compuestos similares. (D) Otras bacterias resistentes expresan o activan bombas que expulsan el fármaco fuera del citoplasma bacteriano, utilizando para ello energía procedente del ATP o del gradiente electroquímico que se produce a través de sus membranas. Algunas bombas que extraen el fármaco, como TetR que confiere resistencia a la tetraciclina, son específicas para un solo fármaco. Otras, sin embargo, denominadas bombas de resistencia a múltiples fármacos (MDR), son capaces de exportar una amplia variedad de fármacos no relacionados estructuralmente, lo que conduce a la adquisición por la bacteria de resistencia a un gran número de fármacos en una sola vez.

des que no se unen a la vancomicina. La forma más importante de resistencia a la vancomicina depende de un transposón que contiene siete genes, los productos de los cuales actúan de forma conjunta detectando la presencia de vancomicina, deteniendo la vía habitual de síntesis de la pared bacteriana y generando otro tipo de pared. Aunque la conjunción de los siete genes en un único transposón ha debido representar un difícil paso evolutivo (lo certifica el que hayan sido necesarios quince años para lograrlo), actualmente el transposón es transferido fácilmente a otras especies de bacterias patógenas.

¿De dónde proceden los genes de resistencia a los fármacos? En ocasiones, cuando las bacterias están bajo presión selectiva como consecuencia de la exposición a los fármacos, los genes de resistencia a los fármacos se originan por mutación espontánea y se diseminan dentro de la población. Sin embargo, en muchos casos aparecen en un genoma patógeno como nuevos segmentos de DNA adquiridos mediante transferencia horizontal, con frecuencia transportados por transposones o plásmidos con capacidad de replicación. A diferencia de las células eucariotas, las bacterias intercambian habitualmente material genético a través de la frontera que representa la especie.

Parece que con frecuencia los genes de resistencia a fármacos adquiridos por transferencia horizontal proceden de reservorios ambientales, donde tienen un importante papel en la competencia entre los microorganismos. La práctica totalidad de los antibióticos utilizados actualmente en el tratamiento de enfermedades infecciosas no son productos sintéticos obtenidos por químicos, si no que muy al contrario, la mayoría de ellos son productos naturales producidos por hongos y bacterias. Así, la penicilina es producida por el hongo *Penicillium* y más del 50% de los antibióticos utilizados en la práctica clínica habitual son producidos por las bacterias Gram-positivas del género *Streptomyces*. Se supone que estos microorganismos producen compuestos antimicrobianos que utilizan como armas en su competencia con otros microorganismos en el medio ambiente. Probablemente, muchos de estos compuestos han existido en la Tierra desde hace cientos de millones de años, tiempo suficiente como para que otros microorganismos, así como los propios organismos que producen antibióticos, hayan desarrollado mecanismos de resistencia. Análisis no sesgados de bacterias procedentes de muestras de suelos, que nunca han estado expuestas a antibióticos de manera expresa, muestran que las bacterias ya son resistentes a siete u ocho antibióticos utilizados en la práctica clínica. Cuando los microorganismos patógenos hacen frente a la presión selectiva que constituyen los tratamientos antibióticos pueden surtirse, aparentemente, de esta fuente universal e inagotable de material genético para adquirir resistencia.

Como en tantos otros aspectos de las enfermedades infecciosas, el problema ocasionado por la resistencia a los fármacos ha sido amplificado por el comportamiento humano. Muchos pacientes toman antibióticos para tratar enfermedades de origen vírico, como gripe, resfriados, faringitis y otitis, para las que no son efectivos. El uso de antibióticos de manera crónica e inadecuada puede al final provocar la adquisición de resistencia por parte de la flora normal, la cual posteriormente puede ser transferida a los patógenos. Así, por ejemplo, de este modo se originaron diversos brotes de la diarrea infecciosa causada por *Shigella flexneri*, caracterizados por su resistencia a los antibióticos. El problema es particularmente grave en países en los que los antibióticos pueden obtenerse sin receta médica, como es el caso de Brasil, donde más del 80% de las cepas de *S. flexneri* obtenidas de pacientes infectados son resistentes a cuatro o más antibióticos.

Los antibióticos también son utilizados de forma indebida en la práctica agropecuaria, donde constituyen aditivos habituales de la alimentación de los animales para asegurarse un crecimiento saludable de los mismos. Así, existe un amplio consenso con respecto a que la utilización en Europa de un antibiótico estrechamente relacionado con la vancomicina, como aditivo en la alimentación del ganado, desarrolló una resistencia en la flora normal de los animales y ésta podría constituir uno de los orígenes de las bacterias resistentes a la vancomicina que actualmente amenaza la vida de los pacientes hospitalizados.

Dado que la adquisición de resistencia a los antibióticos es inevitable, resulta crucial el desarrollo continuo de nuevos tratamientos para las enfermedades infecciosas. También deberíamos intentar retrasar de algún modo la aparición de la resistencia a los fármacos.

Resumen

Todos los agentes patógenos comparten la capacidad de interactuar con las células huésped de modo que faciliten tanto su proliferación como su diseminación, siendo estas interacciones huésped-pa-

tógeno de diversa naturaleza. A menudo, los agentes patógenos colonizan el huésped adhiriéndose o invadiendo directamente los epitelios que limitan los tractos respiratorio, gastrointestinal y urinario, así como otras superficies que se encuentran en contacto directo con el ambiente externo. Los patógenos intracelulares, como virus y la mayoría de bacterias y protozoos, invaden las células huésped proliferando en el interior de las mismas, siendo infectadas por medio de diversos mecanismos. Así, los virus utilizan sobre todo la endocitosis mediada por receptor mientras que las bacterias aprovechan los mecanismos de adhesión celular y de fagocitosis; en ambos casos, la célula huésped proporciona la maquinaria y la energía necesarias. Por el contrario, los protozoos utilizan estrategias invasivas particulares que, en general, requieren de un gasto energético por parte del invasor. Una vez en el interior celular, los patógenos buscan un compartimiento celular que sea favorable para su proliferación, alterando, frecuentemente, el tráfico de membranas y utilizando el citoesqueleto de la célula huésped para desplazarse por el interior de la célula. Los agentes patógenos, además de alterar el comportamiento de sus células, también alteran el comportamiento del individuo huésped favoreciendo su diseminación a un nuevo huésped. Además, los patógenos evolucionan tan rápido que, mientras aparecen nuevas enfermedades, los antiguos patógenos adquieren nuevas capacidades para evadirse de los intentos para tratarlas, prevenirlas y erradicarlas.

EL SISTEMA INMUNITARIO INNATO Y LAS BARRERAS FRENTE A LA INFECCIÓN

La población humana está expuesta a millones de patógenos, a través del contacto, la ingestión y la inhalación. Nuestra capacidad para evitar infecciones reside, en buena parte, en el sistema inmunitario adquirido (se describe en el Capítulo 25), el cual recuerda encuentros previos con determinados patógenos, destruyéndolos de manera específica o eliminándolos cuando se produce un nuevo ataque. Pero estas respuestas inmunitarias adquiridas se desarrollan muy lentamente durante la primera exposición a un nuevo patógeno, ya que los clones específicos de linfocitos B y T con capacidad para responderle tienen que activarse y proliferar. En cualquier caso, es necesaria una semana como mínimo para que la respuesta sea efectiva. Por el contrario, una bacteria que tenga un periodo de duplicación de 1 hora, en un solo día puede producir una progenie de casi veinte millones de individuos, es decir, desarrollar una infección completa. Por lo tanto, durante las críticas primeras horas y días de exposición a un nuevo patógeno, dependemos de nuestro **sistema inmunitario innato** para protegernos de las infecciones. Tal como se describirá en el Capítulo 25, también dependemos de nuestro sistema inmunitario innato para activar las respuestas inmunitarias adquiridas.

Las respuestas inmunitarias innatas no son específicas para un determinado patógeno como sí lo son las respuestas adquiridas. De manera general, existen tres líneas de defensa inmunitaria innatas que pueden prevenir la infección o bloquearla antes de que sea necesario el concurso del sistema inmunitario adquirido. Las primeras son las barreras físicas y químicas que impiden el fácil acceso de los microorganismos al interior de nuestro organismo. Éstas incluyen la gruesa capa de células muertas queratinizadas que forman la superficie de nuestra piel, las uniones estrechas entre las células epiteliales, el pH ácido del estómago y los componentes de las capas de moco que inhiben su colonización o incluso matan las bacterias patógenas. La flora normal también participa en la protección de las superficies corporales contra los invasores ya que, al competir por el mismo nicho ecológico, se limita la colonización de dichas superficies.

La segunda línea de defensa innata está formada por las respuestas celulares intrínsecas mediante las que una célula reconoce que ha sido infectada y emprende acciones para matar o inactivar al invasor. Así, la mayoría de las células que han endocitado una bacteria mediante un proceso de fagocitosis inducido por el patógeno (véase la Figura 24–26) dirigen de manera inmediata al fagosoma hacia su fusión con un lisosoma, exponiendo así al microorganismo invasor a un aluvión de enzimas digestivas. Otro antiguo mecanismo de defensa intrínseco es la habilidad que poseen las células huésped para degradar RNA de doble cadena, el cual es un intermediario común en la replicación vírica. Las células infectadas pueden incluso degradar cualquier RNA de cadena sencilla que comparta secuencia con el de doble cadena. Este mecanismo no sólo sirve como una efectiva defensa contra muchas de las infecciones víricas, sino que también permite a los biólogos celulares manipular la expresión génica mediante la técnica de RNA de interferencia (RNAi).

La tercera línea de defensa depende de un conjunto especializado de proteínas y células fagocitarias que reconocen elementos de los patógenos que se han conservado y resultan

rápidamente activadas, colaborando en la destrucción de los invasores. Entre ellas se hallan las células fagocitarias profesionales tales como neutrófilos, macrófagos, células citotóxicas naturales y el sistema del complemento. Mientras que el sistema inmunitario adquirido se originó hace menos de 500 millones de años y sólo lo presentan los vertebrados, las respuestas innatas son operativas tanto en vertebrados, como en invertebrados y plantas, siendo similares los mecanismos básicos que las regulan. Tal como se explica en el Capítulo 25, las respuestas innatas de los vertebrados son un requisito para la activación de las de tipo adquirido, produciendo moléculas de señalización extracelulares que facilitan la activación del sistema inmunitario adquirido.

Los epitelios y las defensinas colaboran en la prevención de las infecciones

En los vertebrados, tanto la piel como otros epitelios, incluyendo los que revisten los tractos respiratorio, intestinal y urinario (**Figura 24–46**), constituyen una barrera física entre el interior del organismo y el mundo exterior. Una capa de moco aporta una protección adicional a las superficies epiteliales interiores contra las agresiones de origen microbiano, mecánico o químico. Incluso la piel de muchos anfibios y peces también está cubierta por una capa de moco. Este recubrimiento viscoso, constituido por mucinas y glucoproteínas de secreción, dificulta físicamente la adhesión de los patógenos al epitelio. También facilita la eliminación de los patógenos mediante los cilios de los epitelios vibrátiles (descrito en Capítulo 23).

La capa de moco también contiene productos que matan a los agentes patógenos o inhiben su proliferación. Entre los más abundantes se encuentran los péptidos antimicrobianos, denominados **defensinas**, los cuales se encuentran en todos los animales y plantas. En general, son pequeños (entre 12 y 50 aminoácidos), están cargados positivamente y contienen dominios hidrofóbicos o anfipáticos. Constituyen una familia heterogénea con un amplio espectro de actividad antimicrobiana, la cual incluye la capacidad para destruir o inactivar tanto bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, como hongos (incluidas levaduras), parásitos (como protozoos y nematodos) e incluso virus con envoltura como el HIV. Las defensinas también constituyen las proteínas más abundantes de los neutrófilos (véase más adelante), los cuales las utilizan para destruir los patógenos que han fagocitado.

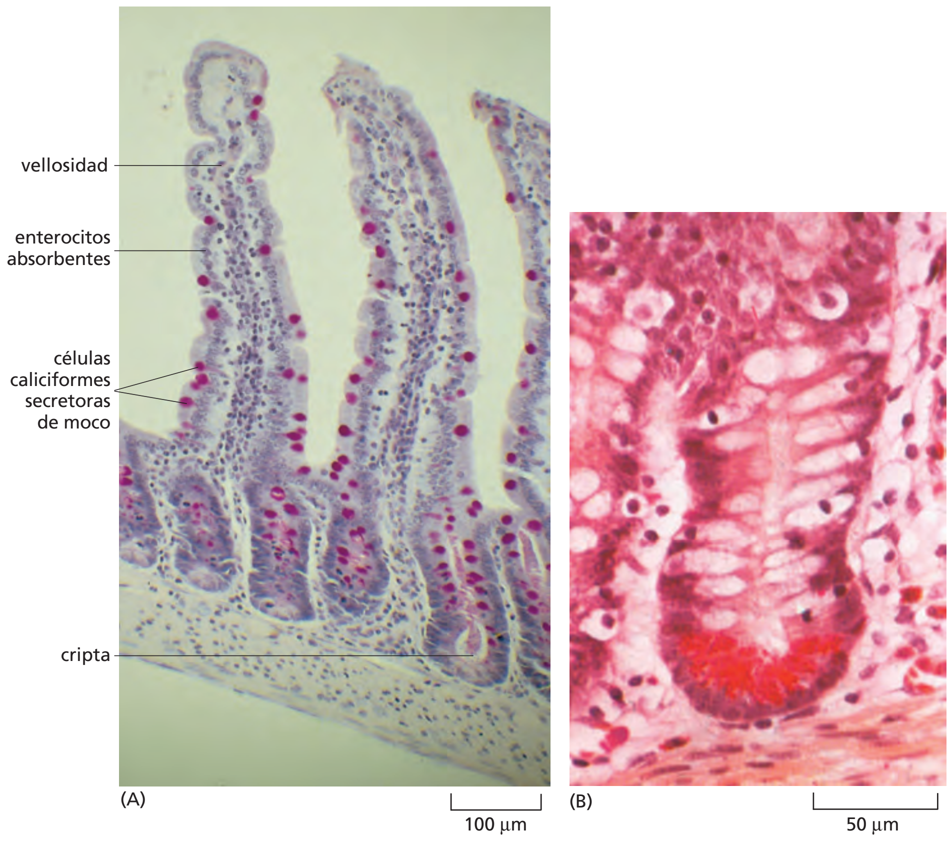


Figura 24–46 Defensas epiteliales contra la infección por microorganismos. (A) Corte transversal de intestino delgado humano que muestra tres vellosidades. Las células caliciformes que secretan moco se tiñen en color *magenta*. La capa de moco protector cubre las superficies expuestas de estas células, en cuya base se encuentran las *criptas*, lugar de proliferación de las células epiteliales. (B) La imagen amplificada de una cripta teñida permite observar los gránulos de las células de Paneth (*escarlata*). Estas células secretan a la luz intestinal grandes cantidades de defensinas y otros tipos de péptidos antimicrobianos. (B, por cortesía de H.G. Burkitt, de P.R. Wheater, Functional Histology, 2.ª ed. Londres: Churchill-Livingstone, 1987.)

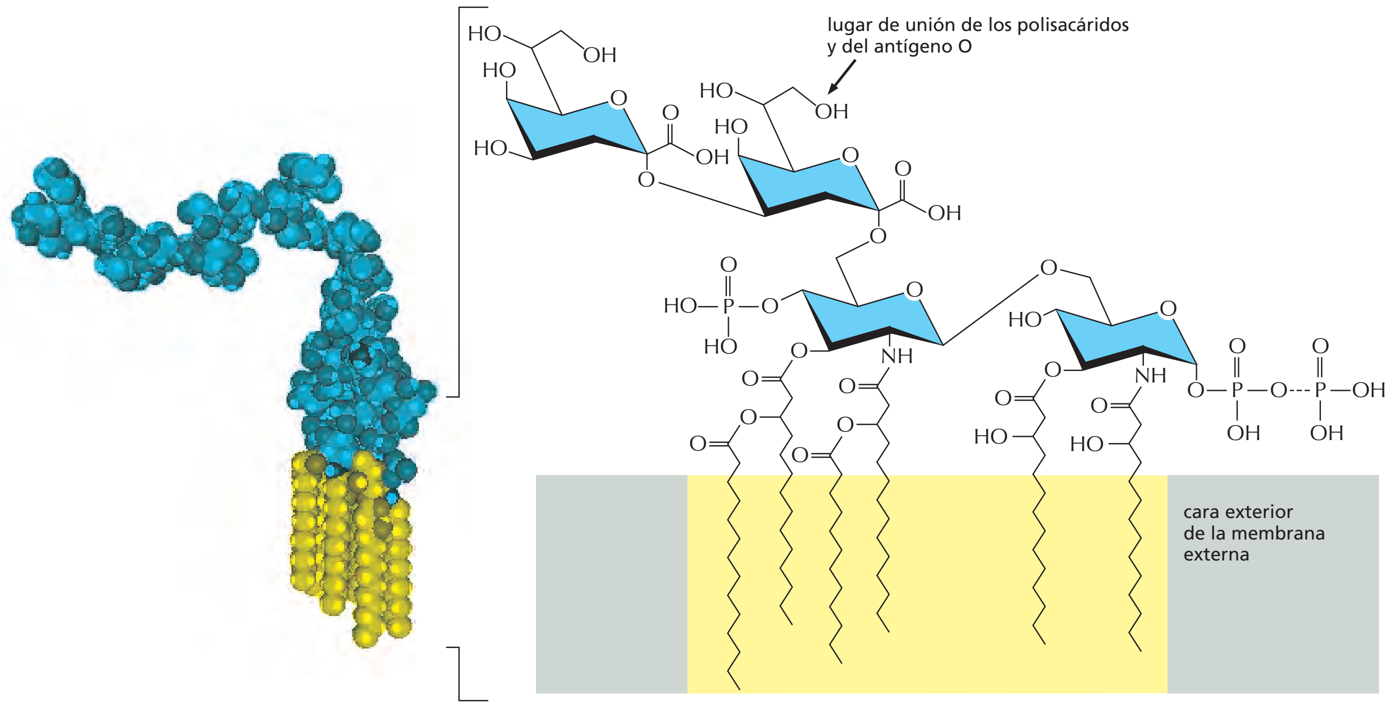


Figura 24–47 Estructura del lipopolisacárido (LPS). A la *izquierda*, estructura tridimensional de la molécula de LPS, mostrando las colas de los ácidos grasos en *amarillo* y los glúcidos en *azul*. La estructura molecular de la región basal de LPS se representa detalladamente a la *derecha*. El anclaje a la membrana está constituido por dos residuos de glucosamina enlazados, a los que se unen tres grupos fosfato y seis ácidos grasos. Anclada a esta estructura se encuentra una larga cadena de carbohidratos que está a menudo ramificada. El esquema muestra el tipo de LPS más sencillo que permite vivir a *E. coli*; tiene una cadena de tan sólo dos residuos glucídicos idénticos (ácido 3-desoxi-D-manooctulosónico). Las bacterias Gram-negativas salvajes también presentan, en el punto señalado por la *flecha*, un *núcleo de oligosacárido* compuesto por 8-12 residuos y un largo polisacárido, *antígeno O*, constituido por una secuencia glucídica muy repetida (hasta 40 veces). Los azúcares que forman el núcleo de oligosacáridos y el polisacárido que constituye el antígeno O varían entre las diferentes especies bacterianas e, incluso, entre cepas de la misma especie. Todas las formas de LPS estimulan intensamente las respuestas inmunitarias innatas.

Todavía se desconoce el modo concreto en que las defensinas destruyen a los patógenos. Una posibilidad es que utilicen sus dominios hidrofóbicos o anfipáticos para insertarse en la membrana de sus víctimas y provocar una discontinuidad en estas membranas. Parte de la selectividad que muestran por los patógenos con respecto a las células huésped reside en su preferencia por membranas carentes de colesterol. Tras la ruptura de la membrana del patógeno, los péptidos cargados positivamente pueden interaccionar con dianas del patógeno cargadas negativamente, como podría ser su DNA. Además, dada la naturaleza poco específica de la interacción que se produce entre los péptidos antimicrobianos y los microorganismos diana, resulta difícil para los patógenos adquirir resistencia contra ellas. De este modo, las defensinas y otros péptidos antimicrobianos pueden constituirse como útiles agentes terapéuticos para combatir las infecciones, ya sea solos o en combinación con otros fármacos más tradicionales.

Las células humanas reconocen características que se encuentran conservadas en los patógenos

En algunas ocasiones, los microorganismos rompen la continuidad epitelial. En este caso, los sistemas inmunitarios innato y adquirido han de reconocerlos y destruirlos sin dañar al huésped. En consecuencia, estos sistemas han de reconocer aquello que es propio de lo que no lo es. En el Capítulo 25 se describe cómo realiza esta diferenciación el sistema inmunitario adquirido. Por su parte, el sistema innato está basado en el reconocimiento de tipos específicos de moléculas que son comunes entre numerosos patógenos, pero que se encuentran ausentes en el huésped. Estas moléculas asociadas a los patógenos (denominadas *inmunoestimulantes asociados a patógenos* o *a microorganismos*) desencadenan dos tipos de respuestas innatas, las *respuestas inflamatorias* (tratadas más adelante) y la fagocitosis que llevan a cabo fagocitos profesionales (macrófagos y neutrófilos) y *células dendríticas*, los cuales activan los linfocitos T pertenecientes al sistema inmunitario adquirido. Tanto las respuestas inflamatorias como las fagocíticas se producen muy rápido, aun en el caso en el que el huésped no haya estado nunca en contacto con un determinado patógeno.

Los **inmunoestimulantes asociados a microorganismos** son de diferentes tipos. La mayoría de ellos no son exclusivos de patógenos sino que también se encuentran en numerosas bacterias, tanto nocivas como inocuas. El inicio de la traducción bacteriana se diferencia del de los eucariotas en que como primer aminoácido utilizan la *metionina formilada* en lugar de utilizar metionina no modificada. Por consiguiente, cualquier péptido que tenga formilmetionina en el extremo amino tiene que ser de origen bacteriano. Los péptidos que contienen formilmetionina actúan como potentes quimioatrayentes para los neutrófilos, los cuales

migran rápidamente a la fuente de estos péptidos y fagocitan a las bacterias que los producen (véase la Figura 16–101).

Además, la superficie exterior de muchos microorganismos está compuesta de moléculas que no existen en sus huéspedes pluricelulares, por lo que estas moléculas también actúan como inmunoestimulantes. Entre ellas se encuentran el peptidoglucano de la pared celular, los flagelos bacterianos, el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram-negativas (**Figura 24–47**) y los ácidos teicoicos de las Gram-positivas (véase la Figura 24–4B). Bajo esta denominación también se incluyen diversas moléculas de las paredes de los hongos como mananos, glucanos y quitina. Finalmente, debe tenerse en cuenta que numerosos parásitos eucariotas presentan componentes únicos en su membrana que también actúan como inmunoestimulantes, como es el caso del glicosilfosfatidilinositol en *Plasmodium*. Con objeto de evitar provocar respuestas inmunitarias innecesarias, el huésped tiene que ser capaz de distinguir entre los inmunoestimulantes asociados a microorganismos producidos por patógenos y las moléculas muy parecidas o idénticas producidas por la flora normal. En muchos casos, la diferencia en la concentración de los inmunoestimulantes puede ser suficiente. Así, bajas concentraciones crónicas pueden ser detectadas por el sistema inmunitario pero no provocan ninguna reacción, mientras que incrementos súbitos en las mismas o la aparición de inmunoestimulantes en regiones del organismo habitualmente estériles pueden provocar una respuesta inmunitaria innata.

Además, cortas secuencias de los DNA bacteriano o vírico también actúan en este mismo sentido. El responsable de este hecho es un “motivo CpG”, que consta del dinucleótido no metilado CpG flanqueado por dos residuos de purina en 5´ y dos de pirimidina en 3´. Esta secuencia es al menos 20 veces menos frecuente en el DNA de vertebrados que en el DNA bacteriano o vírico, y puede activar las respuestas inmunitarias innatas.

Los diferentes tipos de inmunoestimulantes asociados a los microorganismos, con frecuencia se encuentran formando patrones repetitivos; por este motivo, en general se denominan *patrones moleculares asociados a patógenos* (*PAMP*: ***p**athogen-**a**ssociated **m**olecular **p**atterns*). Estos patrones son reconocidos por diversos tipos de receptores específicos del huésped, que, colectivamente, se denominan **receptores de reconocimiento de patrón**. Incluyen receptores solubles plasmáticos (p. ej., componentes del sistema del complemento, que serán tratados más adelante), así como receptores de membrana, tanto externos como internos (que incluyen miembros de la familia de los *receptores homólogos a Toll*, los cuales también serán tratados posteriormente). Los receptores celulares cumplen dos funciones: inician la fagocitosis del patógeno y activan un programa de expresión génica en la célula huésped que estimula la producción de respuestas inmunitarias innatas. Por su parte, algunos de los componentes del complemento también participan en la fagocitosis del patógeno y, en algunos casos, en su destrucción directa, tal como se describe a continuación.

La activación del complemento dirige a los patógenos hacia su fagocitosis o su lisis

El **sistema de complemento** está compuesto por unas 20 proteínas solubles que interaccionan entre sí, son sintetizadas por el hígado y circulan por la sangre y el medio extracelular. La mayoría de ellas se encuentran inactivas hasta que son estimuladas por una infección. Originalmente se describieron por su capacidad para amplificar y “complementar” la acción de los anticuerpos, aunque algunos de los componentes del complemento también son receptores de reconocimiento de patrón y son activados de forma directa por inmunoestimulantes asociados a microorganismos.

Los *componentes tempranos del complemento* son los primeros en ser activados. Se distribuyen en tres grupos que se asocian con las tres vías que se han descrito para la activación del complemento: la *vía clásica,* la *vía de las lectinas* y la *vía alternativa*. Los componentes tempranos de las tres vías actúan de forma local activando a C3, el cual es el componente central del complemento (**Figura 24–48**). Los individuos que presentan deficiencia de C3 están sujetos a repetidas infecciones bacterianas. Estos componentes tempranos son proenzimas que deben ser activadas por escisión proteolítica. La escisión de cada una de las proenzimas de la serie activa a la siguiente y genera una serina proteasa, la cual escindirá la siguiente proenzima y así sucesivamente. Dado que cada enzima, una vez activada, escinde numerosas moléculas de la siguiente proenzima, la activación de los componentes tempranos constituye un sistema amplificador, es decir, una *cascada proteolítica*.

Muchas de estas escisiones proteolíticas liberan un pequeño fragmento capaz de atraer células fagocitarias como neutrófilos y un fragmento mayor que se une a la membrana. La unión de este fragmento a la membrana de un patógeno facilita la activación de la siguiente reacción de la cadena. De este modo, la activación del complemento está restringida, básicamente, a la superficie celular donde se inició. El fragmento mayor de C3, denominado C3b, se une de manera covalente a la superficie del patógeno, donde recluta fragmentos proteolíticos de C2 y C3 formando un complejo proteolítico (C4b, C2b, C3b) que cataliza las siguientes etapas de la cascada del complemento. Los mismos receptores específicos de las células fagocitarias que incrementan la capacidad de estas células para fagocitar los patógenos también reconocen C3b. Además, los linfocitos B también pueden reconocer C3b, razón por la cual los patógenos a los que se ha unido C3b son especialmente eficientes en estimular a los linfocitos B para la producción de anticuerpos (tratado en el Capítulo 25). El fragmento pequeño de C3, denominado C3a, así como fragmentos de C4 y C5 (véase la Figura 24–48), actúan de forma independiente como señales solubles que estimulan una respuesta inflamatoria, ya que reclutan en el lugar de la infección a fagocitos y linfocitos.

La **vía clásica** es activada por anticuerpos IgG o IgM (se describe en el Capítulo 25) que se encuentran unidos a la superficie de un microbio. La proteína que inicia la segunda vía de activación del complemento, denominada **lectina de unión a mananos**, es una proteína sérica que forma complejos de hasta seis dominios de reconocimiento de glúcidos unidos a una estructura central, homóloga al colágeno. Este conjunto se une específicamente a los residuos de manosa y fucosa que están a distancias y en disposiciones características en las paredes de las bacterias, de manera que pueden ser reconocidos al mismo tiempo por todos los dominios, constituyendo un buen ejemplo de un receptor de reconocimiento de patrón. Estos procesos de unión que suceden en las vías clásica y dependiente de lectina provocan el reclutamiento y la activación de los componentes tempranos del complemento. A menudo, algunas de las moléculas de la superficie de los patógenos activan la **vía alternativa**, que también puede ser activada por las vías clásica y la dependiente de lectinas, dando lugar a un bucle de retroalimentación positiva que amplifica los efectos de estas dos últimas.

Las células huésped producen varias proteínas y modifican su superficie evitando que la reacción del complemento tenga lugar sobre su propia superficie. La más importante de ellas es la incorporación de ácido siálico, un constituyente común de glucoproteínas y glucolípidos de la superficie celular. Dado que por lo general los patógenos carecen de estos componentes, son identificados para su destrucción, mientras que las células del huésped son ignoradas. Sin embargo, al menos un patógeno, *Neisseria gonorrhoeae*, agente causal de la gonorrea, enfermedad de transmisión sexual, ha desarrollado esta capacidad autoprotectora del huésped. Rodeándose de una capa de ácido siálico, queda protegido frente a la activación del sistema de complemento.

Los fragmentos C3b, producidos por cualquiera de las tres vías, una vez inmovilizados sobre una membrana, inician una cascada de reacciones que conducen al ensamblaje de los

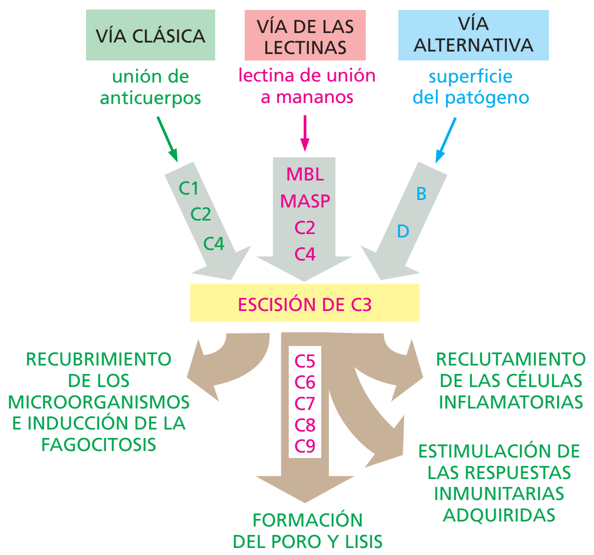


Figura 24–48 Etapas principales de la activación del complemento por las vías clásica, de las lectinas y alternativa. Por cualquiera de las tres vías, la activación del complemento tiene lugar en la superficie de un microorganismo invasor, como por ejemplo una bacteria, lo que ocasiona la escisión de C3. Los factores C1-C9, lectina de unión a mananos (MBL), la serina proteasa asociada a MBL (MASP) y los factores B y D, constituyen los componentes esenciales del sistema de complemento, mientras que otros factores tienen un papel regulador. Los componentes tempranos se incluyen en *flechas grises*, mientras que los más tardíos se muestran en las *flechas marrones*.

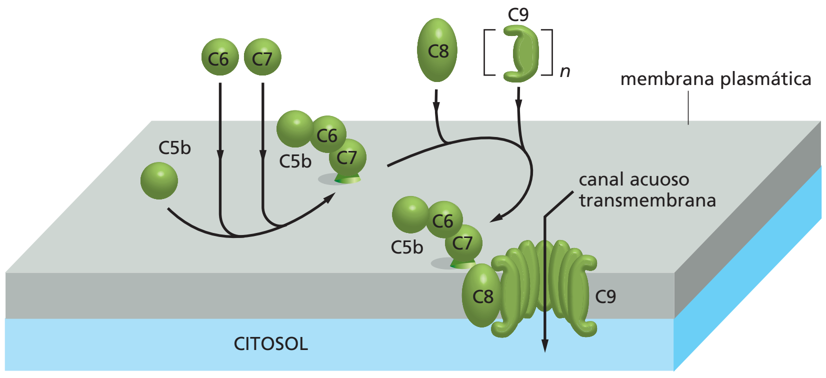


Figura 24–49 Ensamblaje de los componentes tardíos del complemento, que da lugar a la formación del complejo de ataque a la membrana. El componente C3b producido por cualquiera de las tres vías activadoras del complemento, es inmovilizado en la membrana, donde recluta C4b y C2b formando un complejo proteolítico. A continuación, este complejo escinde el primero de los componentes tardíos, C5 y da lugar a los fragmentos C5a (no mostrado) y C5b. Este último continúa unido débilmente a C3b (no se muestra), pero se ensambla rápido con C6 y C7 dando lugar a C567, que permanece firmemente unido a la membrana a través de C7, como muestra la figura. La unión de una molécula de C9 a C5678, induce un cambio en la conformación en C9 que acaba por exponer una región hidrofóbica, lo que provoca la inserción de C9 en la membrana de la célula diana. Este proceso da inicio a una reacción en cadena, en la que la molécula C9 modificada capta una segunda molécula C9, la cual hará lo propio con una tercera, y así sucesivamente. De este modo una cadena de moléculas C9 formará un gran poro transmembrana.

componentes tardíos y la formación de los *complejos de ataque a la membrana* (**Figura 24–49**). Estos complejos se ensamblan en la membrana del agente patógeno cerca del lugar de activación de C3, formando un poro que la atraviesa, el cual es visible mediante el microscopio electrónico tras un contraste negativo (**Figura 24–50**). Por esta razón, además de perturbar la estructura de la bicapa lipídica, incrementan la permeabilidad de la membrana y, en algunos casos, pueden producir la lisis bacteriana, asemejándose así a las defensinas.

Las propiedades autoamplificadoras, inflamatorias y destructivas de la cascada del complemento, hacen necesario que los componentes clave, una vez activados, sean desactivados con rapidez de manera que su ataque no se extienda a las células vecinas. Este proceso de inactivación se produce, como mínimo, de dos maneras. En primer lugar, unas proteínas inhibidoras específicas que se encuentran en el plasma o en la superficie de las células huésped detienen la cascada, uniéndose o escindiendo proteolíticamente algunos de los componentes activados. En segundo lugar, muchos de los componentes de la cascada son inestables, de manera que pasan rápidamente a un estado inactivo, a menos que se unan de inmediato a un componente apropiado del complemento dentro de la cascada o a una membrana próxima.

Las proteínas homólogas a Toll y las proteínas NOD constituyen una antigua familia de receptores de reconocimiento de patrón

Muchos de los receptores de reconocimiento de patrón que en mamíferos son responsables de desencadenar las respuestas inmunitarias innatas frente a los patógenos pertenecen a la familia de **receptores homólogos a Toll (TLR: *Toll-like receptors*)**. En *Drosophila*, Toll es una proteína transmembrana con un gran dominio extracelular, compuesto por repeticiones de secuencias ricas en leucina (véase la Figura 15–82). Originalmente Toll fue identificada como una proteína involucrada en el establecimiento de la polaridad dorso-ventral en los embriones de la mosca en desarrollo (descrito en Capítulo 22). Sin embargo también está involucrada en la resistencia que presenta la mosca adulta a las infecciones de origen fúngico. Cuando una mosca queda expuesta a un hongo patógeno, la vía intracelular de transducción de la señal generada a partir de Toll provoca la translocación de NFκB al interior del núcleo (descrito en el Capítulo 15), donde activa la transcripción de diversos genes, incluyendo los que codifican las defensinas antifúngicas. Las repeticiones ricas en leucina que se encuentran en las moléculas Toll y TLR constituyen motivos estructurales versátiles, muy útiles para la unión a una gran variedad de ligandos. Aparte de su papel en el reconocimiento de patógenos, tanto en animales como en plantas, las proteínas que poseen estas repeticiones ricas en leucina participan en la transducción de señal, en la reparación del DNA y en la adhesión tanto intercelular como con la matriz extracelular.

Los humanos disponemos como mínimo de 10 TLR, algunos de los cuales desempeñan un importante papel en el reconocimiento por parte del sistema inmunitario innato de inmunoestimulantes asociados a microorganismos producidos por bacterias, virus, hongos y parásitos. Diferentes ligandos activan diferentes TLR: por ejemplo, TLR4 reconoce el LPS característico de las bacterias Gram-negativas, mientras que TLR9 reconoce las secuencias CpG y TLR5 reconoce la proteína del flagelo bacteriano. La mayoría de los TLR se encuentran en la membrana celular y son muy abundantes en la superficie de macrófagos, células den-

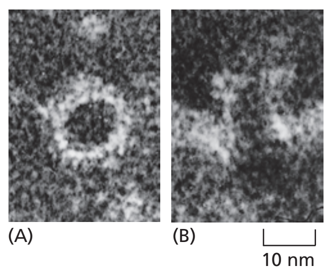


Figura 24–50 Electromicrografías de contraste negativo, obtenidas con el microscopio electrónico de transmisión, que muestran las alteraciones producidas por el sistema de complemento en la membrana de un eritrocito. El poro se observa *frontalmente* en (A) y *longitudinalmente* en (B), mostrando la morfología de un canal transmembrana. La sal metálica del contraste negativo llena el canal, por lo que éste se observa de color negro. Este hematíe ha sido sensibilizado de manera deliberada para hacerlo susceptible a la lisis por el complemento (De R. Dourmashkin, *Immunology* 35:205–212, 1978. Con la autorización de Blackwell Publishing.)

dríticas y neutrófilos, así como en la superficie de los epitelios que recubren los tractos respiratorio e intestinal. Otros, por el contrario, están asociados con membranas intracelulares donde detectan patógenos intracelulares. Los TLR actúan como sistemas de alarma que alertan a los sistemas inmunitarios innato y adquirido de que se está preparando una infección. En mamíferos, activan diversas vías de señalización, las cuales activan la transcripción de centenares de genes, especialmente los que promueven respuestas inflamatorias (descritos más adelante) y colaboran en la inducción de las respuestas inmunitarias adquiridas (**Figura 24–51**).

Una segunda familia de receptores de reconocimiento de patrón es exclusivamente intracelular. Se denominan **proteínas NOD** y también disponen de motivos repetitivos ricos en leucina. Aunque en términos funcionales son similares a los TLR, reconocen un conjunto diferente de ligandos, incluidos algunos componentes de la pared bacteriana. Las diferentes formas alélicas de NOD y de TLR que expresa un individuo son determinantes en cuanto a la sensibilidad que presentará dicho individuo frente algunas enfermedades infecciosas. Así, por ejemplo, determinados polimorfismos de TLR4 y de TLR5 muestran una correlación con la susceptibilidad frente a *Legionella pneumophila*, mientras que los miembros de familias que expresan un determinado alelo de NOD2 tienen una mayor probabilidad de padecer la enfermedad de Crohn, una patología inflamatoria del intestino delgado que parece ser inducida por una infección bacteriana.

Las proteínas relacionadas con Toll, TLR y NOD están aparentemente implicadas en la inmunidad innata de cualquiera de los organismos pluricelulares. En las plantas, unas proteínas con repeticiones ricas en leucina y dominios homólogos a la región citoplasmática de TLR son necesarias para proporcionar resistencia a las plantas frente a patógenos, ya sean de origen fúngico, bacteriano o vírico (**Figura 24–52**). Parece que al menos dos familias de proteínas que forman parte del sistema inmunitario innato –las defensinas y los TLR/NOD– son muy antiguas desde un punto de vista evolutivo, anteriores quizás a la separación entre animales y vegetales que tuvo lugar hace mil millones de años. Su conservación a lo largo de la evolución subraya la importancia de estas respuestas inmunitarias innatas en la defensa contra microorganismos patógenos.

Las células fagocitarias detectan, endocitan y destruyen a los agentes patógenos

En todos los animales, ya sean vertebrados o invertebrados, el reconocimiento de los microorganismos invasores se produce con rapidez y viene acompañado por la endocitosis de es-

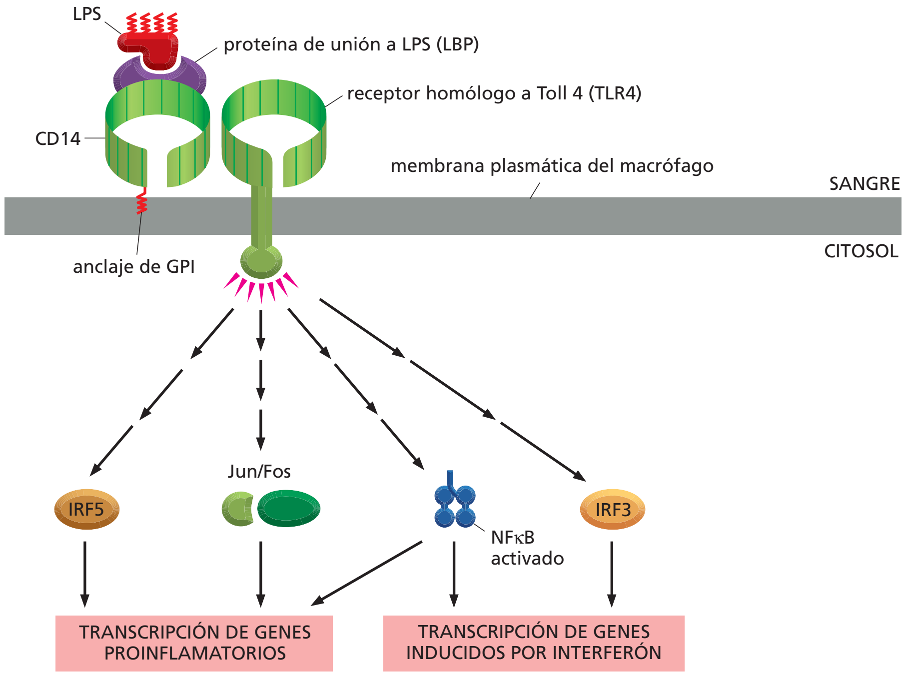


Figura 24–51 El lipopolisacárido (LPS) como activador de macrófagos. El lipopolisacárido se une a la proteína de unión a LPS (LBP), en la sangre, tras lo cual el complejo se une al receptor CD14 que está unido a la membrana del macrófago a través de GPI. El complejo ternario activa el receptor homólogo a Toll 4 (TLR4) el cual, a su vez, activa muchas vías de señalización. Como resultado de ello, al menos se activan cuatro genes que codifican proteínas reguladoras: NFkB, el complejo AP-1 formado por Jun y Fos y dos factores reguladores del interferón, IRF3 e IRF5. Esta potente y multifacética respuesta transcripcional tiene como resultado la producción de citoquinas proinflamatorias, como las quimioquinas, que reclutan varios leucocitos hacia los lugares donde tiene lugar la activación de los macrófagos, lo que es reflejo del importante peligro que percibe un macrófago cuando se encuentra con una elevada concentración de LPS.



Figura 24–52 Planta afectada por una enfermedad causada por microorganismos. Estas hojas de la planta del tomate están infectadas por el hongo *Cladosporium fulvum*. La resistencia del huésped a este tipo de infección depende del reconocimiento de una proteína fúngica por parte de receptores celulares estructuralmente semejantes a TLR. (Cortesía de Jonathan Jones.)

tos microorganismos por las células fagocitarias. Sin embargo, los vegetales carecen de este tipo de respuesta inmunitaria innata. En vertebrados, los *macrófagos* son fagocitos profesionales que residen en cualquiera de los tejidos del organismo y son especialmente abundantes en aquellas regiones en las que son más probables las infecciones, como por ejemplo los tractos respiratorio e intestinal. Un elevado número de ellos también se localiza en los tejidos conjuntivos, así como en el hígado y en el bazo. Estas longevas células rastrean los tejidos y son de las primeras en detectar la presencia de microorganismos invasores. En los vertebrados, los *neutrófilos* constituyen el segundo tipo de células fagocitarias profesionales. En contraste con los macrófagos, son células de vida corta y muy abundantes en sangre pero no en los tejidos sanos. Son rápidamente reclutados a los lugares de infección por macrófagos activados, por moléculas como péptidos que contienen metionina formilada liberadas por los propios patógenos, así como por fragmentos del sistema de complemento. Los neutrófilos pueden detectar quimioatrayentes derivados del complemento a concentraciones tan bajas como de 10^{-11} M.

Tanto los macrófagos como los neutrófilos expresan gran diversidad de receptores celulares que los capacitan para reconocer y endocitar a los patógenos. <TGTA> Entre ellos se encuentran los receptores TLR, receptores de los anticuerpos producidos por el sistema inmunitario adquirido, así como también receptores para el componente C3b del complemento. La unión a cualquiera de estos receptores estimula la polimerización de actina en el lugar donde ha quedado anclado el patógeno y facilita tanto el cerco del mismo por la membrana plasmática, como su endocitosis y la formación de un fagosoma que lo contiene (**Figura 24–53**). Aunque algunas bacterias pueden inducir a ciertas células del huésped, como las epiteliales, a que las fagociten como un mecanismo de infección celular (véase la Figura 24–25), por lo general la fagocitosis por un macrófago o por un neutrófilo conlleva la muerte del patógeno ingerido. Como se podría esperar, algunos patógenos utilizan mecanismos específicos para evitar la fagocitosis por macrófagos o neutrófilos. Una de las estrategias utilizadas es la secreción de una capa de polisacáridos denominada *cápsula*, gruesa y viscosa, la cual bloquea el acceso de los elementos del complemento a la superficie celular, constituyendo además un obstáculo para su fagocitosis. Otra estrategia utilizada, por ejemplo por *Yersinia pestis* (la bacteria causante de la plaga), es la liberación de una toxina en el interior del macrófago mediante un sistema de secreción de tipo III (véase la Figura 24–8), la cual bloquea la polimerización del citoesqueleto de actina y, por tanto, impide la fagocitosis.

Cuando un macrófago o un neutrófilo fagocitan un patógeno, se activa un impresionante arsenal de armas con el objetivo de destruirlo. La exposición de los fagocitos tanto a inmunoestimulantes asociados a microbios como a las señales químicas producidas tras la respuesta inmune frente al patógeno incrementa su capacidad fagocitaria y destructora. Esta exposición se dice que “activa” al fagocito, colocándolo en un estado de máxima alerta, en el cual no sólo se incrementa su capacidad fagocitaria y destructora de los patógenos sino que también libera citoquinas que atraerán a más leucocitos al lugar de la infección. La localización del armamento del fagocito es fácilmente observable tanto con el microscopio óptico como con el electrónico, ya que aparecen como densos compartimientos membranosos, denominados *gránulos*. Estos especializados derivados lisosomales se fusionan con los fagosomas, liberando enzimas tales como la lisozima y otras hidrolasas ácidas que degradan las

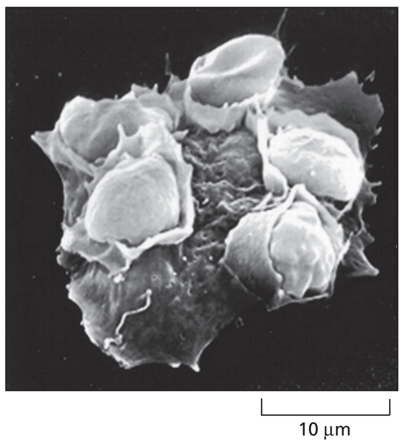


Figura 24–53 Fagocitosis. Esta micrografía obtenida con el microscopio electrónico de barrido muestra a un macrófago en pleno proceso de fagocitosis de cinco hematíes, los cuales han sido incubados previamente con un anticuerpo contra una glucoproteína de membrana. (De E.S. Gold et al., *J. Exp. Med*. 190:1849-1856, 1999. Con la autorización de Rockefeller University Press.)

paredes del patógeno y diversas proteínas. Los gránulos también contienen defensinas, los péptidos antimicrobianos que representan hasta el 15% del total de la proteína presente en los neutrófilos. Además, las células fagocitarias ensamblan en la membrana fagolisosómica *complejos de NADPH oxidasa* que catalizan la producción de compuestos muy tóxicos derivados del oxígeno, como el ion superóxido (O_2^-), el hipoclorito (HOCl, que es el componente activo de la lejía), el peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. La producción de estos compuestos tóxicos se acompaña por un aumento temporal en el consumo de oxígeno por parte de las células, fenómeno que se ha denominado *explosión respiratoria*. Sin embargo, estos compuestos derivados del oxígeno y tóxicos en un alto grado no son los únicos que dañarán al patógeno en el interior del fagolisosoma. La actividad de la NADPH oxidasa hace que sean transportados electrones hacia el interior del fagolisosoma, lo que induce un desplazamiento compensatorio de K^+ junto con el electrón; el resultado de este mecanismo es que el pH aumenta. Este elevado pH provoca la activación de un grupo de potentes proteasas neutras que habían permanecido hasta el momento inactivas en el gránulo lisosomal a causa de su bajo pH. Estas proteasas neutras destruyen con rapidez a los desafortunados patógenos atrapados en el fagolisosoma. Mientras que los macrófagos sobreviven a este auténtico frenesí aniquilador y viven para continuar destruyendo patógenos, por lo general los neutrófilos acaban muriendo.

Los neutrófilos muertos o moribundos son un componente mayoritario del pus que se forma en las heridas infectadas. El característico matiz que tiene el pus es debido a la abundancia de la mieloperoxidasa en los neutrófilos, una enzima que contiene cobre y que es un elemento activo durante el proceso de explosión respiratoria.

Si el patógeno es demasiado grande para poder ser fagocitado de forma eficiente (como por ejemplo un nematodo), varios grupos de macrófagos, neutrófilos o eosinófilos (descrito en Capítulo 23) se acumularán en torno al invasor. Estas células exocitan sus defensinas y otros productos bactericidas contenidos en sus gránulos, así como los productos tóxicos originados por la explosión respiratoria (**Figura 24–54**). En general, esta descarga es suficiente para destruir el patógeno. En algunos casos, se ha observado que los neutrófilos eyectan parte de su cromatina junto con el contenido de sus gránulos. El DNA eyectado, junto con sus histonas asociadas, forman una red pegajosa que atrapa las bacterias que se encuentran en las proximidades y evita que escapen (**Figura 24–55**). Dado que su única función consiste en sacrificarse para eliminar a los patógenos invasores, el neutrófilo no vacila en utilizar cualquier herramienta que tenga a su alcance, incluyendo su propio DNA, para cumplir con su objetivo.

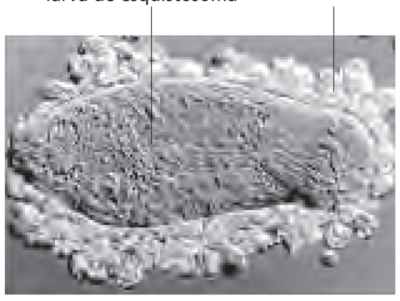


Figura 24–54 Eosinófilos atacando una larva de esquistosoma. Los macrófagos no pueden fagocitar los parásitos de gran tamaño, como la larva de esquistosoma mostrada. Sin embargo, cuando la larva es opsonizada por anticuerpos o por el sistema del complemento, los eosinófilos (y otros leucocitos) pueden reconocerlos y atacarlos colectivamente mediante la secreción de moléculas tóxicas. (Cortesía de Anthony Butterworth.)

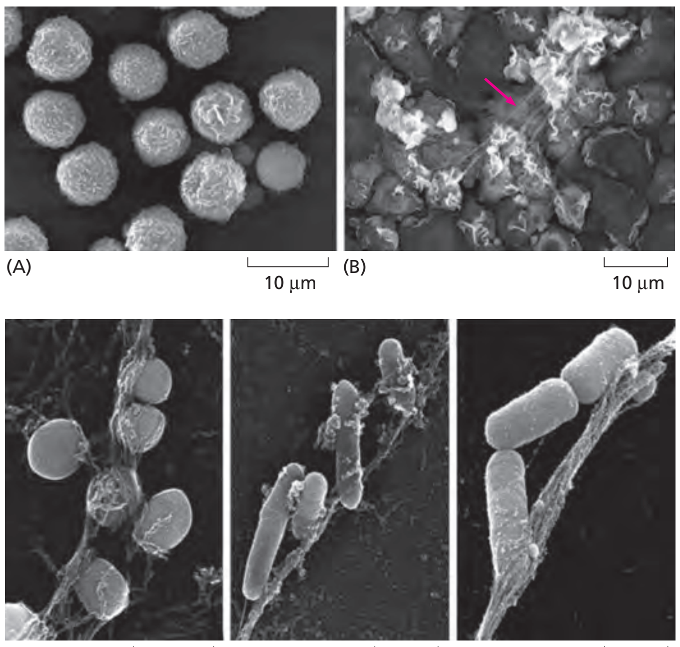


Figura 24–55 Los neutrófilos eyectan su cromatina para atrapar bacterias formando una red pegajosa. (A) Electromicrografía obtenida mediante microscopía electrónica de barrido mostrando neutrófilos en reposo. (B) Una vez que se activan, los neutrófilos presentan numerosas ondulaciones y permanecen asociados mediante estructuras fibrosas (*flecha*). Las fibras contienen DNA e histonas y aparentemente se trata de cromatina del núcleo de neutrófilos que ha sido eyectada durante su activación. (C) La cromatina, pegajosa, puede atrapar diferentes tipos de bacterias, como (de izquierda a derecha) *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* y *Shigella flexneri*. (De V. Brinkmann et al., *Science* 303:1532-1535, 2004. Con la autorización de AAAS.)

Los macrófagos activados participan en la respuesta inflamatoria en los lugares de infección

Cuando un patógeno invade un tejido, casi siempre desencadena una **respuesta inflamatoria**. Las variaciones de los vasos sanguíneos locales generan una respuesta caracterizada por dolor, enrojecimiento, calor e hinchazón que se producen en el lugar de la infección (los médicos reconocieron hace miles años estos cuatro signos de la inflamación, que en latín se denominan *dolor*, *rubor*, *calor* y *turgor*). Los vasos se dilatan y se vuelven más permeables a fluidos y a proteínas, produciendo una hinchazón local donde se acumulan proteínas plasmáticas que colaboran en la defensa, incluidas las del sistema de complemento. Paralelamente, las células endoteliales de esos vasos sanguíneos son inducidas a expresar moléculas de adhesión (descritas en el Capítulo 19) que facilitarán la adhesión y extravasación de los leucocitos, inicialmente neutrófilos, seguidos a continuación por linfocitos y monocitos (los precursores sanguíneos de los macrófagos). <CCCC>

Por lo general, los neutrófilos mueren en el lugar donde se produce la inflamación, pero a menudo los macrófagos sobreviven a este encuentro inicial con los patógenos invasores y migran a otras regiones del organismo. A consecuencia de esta capacidad, los patógenos que pueden sobrevivir dentro del macrófago, como por ejemplo el serotipo *Typhi* de *Salmonella enterica*, pueden utilizar los macrófagos como un sistema de transporte para diseminar una infección local hasta lugares distantes del organismo, convirtiendo una infección intestinal local, poco relevante, en fiebre tifoidea, una grave enfermedad sistémica.

Diversas moléculas de señalización median la respuesta inflamatoria en el lugar de la infección. Así, la activación de los TLR se traduce en la expresión de señales de naturaleza lipídica, como las prostaglandinas, y proteica (o peptídica) como las citoquinas (descritas en el Capítulo 15). Estas señales, junto con los fragmentos de los componentes del complemento producidos durante su activación, contribuyen al desarrollo de la respuesta inflamatoria. Un grupo de las citoquinas producidas por los macrófagos activados tienen propiedades quimiotácticas (denominadas *quimioquinas*). Algunas de ellas atraen neutrófilos, que son las primeras células en ser reclutadas en número apreciable en el lugar de una nueva infección. Otras citoquinas producen *fiebre*, un aumento de la temperatura del organismo. La fiebre colabora en la lucha contra la infección, ya que la mayoría de patógenos bacterianos y víricos crecen mejor a temperaturas bajas, mientras que las respuestas inmunitarias adquiridas son más eficaces a temperaturas elevadas. Además, algunas moléculas proinflamatorias estimulan la expresión de proteínas endoteliales que desencadenan la coagulación en los pequeños vasos locales. Esta respuesta, al ocluir los vasos e impedir el riego sanguíneo, dificulta la entrada en la sangre del patógeno y la diseminación de la infección a otras partes del organismo.

Sin embargo, estas respuestas inflamatorias tan efectivas en el control de las infecciones locales pueden tener consecuencias desastrosas cuando se desarrollan en contra de una infección diseminada por el torrente sanguíneo, una condición denominada *sepsis*. La liberación sistémica a la sangre de moléculas proinflamatorias causa la dilatación de los vasos sanguíneos y la pérdida de volumen plasmático que, en conjunto, producen una importante disminución de la presión sanguínea, condición conocida como *choque*, además de inducir una coagulación sanguínea diseminada. El resultado final, denominado *choque séptico*, a menudo es fatal. Además, las respuestas inflamatorias inadecuadas o excesivamente intensas se asocian con algunos cuadros crónicos, como es el caso del *asma* (**Figura 24–56**) y la artritis.

De manera semejante a lo que ocurría con la fagocitosis, algunos patógenos han desarrollado mecanismos que previenen la respuesta inflamatoria o, incluso en algunos casos, se aprovechan de ella como medio para diseminar la infección. Así, por ejemplo, numerosos virus codifican potentes antagonistas de citoquinas que bloquean algunos de los mecanismos que intervienen en la respuesta inflamatoria. Algunos de estos antagonistas son simplemente formas modificadas de los receptores de citoquinas, los cuales son codificados por genes del propio huésped que han sido adquiridos por el virus. Estos receptores se unen con alta afinidad a las citoquinas y bloquean, en consecuencia, su actividad. Algunas bacterias, como *Salmonella,* inducen en el punto del intestino donde se inició la infección una respuesta inflamatoria que provoca el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos, a los que luego invaden y utilizan como medio de transporte. De este modo, las bacterias pueden desplazarse a otros tejidos del organismo.

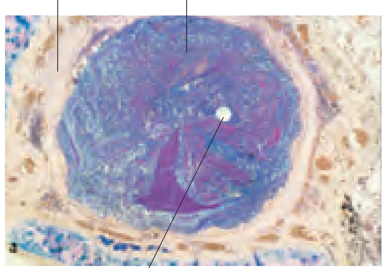


Figura 24–56 Inflamación de las vías aéreas como consecuencia de un proceso de asma grave. Micrografía obtenida por microscopía óptica correspondiente a una sección bronquial de un paciente que murió como consecuencia de un prolongado y grave ataque de asma. Se observa una obstrucción prácticamente total de la vía a causa de un tapón de moco. Este moco está constituido por un denso infiltrado inflamatorio que incluye eosinófilos, neutrófilos y linfocitos. (Cortesía de Thomas Krausz.)

Las células infectadas por virus toman medidas drásticas para prevenir la replicación vírica

Los inmunoestimulantes asociados a microorganismos expresados en la superficie de las bacterias y de los parásitos, que resultan tan importantes en la inducción de las respuestas inmunitarias innatas habitualmente, no se encuentran en la superficie de los virus. Las proteínas víricas son traducidas por los ribosomas del huésped y las envueltas de los virus están formadas por los lípidos del huésped. La única manera en que un huésped puede detectar la presencia de un virus es el reconocimiento de los elementos poco habituales que presenta el genoma vírico, como el RNA de doble cadena (dsRNA: ***d**ouble-**s**tranded* ***RNA***), que actúa como intermediario en el ciclo vital de muchos de ellos. Frecuentemente los genomas víricos de DNA contienen cantidades significativas del dinucleótido CpG, que puede ser reconocido por el receptor semejante a Toll TLR9, tal como se explicó anteriormente.

Las células de mamífero están particularmente adaptadas para detectar la presencia de dsRNA y pueden iniciar un programa de respuestas intracelulares para eliminarlo. Este programa se realiza en dos etapas. En primer lugar, las células degradan el dsRNA en pequeños fragmentos (de longitudes de entre 21 a 25 parejas de nucleótidos) utilizando la enzima *Dicer*. Estos fragmentos de doble cadena se unen a cadenas sencillas de RNA (ssRNA: ***s**ingle-**s**tranded* ***RNA***) presentes en la célula huésped que tengan la misma secuencia que cualquiera de las dos hebras del fragmento de dsRNA, lo que conduce a la destrucción del ssRNA. Esta destrucción del ssRNA dirigida por dsRNA constituye la base de la técnica conocida como *interferencia de RNA* (*RNAi*), utilizada por los investigadores para destruir mRNA específicos y bloquear, así, la expresión de genes concretos (descrita en Capítulo 8). En segundo lugar, el dsRNA induce a la célula huésped a expresar y secretar dos citoquinas –el **interferón** α **(IFN-**α**)** y el **interferón** β **(IFN-**β**)**–, que actúan tanto de forma autocrina sobre la célula infectada, como de forma paracrina sobre sus vecinas no infectadas. La unión de los interferones a sus receptores de la superficie celular estimula, a través de la vía Jak/STAT, el proceso de transcripción de determinados genes (véase la Figura 15–68) y, en consecuencia, la síntesis de más de 300 productos génicos, entre los que se encuentran un gran número de citoquinas, fiel reflejo de la complejidad de la respuesta aguda de la célula frente a una infección vírica.

Parece que la respuesta mediada por el interferón constituye una reacción general de las células de mamífero frente a una infección vírica, pudiendo desencadenarla otros componentes aparte de los dsRNA. Además de los efectos sobre la transcripción génica de la célula huésped, los interferones activan una ribonucleasa latente que degrada inespecíficamente ssRNA. También activan, de manera indirecta, una proteína quinasa que fosforila, inactivándolo, al factor de iniciación eIF-2; el resultado es el bloqueo de la mayor parte de la síntesis proteica en la célula huésped que se encuentra inmersa en su propia defensa. Aparentemente, al destruir la mayor parte de su RNA y detener su síntesis proteica, la célula huésped inhibe la replicación vírica sin autodestruirse. Si estas medidas llegan a fallar, la célula llega a inducir su propia muerte por apoptosis, evitando la replicación vírica, aunque a menudo es ayudada por la intervención de un linfocito citotóxico, tal como se tratará más adelante y también en el Capítulo 25.

Por otra parte, las células de los mamíferos presentan un mecanismo especial para enfrentarse a los retrovirus. En efecto, estos virus activan una familia de proteínas denominada APOBEC (denominadas así porque también son miembros del complejo editor que modifica el mRNA de la proteína ApoB, principal componente de las lipoproteínas de baja densidad, LDL). Estas enzimas desaminan citosinas en los cDNA retrovirales nacientes, convirtiéndolas en uridinas, lo que genera un gran número de mutaciones en el genoma vírico y ello conduce, a la finalización de la replicación vírica.

No resulta sorprendente que muchos virus hayan adquirido mecanismos para desbaratar o evitar estos procesos defensivos intracelulares. Así, el virus de la gripe codifica una proteína que bloquea el reconocimiento del dsRNA por Dicer. Por otra parte, el virus HIV codifica una proteína que media la ubiquitinización de las proteínas APOBEC y su degradación en el proteosoma. Además, numerosos virus, incluyendo la mayoría de los que son causantes de enfermedades en los huéspedes sanos, utilizan diversos mecanismos para bloquear la activación de la vía del interferón. Incluso algunos virus pueden inhibir la apoptosis de la célula huésped, lo cual tiene efectos colaterales ya que favorece el desarrollo de cáncer, siendo éste el mecanismo por el que en ocasiones, el virus de Epstein-Barr causa el linfoma de Burkitt.

Las células citotóxicas naturales (NK) inducen la autodestrucción de las células infectadas por virus

Los interferones disponen de otra vías para bloquear la replicación vírica, aunque menos directa. Una de ellas es el incremento de la actividad de las **células citotóxicas naturales** (**células NK**: ***n****atural* ***k****iller*), las cuales pertenecen al sistema inmunitario innato. De manera semejante a los linfocitos T citotóxicos del sistema inmunitario adquirido (descrito en el Capítulo 25), las células NK destruyen las células infectadas por virus induciéndolas a autodestruirse mediante apoptosis. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales los linfocitos T citotóxicos y las células NK distinguen entre las células infectadas por virus de aquellas que no lo están son diferentes.

Tanto los linfocitos T citotóxicos como las células NK detectan las células infectadas por virus reconociendo la misma clase de proteínas de la membrana. Estas proteínas son denominadas **proteínas MHC de clase I**, <AAGT> ya que están codificadas por genes que se encuentran en el complejo principal de histocompatibilidad, que expresan casi todos los vertebrados tal como analizaremos en detalle en el Capítulo 25. Así, los linfocitos T citotóxicos reconocen fragmentos peptídicos de proteínas víricas unidos a esas proteínas MHC expresadas en la superficie de las células infectadas. Por el contrario, las células NK detectan los niveles de proteínas MHC de clase I en la membrana de cualquiera de las células de los vertebrados. Niveles elevados de estas proteínas inhiben la actividad citotóxica de las células NK, de manera que sólo inducen la destrucción selectiva de las células con bajo nivel de expresión, las cuales coinciden con las infectadas por virus, además de algunas células tumorales (**Figura 24–57**).

La razón por la que los niveles de proteínas MHC de clase I son bajos en las células infectadas por virus es que muchos virus han desarrollado mecanismos que inhiben la expresión de estas proteínas en la superficie de las células que infectan y evitan su detección por los linfocitos T citotóxicos. Por ejemplo, los adenovirus y el HIV codifican proteínas que bloquean la transcripción de los genes que codifican las moléculas MHC de clase I. Por su parte, el virus *Herpes simplex* y los citomegalovirus bloquean los translocadores de la membrana del ER encargados del transporte, desde el citoplasma hasta la luz del ER, de los fragmentos peptídicos resultantes de la actividad proteosómica sobre proteínas víricas y de la propia célula. Tales péptidos son requeridos por las proteínas MHC de clase I para ensamblarse en la membrana del ER y ser transportadas, como complejos péptido-MHC, hasta la membrana plasmática a través del complejo de Golgi (véase la Figura 25–59). Los citomegalovirus provocan la retrotranslocación de las moléculas MHC de clase I desde la membrana del ER hasta el citoplasma, donde serán degradadas rápidamente por los proteosomas. Aún más, las proteínas codificadas por otros virus bloquean el transporte desde el ER hasta el complejo de Golgi de las moléculas MHC de clase I, una vez se han ensamblado con los péptidos o, incluso, desde el complejo de Golgi hasta la membrana plasmática.

Sin embargo, al evitar ser detectados por los linfocitos T citotóxicos, los virus desencadenan la respuesta de las células NK. La producción local de IFN-β estimula la actividad citotóxica de las células NK e incrementa la expresión de las proteínas MHC de clase I en las células no infectadas. De esta forma, las células infectadas por virus que bloquean la expresión de MHC de clase I son diferentes y acaban siendo víctimas de las células NK activadas. Por tanto, a los virus les resulta difícil pasar desapercibidos de manera simultánea para los linfocitos T citotóxicos y para las células NK. Sin embargo, de manera sorprendente algunos grandes virus de DNA, incluyendo el citomegalovirus, codifican proteínas semejantes a las MHC que son expresadas en la superficie de las células huésped que infectan. De manera semejante a las auténticas proteínas MHC de clase I, estas MHC víricas, al mimetizar a las auténticas, activan en las células NK receptores con una actividad inhibidora, bloqueando, así, la actividad destructora de estas células NK.

Tanto las células NK como los linfocitos T citotóxicos destruyen las células diana infectadas al inducirles la apoptosis antes de que los virus tengan oportunidad de replicarse. Por lo tanto, no es sorprendente que numerosos virus hayan desarrollado mecanismos para inhibir la apoptosis, especialmente en los primeros momentos de la infección. Tal como se describió en el Capítulo 18, la apoptosis depende de una cascada proteolítica intracelular. Esta cascada puede ser desencadenada por la célula citotóxica por la activación de un receptor de membrana o inyectando una enzima proteolítica en el interior de la célula (véase la Figura 24–47). Existen proteínas víricas que pueden interferir con cualquiera de las etapas de esas vías.

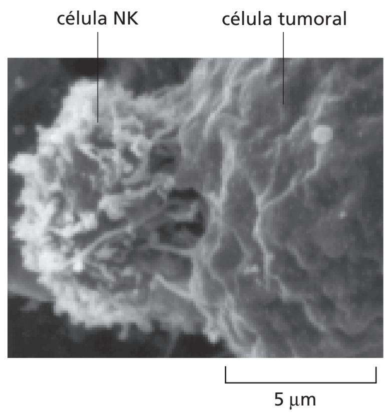


Figura 24–57 Célula citotóxica natural (NK) atacando a una célula tumoral. La célula NK es la más pequeña de las dos y se encuentra a la *izquierda*. La electromicrografía obtenida con el microscopio electrónico de barrido está tomada poco después de la adhesión de la célula NK, pero antes de inducir la autodestrucción de la célula tumoral. (Cortesía de J.C. Hiserodt, en Mechanisms of Cytotoxicity by Natural Killer Cells [R.B. Herberman y D. Callewaert, eds.]. New York: Academic Press, 1995.)

Las células dendríticas constituyen la conexión entre los sistemas inmunitarios innato y adquirido

Las **células dendríticas** son células muy importantes en el sistema inmunitario innato y están ampliamente distribuidas en los tejidos y en los órganos de los vertebrados. Expresan una gran variedad de receptores reconocedores de patrón, entre las que se incluyen las proteínas TLR y NOD, que les permiten reconocer y fagocitar patógenos invasores, siendo activadas por este proceso. Las células dendríticas degradan las proteínas de los patógenos en fragmentos peptídicos y son transportados hasta la superficie celular tras su unión a las proteínas MHC. A continuación, las células dendríticas activadas transportan estos péptidos de patógenos, formando un complejo con las proteínas MHC, hasta algún órgano linfoide próximo donde activarán linfocitos T del sistema inmunitario adquirido, de manera que luchan de manera conjunta contra el invasor específico. Las células dendríticas, junto con estos complejos de proteínas MHC y péptidos microbianos, portan en su superficie un tipo especial de proteínas coestimuladoras que colaboran en el proceso de activación de los linfocitos T. Las células dendríticas activadas también secretan diversas citoquinas que afectan el tipo de respuesta que producirán los linfocitos T; este mecanismo asegura que es la apropiada para un determinado patógeno. De esta manera las células dendríticas actúan como eslabones esenciales entre el sistema inmunitario innato, el cual constituye una primera línea de defensa contra los patógenos invasores, y el sistema inmunitario adquirido, el cual proporciona mecanismos de respuesta más lentos, pero mucho más potentes y altamente específicos.

La batalla entre patógenos y defensas de los huéspedes está en gran medida equilibrada. El hombre parece disponer de una ligera ventaja mediante el uso de medidas sanitarias, vacunas y fármacos que apoyan el esfuerzo de nuestros sistemas inmunitarios innato y adquirido. Sin embargo, en la actualidad las enfermedades infecciosas todavía son la principal causa de muerte en el mundo, en el que surgen nuevas epidemias como la del sida. La rápida evolución de los patógenos y la casi infinita variedad de mecanismos mediante los que invaden el organismo y eluden las respuestas inmunitarias deben prevenirnos de creer que podemos ganar la batalla definitivamente.

En el próximo capítulo, se tratarán las estrategias, extraordinarias y únicas, que nuestro sistema inmunitario adquirido ha desarrollado para defendernos de contrincantes tan hábiles. De forma sorprendente este sistema inmunitario puede organizar respuestas específicas de patógeno, contra patógenos que nunca han existido.

Resumen

Las barreras físicas que previenen la infección, las respuestas intrínsecas celulares contra la infección y las respuestas inmunitarias innatas constituyen líneas anticipadas de defensa contra los agentes patógenos que nos invaden. Todos los organismos pluricelulares poseen estas defensas. En los vertebrados, las respuestas inmunitarias innatas también pueden inducir respuestas inmunitarias adquiridas de carácter específico y, además, mucho más potentes. Las respuestas inmunitarias innatas se basan en la capacidad del organismo para reconocer características que se han conservado en las moléculas de microorganismos, pero que no son producidos por los huéspedes sanos. Estos inmunoestimulantes asociados a microorganismos comprenden numerosas moléculas de la superficie de los patógenos, así como el RNA de doble cadena de algunos virus. Muchas de estas moléculas de los microorganismos son reconocidas por receptores reconocedores de patrón, entre los que se encuentran los receptores homólogos a Toll (TLR), presentes tanto en plantas como en animales. En estos últimos, las moléculas de la superficie de los microorganismos también activan el sistema del complemento, un grupo de proteínas sanguíneas que son activadas secuencialmente para marcar los microorganismos y ser fagocitados por macrófagos y neutrófilos, desorganizando la membrana del microorganismo y produciendo una respuesta inflamatoria. Los fagocitos utilizan una combinación de enzimas hidrolíticas, péptidos antimicrobianos y especies reactivas de oxígeno para destruir los microorganismos invasores, secretando, además, moléculas que desencadenan una respuesta inflamatoria. Las células infectadas por virus producen interferones, los cuales inducen una serie de respuestas celulares que inhiben la replicación vírica y activan la capacidad destructora de las células NK y los linfocitos T citotóxicos. Las células dendríticas del sistema inmunitario innato endocitan microorganismos en el lugar de la infección, transportándolos a ellos y a sus productos hasta los ganglios linfáticos, donde activan a los linfocitos T del sistema inmunitario adquirido con objeto de producir respuestas específicas en contra de los microorganismos

BIBLIOGRAFÍA

General

Cossart P, Boquet P & Normark S (eds) (2005) Cellular Microbiology, 2.ª ed. Washington: ASM Press.

Flint SJ, Enquist LW et al (2003) Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses, 2.ª ed. Washington: ASM Press.

Murphy KM et al (2008) Janeway's Immunobiology, 7.ª ed. New York: Garland Science.

Salyers A & Whitt DD (2001) Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach, 2.ª ed. Washington: ASM Press.

Schaechter M (ed) (1998) Mechanisms of Microbial Disease, 3.ª ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins.

Introducción a los agentes patógenos

Baltimore D (1971) Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev* 35:235–241.

Bozdech Z, Llinas M, Pulliam BL et al (2003) The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol* 1:E5.

Brown NF, Wickham ME, Coombes BK & Finlay BB (2006) Crossing the line: selection and evolution of virulence traits. *PLoS Pathog* 2:e42.

Crick FHC & Watson JD (1956) Structure of small viruses. *Nature* 177374–475.

Gal-Mor O & Finlay BB (2006) Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol* 8:1707–1719.

Galan JE & Wolf-Watz H (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* 444:567–573.

Hacker J & Kaper JB (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 54:641–679.

Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC et al (2000) DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406:477–483.

Lorber B (1996) Are all diseases infectious? *Annu Intern Med* 125:844–851.

Poulin R & Morand S (2000) The diversity of parasites. *Q Rev Biol* 75:277–293.

Prusiner SB (1996) Molecular biology and genetics of prion diseases. *Cold Spring Harb. Symp Quant Biol* 61:473–493.

Rappleye CA & Goldman WE (2006) Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu Rev Microbiol* 60:281–303

Rixon FJ (1990) Structure and assembly of herpesviruses. *Semin Virol* 1:477–487.

Stebbins CE & Galan JE (2001) Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature* 412:701–705.

Biología celular de la infección

Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM & Domingo E (2001) Evolution of cell recognition by viruses. *Science* 292:1102–1105.

Berger EA, Murphy PM & Farber JM (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17:657–700.

Cossart P & Sansonetti PJ (2004) Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* 304:242–248.

Deitsch KW, Moxon ER & Wellems TE (1997) Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:281–293.

Garoff H, Hewson R & Opstelten DJ (1998) Virus maturation by budding. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1171–1190.

Ghedin E, Sengamalay NA, Shumway M et al (2005) Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature* 437:1162–1166.

Goldberg MB (2001) Actin-Based Motility of Intracellular Microbial Pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:595–626.

Hackstadt T (2000) Redirection of host vesicle trafficking pathways by intracellular parasites. *Traffic* 1:93–99.

Jones NC (1990) Transformation by the human adenoviruses. *Semin Cancer Biol* 1:425–435.

Kaariainen L & Ranki M (1984) Inhibition of cell functions by RNA-virus infections. *Annu Rev Microbiol* 38:91–109.

Keeling PJ & Fast NM (2002) Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu Rev Microbiol* 56:93–116.

Kenny B, DeVinney R, Stein M et al (1997) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91:511–520.

Knodler LA, Celli J & Finlay BB (2001) Pathogenic trickery: deception of host cell processes. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2:578–88.

Lyles DS (2000) Cytopathogenesis and inhibition of host gene expression by RNA viruses. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:709–724.

Mullins JI & Jensen MA (2006) Evolutionary dynamics of HIV-1 and the control of AIDS. *Curr Top Microbiol Immunol* 299:171–192.

Overbaugh J & Bangham CR (2001) Selection forces and constraints on retroviral sequence variation. *Science* 292:1106–1109.

Parrish CR & Kawaoka Y (2005) The origins of new pandemic viruses: the acquisition of new host ranges by canine parvovirus and influenza A viruses. *Annu Rev Microbiol* 59:553–586.

Pizarro-Cerda J & Cossart P (2006) Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124:715–727.

Poranen MM, Daugelavicius R & Bamford DH (2002) Common principles in viral entry. *Annu Rev Microbiol* 56:521–538.

Sibley LD & Andrews NW (2000) Cell invasion by un-palatable parasites. *Traffic* 1:100–106.

Skehel JJ & Wiley DC (2000) Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69:531–569.

Sodeik B (2000) Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends Microbiol* 8:465–472.

Stephens EB & Compans RW (1988) Assembly of animal viruses at cellular membranes. *Annu Rev Microbiol* 42:489–516.

Tilney LG & Portnoy DA (1989) Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 109:1597–1608.

Walsh C (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406:775–781.

Wright GD (2007) The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Rev Microbiol* 5:175–186

El sistema inmunitario innato y las barreras frente a la infección

Aderem A & Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17:593–623.

Banchereau J, Briere F, Caux C et al (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767–811.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C et al (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532–1535.

Ganz T & Lehrer RI (1998) Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol* 10:41–44.

Girardin SE, Sansonetti PJ & Philpott DJ (2002) Intracellular vs extracellular recognition of pathogens—common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol* 10:193–199.

Guidotti LG & Chisari FV (2001) Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 19:65–91.

Hedrick SM (2004) The acquired immune system: a vantage from beneath. *Immunity* 21:607–615.

Janeway CA Jr & Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197–216.

Kimbrell DA & Beutler B (2001) The evolution and genetics of innate immunity. *Nature Rev Genet* 2:256–267.

Kopp E & Medzhitov R (2003) Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15:396–401

Muller-Eberhard HJ (1988) Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem* 57:321–347.

Murphy PM (2001) Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry. *Nature Immunol* 2:116–122.

Ploegh HL (1998) Viral strategies of immune evasion. *Science* 280:248–253.

Segal AW (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 23:197–223.

Super M & Ezekowitz RA (1992) The role of mannose-binding proteins in host defense. *Infect Agents Dis* 1:194–199.

Tomlinson S (1993) Complement defense mechanisms. *Curr Opin Immunol* 5:83–89.

Yang RB, Mark MR, Gray A et al (1998) Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 395:284–288.

Yang D, Biragyn A, Kwak LW & Oppenheim JJ (2002) Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol* 23:291–296.

Yokoyama WM, Kim S & French AR (2004) The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 22:405–429

Capítulo 25

El sistema de inmunidad adquirida

25

En este capítulo

LINFOCITOS Y BASES CELULARES DE LA INMUNIDAD ADQUIRIDA 1540

LINFOCITOS B Y ANTICUERPOS 1551

GENERACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE LOS ANTICUERPOS 1562

LINFOCITOS T Y PROTEÍNAS MHC 1570

LINFOCITOS T COLABORADORES Y ACTIVACIÓN LINFOCITARIA 1590

El **sistema inmunitario adquirido** nos salva de una muerte segura tras una infección. Un recién nacido con graves deficiencias en el sistema inmunitario adquirido morirá de forma prematura si no es aislado de agentes infecciosos como bacterias, hongos y parásitos. De hecho, todos los organismos pluricelulares tienen que defenderse de infecciones causadas por estos organismos, denominados genéricamente **patógenos**. Los invertebrados utilizan estrategias defensivas relativamente sencillas basadas en barreras de protección, moléculas tóxicas y células fagocitarias que ingieren y destruyen microorganismos y grandes parásitos (como los helmintos). Los vertebrados también dependen de estas **respuestas inmunitarias innatas** en una primera línea de defensa (se ha tratado en el Capítulo 24), pero pueden organizar estrategias mucho más sofisticadas denominadas **respuestas inmunitarias adquiridas**. En los vertebrados, las respuestas innatas inducen respuestas adquiridas que colaboran con las primeras en la eliminación de los patógenos (**Figura 25–1**).

Mientras que las respuestas innatas son reacciones de defensa generales, las adquiridas son específicas contra el patógeno que las induce y proporcionan una protección prolongada. Así, por ejemplo y gracias al sistema inmunitario adquirido, un individuo que supere el sarampión quedará protegido de por vida de dicha enfermedad, pero no así de otros virus, como los causantes de parotiditis o varicela. Este capítulo se centrará, fundamentalmente, en las respuestas inmunitarias adquiridas y, si no se indica lo contrario, nos referiremos a ellas con el término “respuesta inmunitaria”.

La función de las respuestas inmunitarias adquiridas es la eliminación de los microorganismos y de las moléculas tóxicas producidas por ellos. Estas reacciones inmunitarias son destructivas, por lo que es importante que sólo se produzcan contra moléculas ajenas al huésped y no contra las propias del huésped. La habilidad de distinguir lo *extraño* de lo *propio* es una característica del sistema inmunitario adquirido. En ocasiones, el sistema no realiza bien esta diferenciación y reacciona de forma destructiva contra las moléculas propias causando *enfermedades autoinmunitarias*, que pueden resultar mortales.

Por supuesto, muchas de las moléculas extrañas que entran en el organismo son inocuas y sería innecesario, y potencialmente peligroso, organizar respuestas inmunitarias adquiridas en su contra. Condiciones patológicas como la rinitis alérgica o el asma son ejemplos de respuestas inmunitarias adquiridas nocivas contra moléculas extrañas en apariencia inocuas. Por lo general este tipo de respuesta inadecuada no llega a producirse, ya que el sistema inmunitario innato tan sólo recluta al sistema inmunitario adquirido si reconoce patrones conservados de moléculas características de patógenos. Además, el sistema inmunitario innato distingue entre diferentes clases de patógenos y organiza la forma de respuesta inmunitaria adquirida más adecuada para eliminarlos.

Cualquier molécula capaz de inducir una respuesta inmunitaria adquirida se denomina **antígeno** (*gen*erador de *anti*cuerpos). Gran parte del conocimiento actual sobre este tipo de respuesta deriva de estudios en los que se induce al sistema inmunitario adquirido de animales de laboratorio (habitualmente ratones) para que responda frente a moléculas extrañas inocuas, como por ejemplo una determinada proteína. Esta estrategia implica la inyección de la molécula inocua junto con sustancias inmunoestimulantes (de origen sobre todo microbiano) denominadas *adyuvantes* que activarán el sistema inmunitario innato. Este proceso se denomina **inmunización**. Casi cualquier macromolécula ajena al organismo receptor que sea administrada de este modo inducirá una respuesta inmunitaria adquirida específica de dicha macromolécula. Es destacable el hecho que el sistema inmunitario adquirido sea capaz de distinguir entre antígenos que son muy similares, como dos proteínas que difieren en un solo aminoácido o dos isómeros ópticos de la misma molécula. El sistema inmunitario adquirido reconoce detalles moleculares precisos en las macromoléculas.

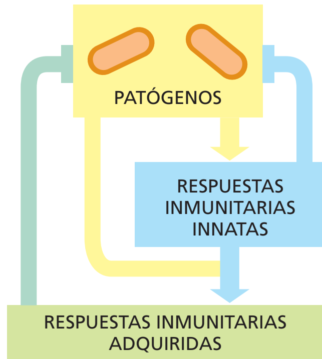


Figura 25–1 Respuestas inmunitarias innatas y adquiridas. Las respuestas inmunitarias innatas son activadas directamente por los patógenos y defienden a todos los organismos pluricelulares de las infecciones. En los vertebrados, los patógenos, junto con las respuestas inmunitarias de tipo innato que ellos mismos activan, estimulan las respuestas inmunitarias adquiridas, que junto con las respuestas inmunitarias innatas, colaboran en la lucha contra las infecciones.

Las células que llevan a cabo las respuestas inmunitarias adquiridas son un tipo de leucocitos denominados **linfocitos**. Estas respuestas se engloban en dos grandes grupos: *respuestas mediadas por anticuerpos (respuesta humoral)* y *respuestas mediadas por linfocitos T (respuesta celular)*, y las realizan diferentes clases de linfocitos llamados linfocitos B y linfocitos T, respectivamente.

En las **respuestas humorales**, los linfocitos B son activados a secretar anticuerpos, que son proteínas denominadas *inmunoglobulinas*. Los anticuerpos circulan por la sangre y penetran en otros fluidos corporales donde se unen de modo específico al antígeno extraño que ha estimulado su producción (**Figura 25–2**). La unión del anticuerpo inactiva virus y toxinas microbianas (como la toxina tetánica o la toxina diftérica), ya que bloquea su capacidad de unión a receptores de las células huésped. La unión del anticuerpo también determina la destrucción de los patógenos, fundamentalmente facilitando su ingestión por parte de las células fagocitarias del sistema inmunitario innato.

En las **respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T**, el segundo tipo de respuesta inmunitaria adquirida, los linfocitos T activados reaccionan de forma directa contra un antígeno extraño que les presenta en su superficie una célula huésped, por lo cual se denomina *célula presentadora de antígeno*. Los linfocitos T pueden detectar microorganismos escondidos en el interior de células huésped y eliminar dichas células o colaborar a que las células infectadas u otras eliminen los microorganismos. Por ejemplo, un linfocito T destruirá una célula huésped infectada por un virus que en su superficie presente antígenos virales, eliminando al virus antes de que pueda replicarse (véase Figura 25–2). En otros casos, los linfocitos T producen moléculas señal que activan macrófagos que destruyen microorganismos que previamente han fagocitado o colaboran en la activación de los linfocitos B que producen anticuerpos contra los microbios.

Comenzaremos el capítulo comentando las propiedades generales de los linfocitos. A continuación se tratarán las características funcionales y estructurales de los anticuerpos que los capacitan para reconocer y neutralizar microorganismos extracelulares y las toxinas producidas por éstos. Describiremos después cómo los linfocitos B producen un número casi ilimitado de moléculas de anticuerpo diferentes. Por último, se considerarán diferentes aspectos de los linfocitos T y de las respuestas inmunitarias mediadas por estas células.

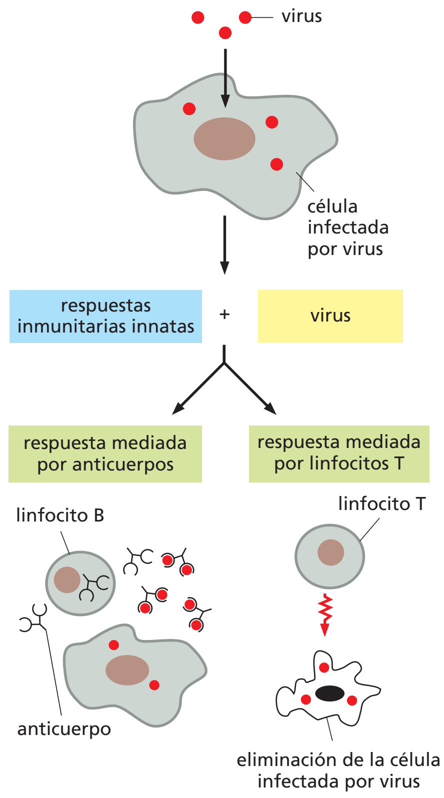


Figura 25–2 Las dos principales clases de respuestas inmunitarias adquiridas. Los linfocitos son las células que llevan a cabo estas respuestas. El esquema muestra la respuesta de los linfocitos frente a una infección vírica. En uno de los tipos de respuesta adquirida, los linfocitos B secretan anticuerpos neutralizantes de los virus. En el otro tipo, la respuesta mediada por linfocitos T, los linfocitos T eliminan las células infectadas por los virus. En ambos casos, las respuestas inmunitarias innatas colaboran en la activación de las respuestas inmunitarias adquiridas a través de vías aquí no indicadas.

LINFOCITOS Y BASES CELULARES DE LA INMUNIDAD ADQUIRIDA

Los linfocitos son los responsables de la elevada especificidad que presentan las respuestas inmunitarias adquiridas. Se encuentran en gran cantidad en la sangre y en la linfa (fluido incoloro que ocupa los vasos linfáticos que conectan los ganglios linfáticos entre sí y con la circulación sanguínea). También se hallan concentrados en los **órganos linfoides** como el timo, los ganglios linfáticos, el bazo o el apéndice (**Figura 25–3**). En este apartado se describirán las propiedades generales que son comunes a los linfocitos B y T.

Los linfocitos son necesarios para la inmunidad adquirida

En el cuerpo humano hay alrededor de 2×10^{12} linfocitos, lo que equivale a una masa comparable a la del hígado o el cerebro. A pesar de su abundancia, el papel clave de estas células en la inmunidad adquirida no se demostró hasta finales de la década de 1950. Se llevaron a cabo experimentos en ratones y en ratas que fueron intensamente irradiados para eliminar la mayoría de sus linfocitos. Estos tratamientos eliminan las respuestas inmunitarias adquiridas de tal manera que si a estos animales se les transfieren diferentes tipos de células, es

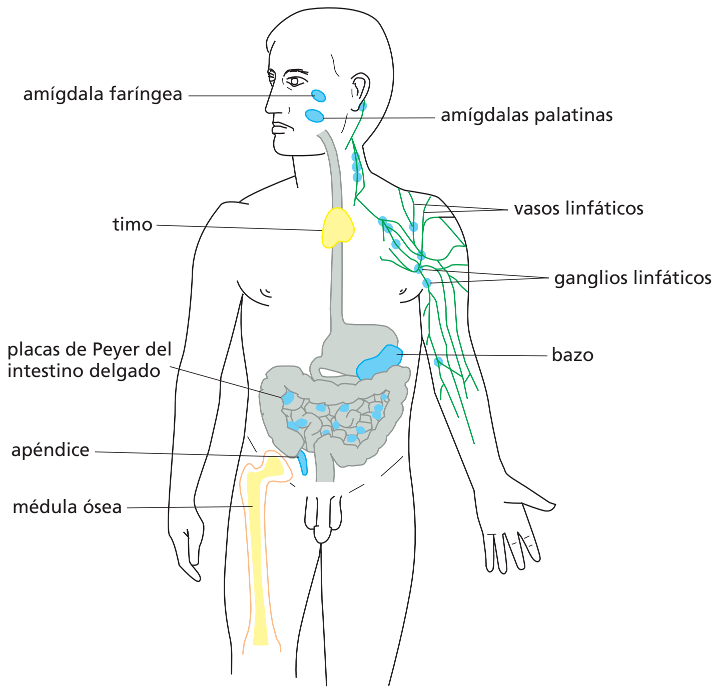


Figura 25–3 Órganos linfoides humanos. Los linfocitos se desarrollan en el timo y en la médula ósea (en *amarillo*), los cuales se denominan por este motivo *órganos linfoides primarios* (o *centrales*). Los linfocitos recién formados migran desde estos órganos primarios hacia los *órganos linfoides secundarios* (o *periféricos*), donde pueden reaccionar con antígenos extraños. En el dibujo sólo se muestran algunos de los órganos linfoides secundarios (en *azul*) y de los vasos linfáticos (en *verde*), ya que muchos linfocitos se encuentran, por ejemplo, en órganos linfoides secundarios de la piel y de los pulmones. Tal como se describirá posteriormente, los vasos linfáticos desembocan, en último término, en la corriente sanguínea (no se muestra).

posible determinar qué células revierten la deficiencia. El único tipo celular capaz de restablecer las respuestas inmunitarias adquiridas en animales irradiados son los linfocitos, lo cual pone de manifiesto que son necesarios en este tipo de respuestas (**Figura 25–4**).

Los sistemas inmunitarios innato y adquirido actúan conjuntamente

Como ya se ha mencionado, los linfocitos sólo suelen reaccionar frente a antígenos extraños si el **sistema inmunitario innato** ha sido previamente activado. Como se describió en el Capítulo 24, las rápidas respuestas inmunitarias innatas frente a una infección dependen de **receptores de reconocimiento de patrón** producidos por células del sistema inmunitario

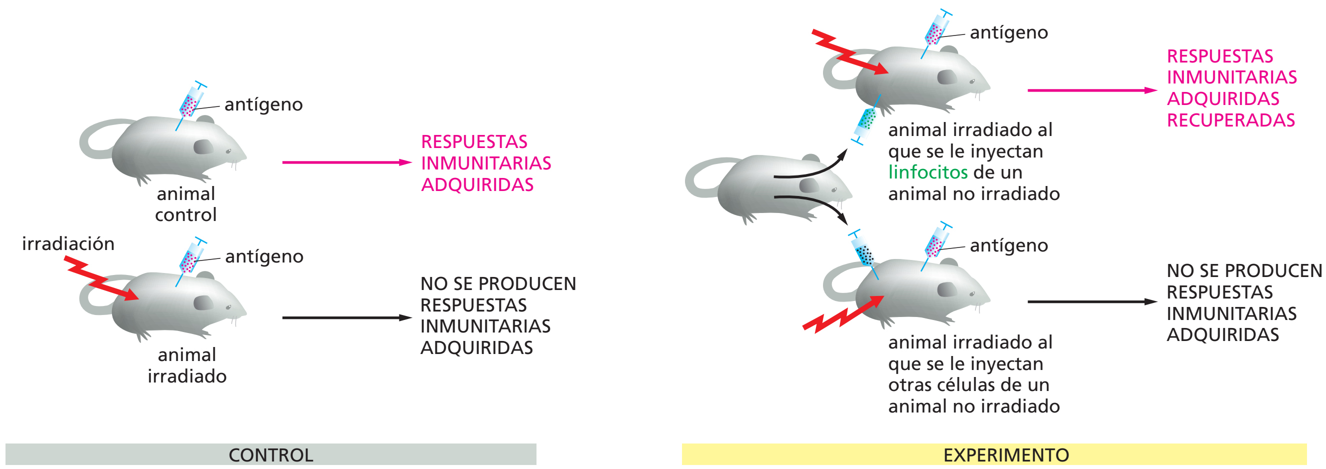


Figura 25–4 Un experimento clásico demuestra que los linfocitos son los responsables de la respuesta inmunitaria adquirida frente a los antígenos extraños. Un requerimiento importante de todos estos experimentos de transferencia celular es que ésta se realice entre animales *consanguíneos* (idénticos en términos genéticos). Si se transfieren los linfocitos a un animal genéticamente diferente, que ha sido irradiado, estos linfocitos reaccionan contra los antígenos "extraños" del huésped y pueden matar al animal. En el experimento mostrado, la inyección de linfocitos restaura tanto la respuesta mediada por linfocitos T como la mediada por anticuerpos, lo cual indica que estas células son necesarias para ambos tipos de respuesta.

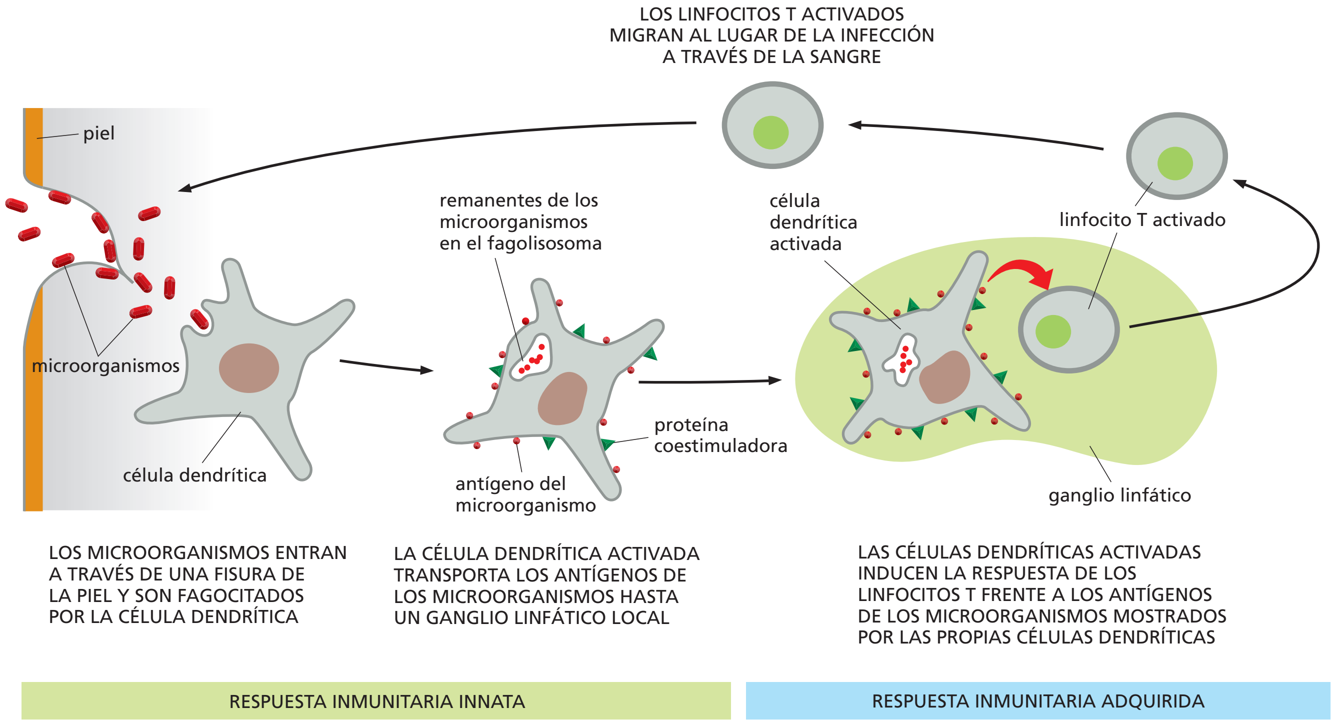


Figura 25–5 De qué manera el sistema inmunitario innato colabora en la activación del sistema inmunitario adquirido. Las células dendríticas ingieren microorganismos invasores o sus productos en el lugar de la infección. Los PAMP microbianos inducen a las células dendríticas a expresar en su superficie *proteínas coestimuladoras* y a migrar a través de los vasos linfáticos a un ganglio linfático próximo. En el ganglio, las células dendríticas activan la pequeña fracción de linfocitos T que expresan un receptor para los antígenos microbianos mostrados por la célula dendrítica en su superficie. Estos linfocitos T proliferan y algunos de ellos migran al lugar de la infección, donde colaboran en la eliminación de los microorganismos, ayudando en la activación de los macrófagos o eliminando las células infectadas (no se muestra).

innato. Estos receptores reconocen patrones de *moléculas inmunoestimulantes asociadas a patógenos* que están ausentes en el organismo huésped. Con frecuencia se trata de patrones repetidos también denominados *patrones moleculares asociados a patógeno* (*PAMP: **pa**thogen-**a**ssociated **m**olecular **p**atterns*) como son los hallados en la estructura molecular de los ácidos nucleicos, lípidos, polisacáridos y proteínas de los microorganismos.

Algunos de estos receptores se localizan en la superficie de células fagocitarias profesionales (fagocitos), como macrófagos y neutrófilos, donde favorecen la fagocitosis de los patógenos que, a continuación, serán conducidos a los lisosomas donde serán eliminados. Otros receptores son secretados y se unen a la superficie de microorganismos; de este modo son eliminados por fagocitos o por proteínas sanguíneas del *sistema del complemento* (descrito en el Capítulo 24). Por último, existen receptores como los *receptores semejantes a Toll* (*TLR*: ***T**oll-**l**ike **r**eceptors*), tratados con más detalle en el Capítulo 24, que activan vías de señalización intracelular que conducen a la secreción de moléculas de señalización extracelular, las cuales favorecen la inflamación y participan en la activación de las respuestas inmunitarias adquiridas.

Las células del sistema inmunitario innato de vertebrados más eficientes en responder a los PAMP y activar las respuestas inmunitarias adquiridas son las **células dendríticas**. Se hallan presentes en la mayoría de los tejidos y expresan gran cantidad de TLR y otros receptores de reconocimiento de patrón, presentando los antígenos microbianos a los linfocitos T de los órganos linfoides periféricos. En la mayoría de los casos, reconocen y fagocitan en el lugar de la infección microorganismos, sus productos o fragmentos de células infectadas, y a continuación migran a los órganos linfoides periféricos próximos; en otros casos, captan microorganismos o sus productos directamente en un órgano linfoide periférico como el bazo. En cualquier caso, los PAMP microbianos activan las células dendríticas que, a su vez, pueden activar de forma directa a los linfocitos T en los órganos linfoides periféricos de forma que responden a los antígenos microbianos que muestran las células dendríticas en su superficie. Una vez activados, los linfocitos T migran al lugar de la infección donde colaboran en la eliminación de los microorganismos (**Figura 25–5**). Otros linfocitos T activados permanecen en el órgano linfoide donde ayudan a mantener activas las células dendríticas, a activar otros linfocitos T y a activar linfocitos B a producir anticuerpos contra los antígenos microbianos.

Por tanto, las respuestas inmunitarias innatas se activan sobre todo en los lugares de infección (o lesión), mientras que las respuestas inmunitarias adquiridas lo hacen en su mayor parte en los órganos linfoides periféricos como los ganglios linfáticos y el bazo. Ambos tipos de respuesta colaboran en la eliminación de los patógenos y macromoléculas extrañas.

Los linfocitos B se desarrollan en la médula ósea; los linfocitos T se desarrollan en el timo

Tanto los linfocitos T como los B reciben su nombre por el órgano en el que se desarrollan. Los linfocitos T lo hacen en el ***t**imo* y los B, en mamíferos adultos, en la *médula ósea* (***b**one marrow*) o en el hígado, durante el desarrollo fetal.

Ambos tipos celulares derivarían de las mismas *células progenitoras linfoides comunes* que, a su vez, derivan de *células madre hematopoyéticas* pluripotenciales, que dan lugar a todos los tipos celulares sanguíneos incluidos los eritrocitos, los leucocitos y las plaquetas. Dichas células progenitoras (estudiadas en el Capítulo 23) se localizan inicialmente en tejidos *hematopoyéticos*, sobre todo el hígado en los fetos y en la médula ósea en adultos.

Los linfocitos T se desarrollan en el timo a partir de células progenitoras linfoides comunes, que migran hasta allí a través de la sangre desde tejidos hematopoyéticos. En la mayoría de mamíferos incluidos los humanos y los ratones, los linfocitos B proceden de células progenitoras linfoides comunes presentes en los tejidos hematopoyéticos (**Figura 25–6**). El timo y los tejidos hematopoyéticos reciben el nombre de **órganos linfoides primarios** (**centrales**) por ser lugares en los que los linfocitos se desarrollan a partir de células precursoras (véase Figura 25–3).

Como se describirá más adelante, gran parte de los linfocitos mueren en los órganos linfoides primarios poco después de haberse originado y sin haber actuado nunca. Otros, en cambio, maduran y migran por vía sanguínea hasta los **órganos linfoides secundarios** (**periféricos**), fundamentalmente ganglios linfáticos, bazo y tejidos linfoides asociados a los epitelios de las mucosas gastrointestinal y respiratoria o localizados en la piel (véase la Figura 25–3). Los órganos linfoides periféricos son los lugares en los que los linfocitos T y B reaccionan con antígenos extraños (véase la Figura 25–6).

Los linfocitos B y los linfocitos T no se pueden diferenciar desde un punto de vista morfológico entre sí a no ser que hayan sido previamente activados por el antígeno. Ambos tipos de células tienen un aspecto muy similar cuando no han sido activados, incluso al microscopio electrónico. Son células pequeñas, tan sólo un poco superiores en tamaño a los eritrocitos, y contienen un escaso citoplasma (**Figura 25–7**A). Cuando han sido activados por el antígeno, ambos tipos celulares proliferan y se diferencian a *células efectoras*. Los linfocitos B efectores secretan anticuerpos; en su forma más madura presentan un abundante retículo endoplasmático rugoso (Figura 25–7B) y reciben el nombre de *células plasmáticas*. Por el contrario, los linfocitos T efectores (Figura 25–7C) contienen poco retículo endoplasmático y no secretan anticuerpos; en lugar de ello secretan una variedad de proteínas denominadas **citoquinas** que actúan como mediadores locales.

Existen tres clases principales de linfocitos T: los *linfocitos T citotóxicos,* los *linfocitos T colaboradores* y los *linfocitos T reguladores* (*supresores*). Los *linfocitos T citotóxicos* eliminan directamente células infectadas mientras que los *linfocitos T colaboradores* participan en la activación de macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y linfocitos T citotóxicos a través

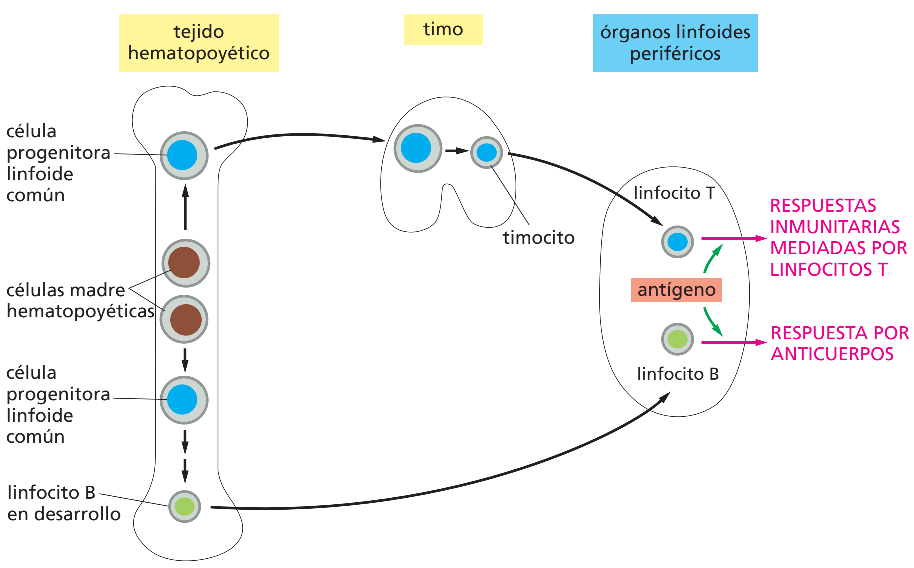


Figura 25–6 Desarrollo de los linfocitos T y B. Los órganos linfoides primarios, donde se desarrollan los linfocitos a partir de células progenitoras linfoides comunes, están recuadrados en *amarillo*. Las células progenitoras linfoides comunes se desarrollan en la médula ósea a partir de células madre hematopoyéticas pluripotenciales. Algunas de ellas dan lugar en la propia médula ósea a linfocitos B inmaduros, mientras que otras migran al timo (a través de la circulación sanguínea), donde se desarrollan en timocitos (linfocitos T en desarrollo). Tanto los linfocitos T como los B son activados por antígenos extraños en los órganos linfoides periféricos como los ganglios linfáticos o el bazo.

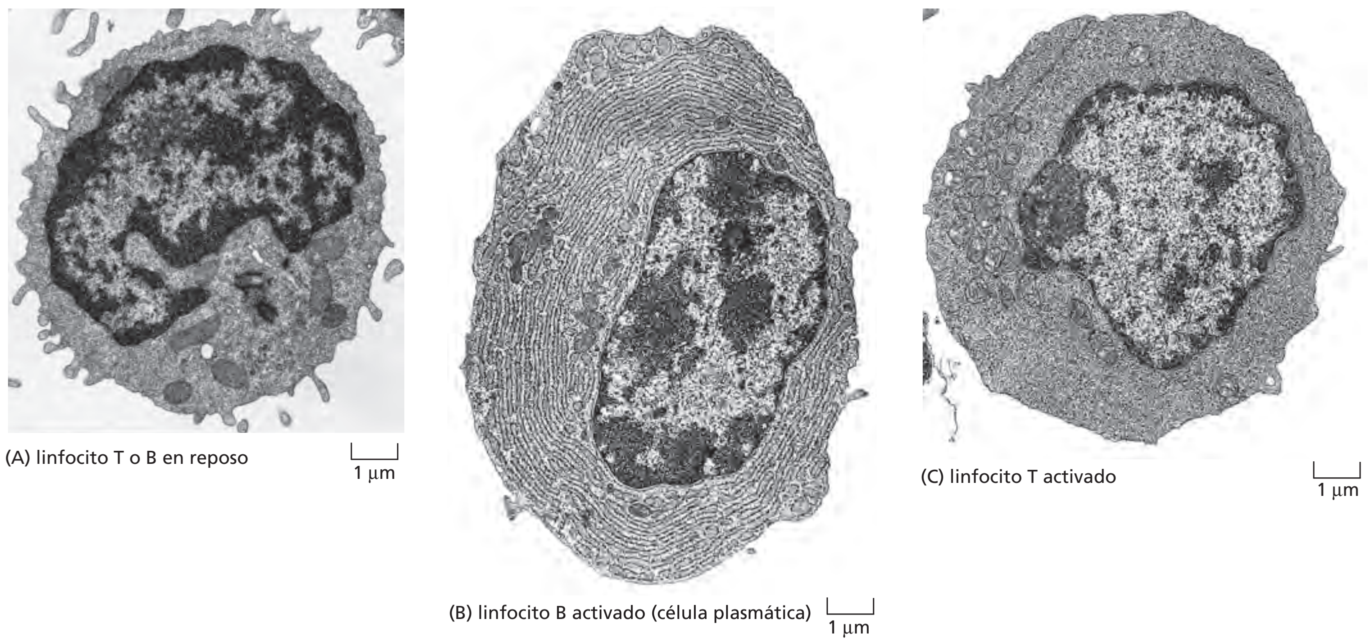


Figura 25–7 Electromicrografías de linfocitos en reposo y activados. (A) Linfocito en reposo, que puede ser tanto un linfocito T como uno B, ya que resulta difícil distinguirlos morfológicamente mientras no están activados. (B) Linfocito B activado (célula plasmática), que tiene un extenso retículo endoplasmático (ER) rugoso que se encuentra distendido debido a las moléculas de anticuerpo. (C) Linfocito T activado que presenta un ER rugoso relativamente escaso y tiene numerosos ribosomas libres. Obsérvese que las tres células se muestran al mismo aumento. (A, por cortesía de Dorothy Zucker-Franklin; B, por cortesía de Carlo Grossi; A y B, de D. Zucker-Franklin et al., Atlas of Blood Cells: Function and Pathology, 2.ª ed. Milán, Italia: Edi. Ermes, 1988; C, por cortesía de Stefanello de Petris.)

de la secreción de citoquinas y mediante la expresión en su superficie de diversas proteínas coestimuladoras. Los *linfocitos T reguladores* utilizarían estrategias similares para inhibir la función de los linfocitos T colaboradores, los linfocitos T citotóxicos y las células dendríticas. Por tanto, mientras que los linfocitos B pueden actuar a larga distancia secretando anticuerpos que entran en la circulación sanguínea y son ampliamente distribuidos, los linfocitos T, aunque sí pueden desplazarse en la distancia, una vez allí, sólo actúan de forma local sobre las células más próximas.

El sistema inmunitario adquirido actúa por selección clonal

La característica más destacable del sistema inmunitario adquirido es la especificidad de su respuesta frente a millones de antígenos extraños diferentes. Los linfocitos B humanos, por ejemplo, pueden producir más de 10^{12} moléculas de anticuerpo diferentes que reaccionan específicamente contra el antígeno que ha inducido su producción. ¿Cómo generan los linfocitos B tal diversidad de anticuerpos específicos? La respuesta comenzó a fraguarse durante la década de 1950 al proponerse la **teoría de la selección clonal**. Según esta teoría un animal genera, inicialmente y de modo aleatorio, una gran diversidad de linfocitos, de los cuales se seleccionarán de forma específica los que son capaces de reaccionar contra los antígenos extraños con los que el animal pueda encontrarse. Mientras cada linfocito se desarrolla en un órgano linfoide central, queda determinado a reaccionar frente a un antígeno concreto antes de haber sido expuesto a dicho antígeno. Esta predeterminación resulta de la expresión de proteínas receptoras en la membrana del linfocito que reconocen específicamente el antígeno en cuestión. Cuando un linfocito se encuentra con su antígeno en un órgano linfoide periférico, la unión del antígeno a los receptores activa el linfocito induciéndolo a proliferar, dando lugar de este modo a muchas más células portadoras del mismo receptor; este proceso se ha denominado *expansión clonal* (dado que las células derivadas de un ancestro común se denominan *clon*). El encuentro con el antígeno también induce a las células a diferenciarse en *células efectoras*. Por lo tanto un antígeno estimula de manera selectiva aquellas células que expresan receptores complementarios a ese antígeno y que ya están determinadas a responder frente a él (**Figura 25–8**). Esta organización es lo que hace que las respuestas inmunitarias adquiridas sean específicas para cada antígeno.

Existen evidencias a favor de los fundamentos de la teoría de la selección clonal. Sin embargo, ¿de qué forma el sistema inmunitario adquirido puede producir linfocitos que, en conjunto, presenten tal diversidad de receptores, incluyendo linfocitos que reconocen moléculas sintéticas que no se encuentran en la naturaleza? Veremos más adelante que en humanos los receptores específicos de antígenos de los linfocitos T y B se hallan codificados por genes que se generan a partir de fragmentos de genes que se unen mediante un tipo

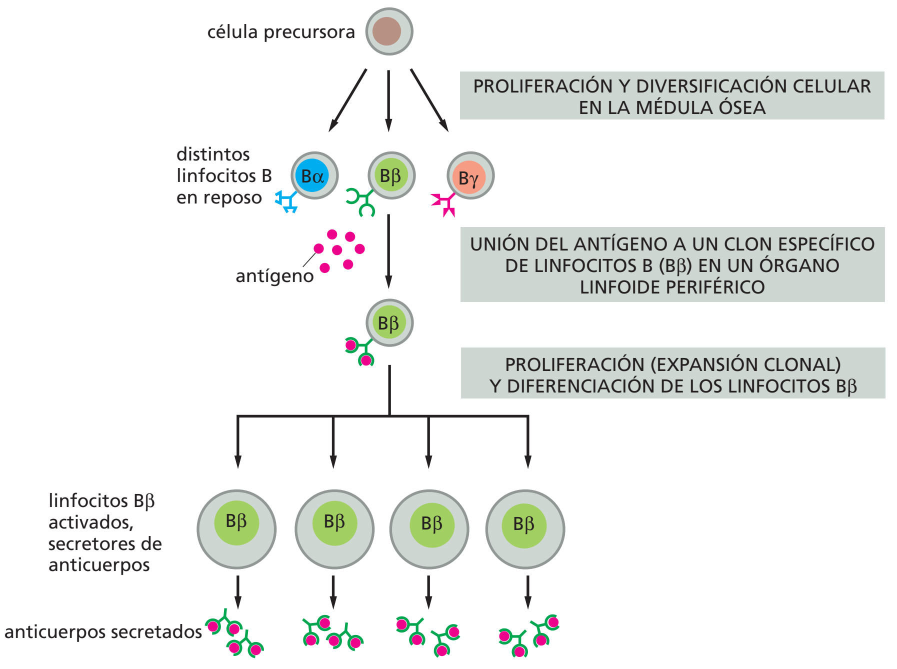


Figura 25–8 La teoría de la selección clonal. Un antígeno sólo activa aquellos linfocitos que ya están determinados a responder ante él. Un linfocito destinado a responder ante un antígeno concreto expresa receptores de superficie celular que reconocen de forma específica al antígeno. Parece que el sistema inmunitario humano consta de muchos millones de clones diferentes de linfocitos, y que todos los linfocitos de un clon expresan el mismo receptor. Normalmente, antes del primer encuentro con el antígeno un clon contiene sólo uno o un pequeño número de células. Un antígeno concreto puede activar cientos de clones diferentes. Aunque aquí sólo se muestran los linfocitos B, los T actúan de forma similar. Nótese que los receptores en los linfocitos B son moléculas de anticuerpo y que los linfocitos B indicados en este esquema como "Bβ" reconocen el mismo antígeno que los anticuerpos secretados por los linfocitos "Bβ" activados.

especial de recombinación genética que se produce en etapas tempranas del desarrollo de un linfocito, antes de que se encuentre con el antígeno. Este proceso de ensamblaje es lo que genera una enorme diversidad de receptores y linfocitos que permite que el sistema inmunitario responda frente a una variedad prácticamente ilimitada de antígenos.

La mayoría de antígenos estimulan muchos clones diferentes de linfocitos

La mayoría de macromoléculas, incluidas casi todas las proteínas y gran parte de los polisacáridos, pueden actuar como antígenos. Aquellas partes de un antígeno que se combinan con el lugar de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo o con el receptor de un linfocito, reciben el nombre de **determinantes antigénicos** (o *epítopos*). La mayoría de antígenos tienen varios determinantes antigénicos diferentes capaces de estimular la producción de anticuerpos, la respuesta de linfocitos T o ambas. Algunos determinantes producen una respuesta mayor que otros, de modo que la reacción que inducen puede dominar la respuesta global. Dichos determinantes se denominan *inmunodominantes*.

Un determinante antigénico puede activar distintos clones de linfocitos, cada uno de los cuales tiene un lugar de unión al antígeno de una afinidad característica por el determinante. Incluso una estructura relativamente sencilla como el grupo *dinitrofenilo* (*DNP: **di**nitro**p**henyl*), esquematizado en la **Figura 25–9**, puede ser "vista" de muchas maneras distintas. Así, cuando está acoplado a una proteína, como se indica en la figura, suele estimular la producción de cientos de tipos diferentes de anticuerpos anti-DNP, cada uno de los cuales está producido por un clon diferente de linfocitos B. Tales respuestas se denominan *policlonales*. Cuando sólo responden unos cuantos clones, se dice que la respuesta es *oligoclonal*; cuando toda la respuesta está producida por un solo clon de linfocitos B o T, se habla de respuesta *monoclonal*. Los anticuerpos monoclonales son una herramienta muy utilizada en biología y medicina pero tienen que generarse de un modo especial (véase Figura 8–8) puesto que las respuestas a la mayoría de antígenos son policlonales.

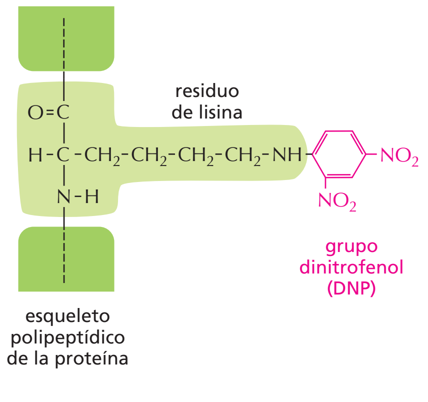


Figura 25–9 Grupo dinitrofenol (DNP). Aunque es demasiado pequeño para inducir una respuesta inmunitaria por sí mismo, cuando se une covalentemente a un residuo de lisina de una proteína, tal como se ilustra, el DNP estimula la producción de muchos anticuerpos diferentes que se unen específicamente a él.

La memoria inmunológica se debe tanto a la expansión clonal como a la diferenciación de los linfocitos

El sistema inmunitario adquirido, al igual que el sistema nervioso, tiene la capacidad de recordar. Por ello podemos desarrollar inmunidad de por vida frente a muchas enfermedades infecciosas comunes una vez hemos sido expuestos por primera vez al patógeno que las

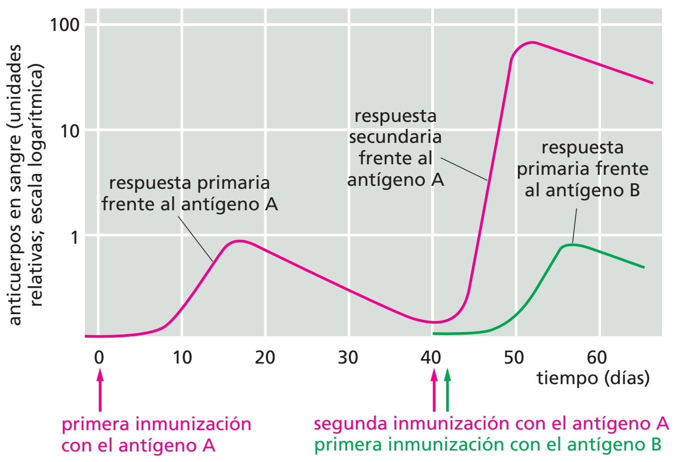


Figura 25–10 Respuestas primaria y secundaria de los anticuerpos. La respuesta secundaria inducida por una segunda exposición al antígeno A es más rápida e intensa que la respuesta primaria y es específica para A, lo cual indica que el sistema inmunitario ha "recordado" de forma específica su primer encuentro con dicho antígeno. En las respuestas mediadas por linfocitos T se observa el mismo tipo de memoria inmunitaria. Como se estudiará más adelante, los tipos de anticuerpos producidos durante la respuesta primaria son diferentes de los de la respuesta secundaria y los de la respuesta secundaria unen con mayor fuerza el antígeno.

causa y es por ello que la vacunación funciona. Este fenómeno puede demostrarse con animales de experimentación. Si un animal es inoculado con el antígeno A desarrolla una respuesta inmunitaria (ya sea humoral, mediada por linfocitos T o ambas) al cabo de un periodo de retraso de varios días, que aumenta de manera rápida y exponencial y finalmente disminuye de forma más gradual. Éste es el curso característico de una **respuesta inmunitaria primaria**, que se produce tras la primera exposición de un animal a un antígeno. Si se dejan transcurrir algunas semanas o meses, o incluso años, y de nuevo se inmuniza al animal con el antígeno A, se producirá una **respuesta inmunitaria secundaria** muy distinta de la respuesta primaria: el periodo de retraso es más breve y la respuesta es mayor y más eficiente. Estas diferencias indican que el animal ha "recordado" su primera exposición al antígeno A. Si por el contrario el animal es inoculado con un antígeno distinto (p. ej. el antígeno B), en lugar de una segunda inmunización con el antígeno A, la respuesta no será secundaria sino la típica de una respuesta inmunitaria primaria. Por consiguiente, la respuesta secundaria refleja una **memoria inmunológica** específica del antígeno A (**Figura 25–10**).

La teoría de la selección clonal proporciona una trama conceptual útil para comprender la base celular de la memoria inmunológica. En un animal adulto, los órganos linfoides periféricos contienen un conjunto de linfocitos que como mínimo se encuentran en tres estadios de maduración: *vírgenes, efectores* y *de memoria*. Cuando los **linfocitos vírgenes** se encuentran por primera vez con su antígeno, este antígeno estimula algunos de los linfocitos a proliferar y a diferenciarse en **linfocitos efectores** que llevan a cabo una respuesta inmunitaria (los linfocitos B efectores secretan anticuerpos mientras que los T efectores eliminan las células infectadas o regulan la respuesta de otros linfocitos). Algunos de estos linfocitos vírgenes estimulados por antígeno, proliferan y se diferencian en **linfocitos de memoria**, los cuales no llevan a cabo respuestas inmunitarias sino que son inducidos de forma rápida y fácil a convertirse en linfocitos efectores para un encuentro posterior con el mismo antígeno. Cuando encuentran su antígeno, los linfocitos de memoria (al igual que los linfocitos vírgenes) pueden dar lugar tanto a linfocitos efectores como a más células de memoria (**Figura 25–11**).

Por tanto, la respuesta primaria da lugar a una memoria inmunológica debido a la expansión clonal, dado que la proliferación de los linfocitos vírgenes estimulados por el antígeno genera muchos linfocitos de memoria, y también como consecuencia de que estas células de memoria son capaces de responder con mayor sensibilidad, rapidez y eficiencia frente al mismo antígeno que los linfocitos vírgenes. Además, al contrario que la mayoría de linfocitos efectores, que mueren al cabo de días o semanas, los linfocitos de memoria pue-

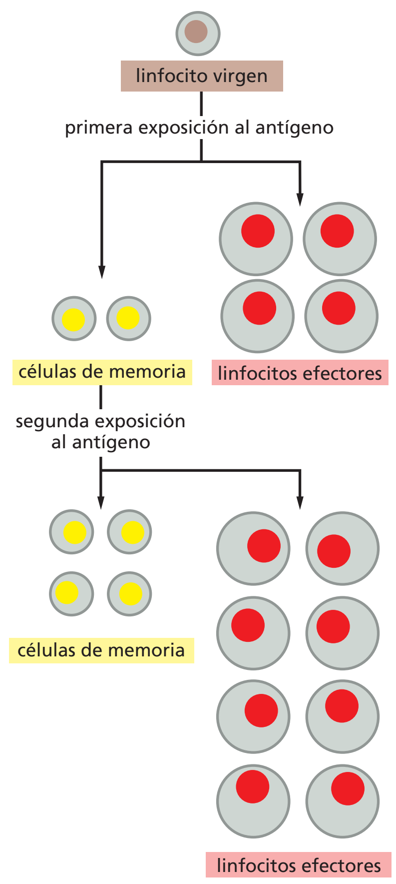


Figura 25–11 Modelo para la base celular de la memoria inmunitaria. Los linfocitos vírgenes proliferan y se diferencian al ser estimulados por su antígeno específico. La mayoría de ellos se transforman en células efectoras que actúan y después por lo general mueren, mientras que otros se transforman en células de memoria. Durante una exposición posterior al mismo antígeno, las células de memoria responden más rápidamente y de forma más eficiente que los linfocitos vírgenes, proliferando y dando lugar a linfocitos efectores y células de memoria. Los linfocitos T de memoria también pueden originarse a partir de linfocitos efectores (no mostrado).

den vivir tanto como el animal, incluso en ausencia de su antígeno específico, proporcionándole así una memoria inmunológica de por vida.

Tal como se describirá posteriormente, los linfocitos B de memoria producen anticuerpos de diferentes clases y de mayor afinidad que aquéllos producidos por los linfocitos B vírgenes. Ésta es la principal razón por la que las respuestas secundarias de los anticuerpos son mucho más efectivas en la eliminación de los patógenos que las respuestas primarias.

Aunque la mayoría de los linfocitos T y B efectores mueren tras finalizar la respuesta inmunitaria, algunos sobreviven como linfocitos efectores y proporcionan una protección a largo plazo contra el patógeno. Por ejemplo, una pequeña fracción de células plasmáticas producidas en una respuesta primaria de linfocitos B puede sobrevivir durante meses en la médula ósea, desde donde continúa secretando sus anticuerpos específicos a la circulación.

La tolerancia inmunológica evita normalmente que los antígenos propios sean atacados

Como se ha indicado en el Capítulo 24, las células del sistema inmunitario innato diferencian los patógenos de las moléculas normales del huésped gracias a receptores de patrones de reconocimiento. La tarea de reconocimiento que lleva a cabo el sistema inmunitario adquirido es bastante más complicada: debe ser capaz de responder específicamente a un número casi ilimitado de macromoléculas extrañas, pero evitando reaccionar frente a la gran cantidad de moléculas producidas por el propio huésped. ¿Cómo es posible este fenómeno? Por el hecho de que las moléculas propias no inducen las reacciones inmunitarias innatas necesarias para activar el sistema inmunitario adquirido. Pero a pesar de que una infección o un daño tisular desencadenan reacciones innatas, habitualmente la gran cantidad de las moléculas propias no induce ninguna respuesta inmunitaria adquirida. ¿Por qué no lo hacen?

Una respuesta a esta cuestión radica en que el sistema inmunitario adquirido ha "aprendido" a no responder frente a los antígenos propios. Los experimentos de trasplantes aportan evidencias sobre este proceso de aprendizaje. Cuando se trasplanta un tejido de un individuo a otro (y no se trata de gemelos idénticos), es frecuente que el sistema inmunitario del receptor reconozca las células del donante como extrañas y las destruya. (Por razones que se tratarán más adelante, los antígenos extraños de las células del donante son suficientemente potentes como para estimular las respuestas inmunitarias adquiridas incluso en ausencia de infección, lesión o de adyuvante.) Sin embargo, si se introducen células de una cepa de ratón en un ratón neonato de otra cepa, algunas de ellas sobrevivirán durante la mayor parte de la vida del animal receptor y este animal aceptará entonces un injerto del donante original a pesar de que rechace injertos de "terceros". Parece que bajo determinadas circunstancias, los antígenos no-propios provocan que el sistema inmunitario no responda frente a ellos. Esta falta de respuesta específica de antígeno frente a antígenos extraños se conoce como *tolerancia inmunológica adquirida* (**Figura 25–12**).

De este mismo modo, un animal adquiere la falta de respuesta del sistema inmunitario adquirido hacia sus propias macromoléculas (*tolerancia inmunológica natural* o **autotolerancia**). Por ejemplo, un ratón normal no puede producir ninguna respuesta inmunológica

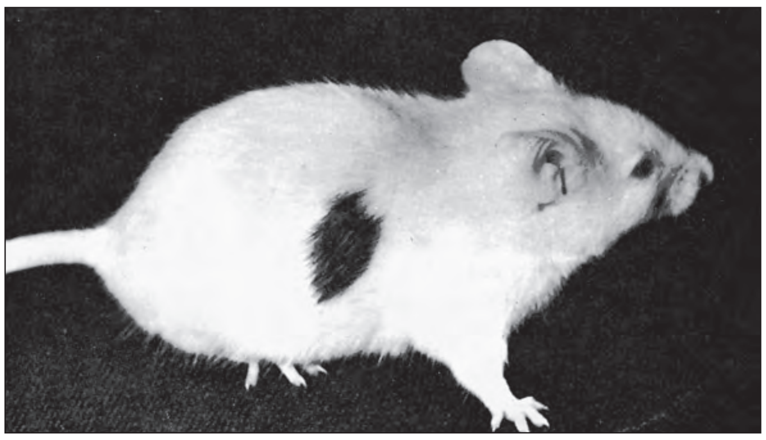


Figura 25–12 Tolerancia inmunitaria adquirida. El injerto cutáneo que aparece en la fotografía, trasplantado de un ratón pardo a un ratón blanco, ha sobrevivido durante muchas semanas porque el segundo animal, al nacer, fue inoculado con células de la médula ósea del primero, convirtiéndose en inmunológicamente tolerante a dichas células. Algunas de las células de la médula ósea (y su progenie) del ratón pardo persisten en el ratón blanco adulto y continúan induciendo tolerancia en los nuevos linfocitos que, en caso contrario, reaccionarían contra la piel parda. (Por cortesía de Leslie Brent, de I. Roitt, Essential Immunology, 6.ª ed. Oxford, U.K.: Blackwell Scientific, 1988.)

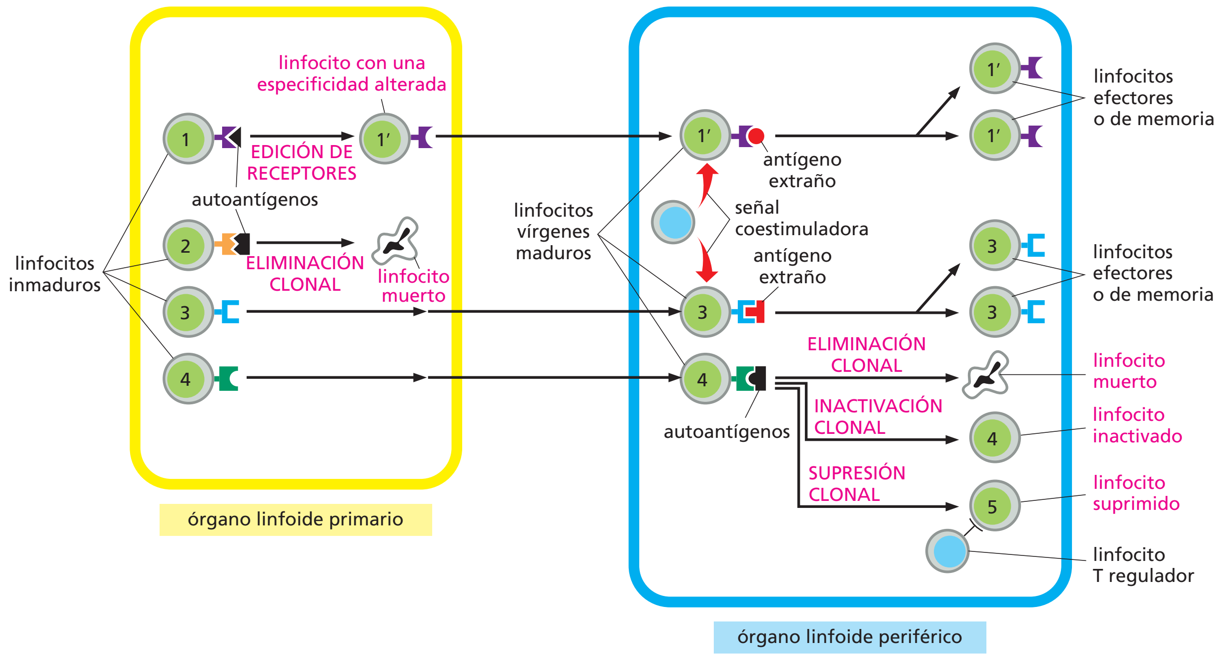


Figura 25–13 Mecanismos de tolerancia inmunitaria frente a los antígenos propios. Cuando un linfocito autorreactivo inmaduro reconoce a un antígeno propio en un órgano linfoide primario, puede modificar su receptor para el antígeno, de manera que pierda la autorreactividad (célula 1). Este proceso se denomina edición de receptores y parece que tiene lugar sobre todo en los linfocitos B en proceso de diferenciación. Otra posibilidad es que el linfocito puede ser eliminado por apoptosis, proceso denominado eliminación clonal (célula 2). Ambas formas de tolerancia (mostradas a la *izquierda*) tienen lugar en los órganos linfoides centrales, por lo que se habla de *tolerancia central*.
Cuando un linfocito virgen autorreactivo escapa de un órgano linfoide primario y reconoce a un antígeno propio en un órgano linfoide periférico (célula 4), no será activado porque por lo general el reconocimiento tiene lugar en ausencia de las señales coestimuladoras adecuadas; el linfocito puede entonces morir por apoptosis (normalmente después de un periodo de proliferación), ser inactivado o ser suprimido por un linfocito T regulador (si el linfocito autorreactivo es un linfocito T efector). Estas formas de tolerancia, indicadas a la *derecha*, se incluyen en la denominada *tolerancia periférica*.

contra una de sus propias proteínas del sistema del complemento denominada C5 (tratado en el Capítulo 24). Sin embargo, ratones mutantes deficientes para el gen que codifica C5 (que por lo demás sean genéticamente idénticos a los normales) pueden producir una fuerte respuesta inmunitaria a esta proteína sanguínea si se les inmuniza con ella. De modo similar, los humanos a los que les falta el gen normal que codifica la proteína de la coagulación Factor VIII (y por tanto sangran en exceso) producen anticuerpos contra la proteína cuando les es administrada para controlar el sangrado.

La tolerancia inmunológica natural frente a una molécula propia concreta sólo persiste mientras la molécula está presente en el organismo. Si se elimina de forma experimental una molécula propia como la proteína C5 de un ratón adulto, en unas cuantas semanas o meses el animal adquiere la habilidad de responder frente a ella. Por lo tanto, el sistema inmunitario es genéticamente capaz de responder a moléculas propias pero aprende a no hacerlo.

La autotolerancia depende de distintos mecanismos:

1. Durante la expresión de receptores (*edición de receptores*), los linfocitos que reconocen moléculas propias (*linfocitos autorreactivos*) cambian sus receptores para no reconocer dichos antígenos propios.
2. Mediante la *eliminación clonal*, los linfocitos autorreactivos mueren por apoptosis cuando se unen al antígeno propio.
3. A través de la *inactivación clonal* (también denominada anergia clonal) los linfocitos autorreactivos se inactivan funcionalmente cuando hallan su antígeno.
4. Mediante la *supresión clonal*, los linfocitos T reguladores suprimen la actividad de los linfocitos autorreactivos.

Algunos de estos mecanismos –especialmente los dos primeros, eliminación clonal y edición de receptores– ocurren en órganos linfoides centrales cuando los linfocitos autorreactivos recién formados encuentran por primera vez sus autoantígenos y son responsables del proceso de *tolerancia central*. La inactivación clonal y la supresión clonal, por el contrario, actúan principalmente cuando los linfocitos encuentran sus autoantígenos en los órganos linfoides periféricos y son los responsables del proceso de *tolerancia periférica*. La eliminación clonal y la inactivación clonal, sin embargo, actúan tanto en el ámbito central como en el periférico (**Figura 25–13**).

¿Por qué la unión de un antígeno propio conlleva tolerancia y no activación? La respuesta no es del todo conocida. Como trataremos más adelante, para que un linfocito sea activado en un órgano linfoide periférico no sólo tiene que unir su antígeno sino que además tiene que recibir señales coestimuladoras secretadas (diversas citoquinas) o unidas a la membrana. Ambos tipos de señales son proporcionadas por un linfocito T colaborador, en el caso de los linfocitos B, o por una célula dendrítica activada, en el caso de los linfocitos T.

Puesto que habitualmente las señales coestimuladoras dependen de la exposición a patógenos, por lo general un linfocito autorreactivo encuentra su antígeno en ausencia de dichas señales. En estas condiciones, un linfocito B que interaccione con su antígeno o un linfocito T que interaccione con el suyo en la membrana de una célula dendrítica no activada, no sólo no será activado sino que a menudo se volverá tolerante y, en consecuencia, será eliminado, inactivado o suprimido por un linfocito T regulador (véase la Figura 25–13). Como se describirá más adelante, tanto la activación como la tolerancia de los linfocitos T suelen ocurrir en la superficie de las células dendríticas en los órganos linfoides periféricos.

En ocasiones, los mecanismos de tolerancia desaparecen y provocan que los linfocitos T o los B (o ambos) reaccionen contra antígenos tisulares propios del organismo. La *miastenia grave* es un ejemplo de este tipo de **enfermedad autoinmunitaria**. Los individuos afectados por esta enfermedad generan anticuerpos contra los receptores de la acetilcolina de sus propias células musculares esqueléticas. Dichos anticuerpos interfieren en el funcionamiento normal de los receptores y los pacientes se debilitan y pueden llegar a morir por dificultad respiratoria. De modo similar, en la *diabetes infantil* (*tipo 1*) las reacciones inmunitarias contra las células secretoras de insulina del páncreas eliminan estas células, lo cual conlleva un grave déficit de insulina.

En la mayoría de casos, los mecanismos responsables de la pérdida de tolerancia por los antígenos propios en las enfermedades autoinmunitarias son desconocidos. Sin embargo parece que la activación del sistema inmunitario innato por una infección o por daño tisular puede influir en la aparición de respuestas contra lo propio en individuos cuyos mecanismos de autotolerancia sean defectuosos, lo cual conduce a la autoinmunidad.

Los linfocitos circulan continuamente a través de los órganos linfoides periféricos

Por lo general, los patógenos entran en el organismo a través de superficies epiteliales, fundamentalmente la piel y los tractos digestivo y respiratorio. Para inducir una respuesta inmunitaria adquirida, los antígenos microbianos tienen que viajar desde estos puntos de entrada hasta los órganos linfoides periféricos, como los ganglios linfáticos o el bazo, donde los linfocitos se activarán (véase la Figura 25–5). Tanto la ruta como el destino de los antígenos dependen del lugar de entrada al organismo. Los vasos linfáticos (véase Figura 25–3) transportan antígenos que entran por la piel o el tracto respiratorio a ganglios linfáticos locales; los antígenos que entran a través del intestino acaban en órganos linfoides periféricos asociados al intestino como las placas de Peyer, y el bazo filtra los antígenos que entran a la sangre. Como ya se ha señalado, en muchos casos las células dendríticas transportarán los antígenos desde el lugar de la infección al órgano linfoide periférico donde desempeñarán un papel clave en la activación de linfocitos T (véase Figura 25–5).

Sin embargo sólo una minúscula fracción de toda la población de linfocitos es capaz de reconocer un antígeno microbiano concreto en un órgano linfoide periférico (entre 1/10.000 y 1/100.000 de cada tipo de linfocito). ¿De qué forma estas pocas células encuentran una célula presentadora de antígeno que les muestre su antígeno? La respuesta es que los linfocitos circulan continuamente entre órganos linfoides periféricos a través de la linfa y la sangre. Por ejemplo, en los ganglios linfáticos los linfocitos abandonan de forma continua la circulación sanguínea a través de endotelios que delimitan unas pequeñas venas denominadas *vénulas postcapilares*. Después de fluir a través del ganglio, se acumulan en pequeños vasos linfáticos que abandonan el ganglio y que conectan con otros vasos linfáticos que en su recorrido atraviesan otros ganglios linfáticos (véase Figura 25–3). Así, a través de vasos cada vez mayores, los linfocitos entran en el vaso linfático principal (el *conducto torácico*) que los devolverá a la sangre (**Figura 25–14**).

La recirculación entre la sangre y la linfa continúa hasta que el linfocito es activado por su antígeno específico en un órgano linfoide periférico. Entonces, el linfocito permanece en el órgano linfoide periférico, donde prolifera y se diferencia en linfocito efector o en linfocito de memoria. Muchos de los linfocitos T efectores abandonan el órgano linfoide por la linfa y migran a través de la sangre hasta el lugar de la infección (véase Figura 25–5), mientras que otros permanecen en el órgano linfoide y participan en la activación de los linfocitos B y de otros linfocitos T. Algunos linfocitos B efectores (células plasmáticas) permanecen en el órgano linfoide periférico y secretan anticuerpos a la sangre durante días, hasta que mueren; otros migran a la médula ósea donde secretan anticuerpos a la sangre durante meses o años. Los linfocitos T de memoria y los linfocitos B generados se unen al grupo de linfocitos recirculantes.

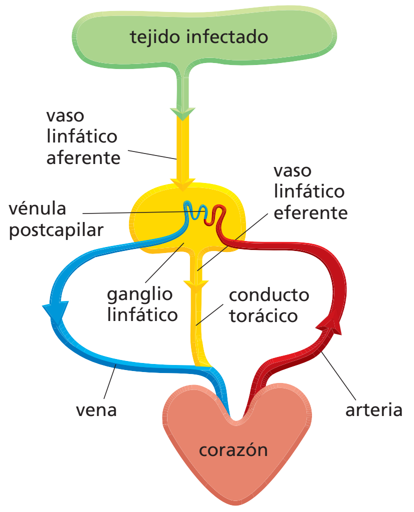


Figura 25–14 Vía que siguen los linfocitos en su recirculación continua entre la linfa y la sangre. El esquema muestra la circulación a través de un ganglio linfático (en *amarillo*). Normalmente, los antígenos microbianos son transportados hasta el ganglio linfático por células dendríticas (no mostradas) que entran al ganglio a través de los vasos linfáticos aferentes que drenan el tejido infectado (en *verde*). Por el contrario, los linfocitos T y los linfocitos B ingresan en el ganglio linfático por vía arterial y abandonan la sangre a través de las vénulas postcapilares. Si no encuentran su antígeno, tanto los linfocitos T como los linfocitos B abandonan el ganglio linfático a través de los vasos linfáticos eferentes, los cuales finalmente desembocan en el conducto torácico. El conducto torácico desemboca en una gran vena que conduce la sangre al corazón, completando así la circulación de los linfocitos T y B. Un ciclo recirculatorio típico de estos linfocitos se completa en unas 12 a 24 horas.

La recirculación de los linfocitos depende de interacciones específicas entre la superficie del linfocito y la superficie de las células endoteliales especializadas que delimitan los vasos sanguíneos en los órganos linfoides periféricos. Muchos tipos de células sanguíneas entran en contacto con estas células endoteliales especializadas que delimitan las vénulas postcapilares en los ganglios linfáticos, pero sólo los linfocitos se adhieren y abandonan el torrente sanguíneo ingresando en los ganglios. Los linfocitos se adhieren inicialmente a las células endoteliales a través de *receptores de migración local* que se unen a ligandos específicos (a menudo llamados *contrarreceptores*) de la superficie de la célula endotelial. La migración de los linfocitos a los ganglios linfáticos depende de un receptor de migración local denominado *L-selectina*, un miembro de la familia de las selectinas, lectinas de superficie celular. Esta proteína se une de forma específica a determinados glúcidos de contrarreceptores expresados exclusivamente en la superficie de un tipo especial de célula endotelial que delimita las vénulas postcapilares de los ganglios linfáticos, provocando que los linfocitos se adhieran de forma débil a las células endoteliales y rueden despacio a lo largo de su superficie. Este fenómeno de rodamiento continua hasta que otro tipo de adhesión mucho más fuerte se pone en marcha gracias a proteínas quimioatrayentes (denominadas *quimioquinas*; véase más adelante) secretadas por las células endoteliales. Esta fuerte adhesión está mediada por moléculas de adhesión de la familia de las *integrinas* que se activan en la superficie de los linfocitos. Entonces los linfocitos se detienen y migran a través del endotelio desde la sangre al ganglio linfático (**Figura 25–15**). Tanto las selectinas como las integrinas se han tratado en el Capítulo 19.

Las **quimioquinas** son un tipo de citoquinas. Son proteínas pequeñas y cargadas positivamente que son secretadas y desempeñan un papel clave en la guía de las migraciones de diversos tipos de células, incluidos los leucocitos. <ACCG> Son similares entre sí en términos estructurales y se unen a la superficie de células endoteliales, así como a proteoglicanos cargados negativamente de la matriz extracelular de los órganos. Las quimioquinas se unen a receptores acoplados a proteínas G (descritos en el Capítulo 15) que se hallan en la superficie de algunas células sanguíneas, atrayendo a dichas células desde la circulación sanguínea al órgano, guiándolas hasta localizaciones concretas del órgano y, una vez allí, colaborando en detener su migración. (Por desgracia, el virus del sida, el HIV, también se une a algunos receptores de quimioquinas así como al correceptor CD4, que se estudiará más adelante, y de este modo infecta los leucocitos.) Los linfocitos T y B entran a la misma región del ganglio linfático pero, a continuación, guiados por distintas quimioquinas, se distribuyen por regiones diferentes del ganglio: los linfocitos T van a la *zona paracortical* y los B a los *folículos linfoides* (**Figura 25–16**).

Si no encuentran su antígeno, tanto los linfocitos T como los B abandonan pronto el ganglio linfático a través de vasos linfáticos eferentes. Sin embargo, si encuentran su antígeno, son inducidos a expresar los receptores de adhesión que retienen los linfocitos en el ganglio; los linfocitos se acumulan en los límites entre las áreas de linfocitos T y B, donde los linfocitos T y B específicos pueden interaccionar, proliferando y diferenciándose en linfocitos efectores o en linfocitos de memoria. Muchos de los linfocitos efectores abandonan el ganglio y expresan diferentes receptores de quimioquinas que participan guiando dichos linfocitos a nuevos destinos: los linfocitos T a los lugares de infección y los B a la médula ósea.

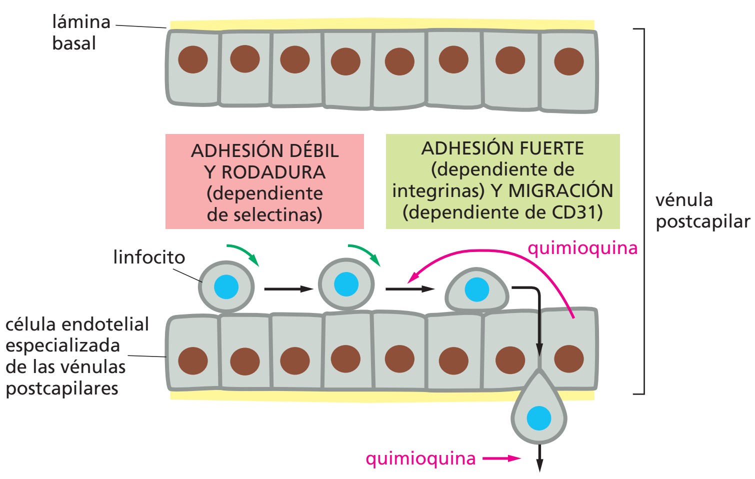


Figura 25–15 Migración de los linfocitos desde el torrente circulatorio hasta un ganglio linfático. <CCCC> Los linfocitos circulantes se adhieren débilmente a la superficie de las células endoteliales especializadas localizadas en las vénulas postcapilares de los ganglios linfáticos. Esta adhesión inicial está mediada por la L-selectina que se expresa en la membrana de los linfocitos. La adhesión es lo bastante débil como para permitir que el linfocito ruede por la superficie de las células endoteliales empujado por el flujo sanguíneo. Tras la estimulación por quimioquinas secretadas por las células endoteliales (flecha *roja* curva), los linfocitos activan de manera rápida un sistema de adhesión más fuerte, que será mediado por una integrina. Esta adhesión fuerte le permite al linfocito detener su desplazamiento por la superficie endotelial. El linfocito utiliza entonces una inmunoglobulina de adhesión o IgCAM (CD31) para unirse a las zonas de unión entre células endoteliales adyacentes y migrar fuera de la vénula. CD31 está localizada a la vez en la superficie del linfocito y en las uniones entre las células endoteliadas La posterior migración de linfocitos en el interior del ganglio linfático depende de quimioquinas producidas por el propio ganglio (flecha *roja* recta).

La migración transendotelial de otros leucocitos que tiene lugar en los tejidos infectados se produce por un mecanismo semejante a éste.

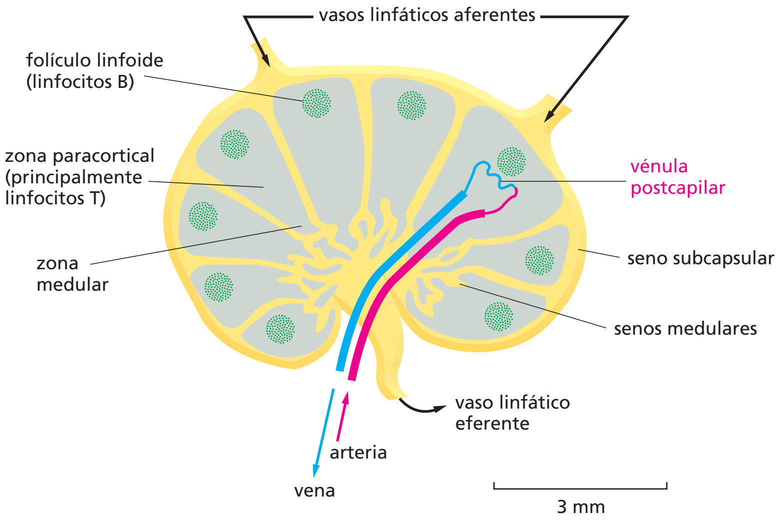


Figura 25–16 Esquema de un ganglio linfático humano. Los linfocitos B están agrupados en estructuras llamadas folículos linfoides mientras que los linfocitos T se encuentran mayoritariamente en la zona paracortical. Ambos tipos de linfocitos penetran en el ganglio linfático procedentes de la sangre, a través de las vénulas postcapilares, atraídos por quimioquinas (véase Figura 25–15). Después, los linfocitos T y los linfocitos B migran a sus áreas respectivas guiados también por diversas quimioquinas. Si no interaccionan con su antígeno específico, tanto los linfocitos T como los B alcanzan los senos medulares y abandonan el ganglio a través del vaso linfático eferente. Este vaso desemboca, finalmente, en la corriente sanguínea, facilitando a los linfocitos el inicio de otro ciclo de recirculación a través de un órgano linfoide periférico (véase Figura 25–14).

Si encuentran su antígeno específico, tanto los linfocitos T como los B quedan retenidos en el ganglio donde son inducidos a convertirse en linfocitos efectores o en linfocitos de memoria; los linfocitos T y B que responden al mismo patógeno pueden interaccionar dentro o en la periferia de los folículos linfoides.

Resumen

Las respuestas inmunitarias innatas son inducidas en los lugares de infección por patrones moleculares asociados a patógeno (PAMP), que son reconocidos por receptores de patrón de reconocimiento expresados por células del sistema inmunitario innato. Además de combatir directamente la infección, estas respuestas inmunitarias innatas colaboran en la activación de las respuestas inmunitarias adquiridas en los órganos linfoides periféricos. Al contrario de las respuestas inmunitarias innatas, las adquiridas muestran memoria inmunológica y, en consecuencia, proporcionan una protección específica y de larga duración contra el patógeno que las ha inducido.

El sistema inmunitario adquirido está formado por muchos millones de clones de linfocitos, en cada uno de los cuales los linfocitos comparten un solo tipo de receptor de superficie que les permite unirse a un antígeno en concreto. Sin embargo, la unión del antígeno a este receptor no suele ser suficiente para estimular la proliferación y la diferenciación de un linfocito a célula efectora que colabora en la eliminación del patógeno. También son necesarias señales coestimuladoras unidas a la membrana así como diversas señales secretadas (citoquinas) proporcionadas por otras células especializadas de los órganos linfoides periféricos. Así, los linfocitos T colaboradores proporcionan dichas señales a los linfocitos B mientras que las células dendríticas son las que lo hacen para los linfocitos T. Los linfocitos B secretan anticuerpos que pueden actuar a larga distancia eliminando microorganismos extracelulares y las toxinas producidas por ellos. Los linfocitos T efectores, por el contrario, actúan de forma local eliminando células huésped infectadas o ayudando a otras células a eliminar el patógeno. Como parte de la respuesta inmunitaria adquirida, algunos linfocitos proliferan y se diferencian a células de memoria capaces de responder más rápidamente y de modo más eficiente en la siguiente ocasión en que se produzca una invasión por el mismo microorganismo. Tanto los linfocitos B como los T circulan de manera continua entre órganos linfoides periféricos a través de la sangre y la linfa. Sólo si encuentran su antígeno extraño específico en un órgano linfoide periférico dejan de migrar y pasan a proliferar y diferenciarse en linfocitos efectores o células de memoria. Los linfocitos capaces de actuar contra moléculas propias modifican sus receptores o son eliminados, inactivados o suprimidos por linfocitos T reguladores, por lo que el sistema inmunitario adquirido evita, normalmente, actuar contra las moléculas y células del propio huésped.

LINFOCITOS B Y ANTICUERPOS

Los vertebrados moriríamos de forma inevitable a causa de una infección si no fuéramos capaces de producir anticuerpos. Los anticuerpos nos defienden de la infección uniéndose a virus y a toxinas microbianas e inactivándolos (véase Figura 25–2). Cuando los anticuerpos se unen a los patógenos invasores también reclutan algunos de los componentes del sistema inmunitario innato, que comprende diversos tipos de leucocitos y los componentes del sistema del complemento (descrito en el Capítulo 24). Los leucocitos y los componentes del complemento activados actúan juntos en el ataque contra los invasores.

Los anticuerpos, sintetizados exclusivamente por los linfocitos B, tienen miles de millones de formas diferentes, cada una de las cuales tiene una secuencia de aminoácidos y un lugar de unión al antígeno diferentes. En conjunto se denominan **inmunoglobulinas** (**Ig**) y constituyen uno de los componentes proteicos más abundantes de la sangre, representando alrededor de un 20% del peso total de las proteínas plasmáticas. Los mamíferos producen cinco clases de anticuerpos, cada uno de los cuales media una respuesta biológica característica como consecuencia de su unión a un antígeno. En esta sección se examinará la estructura y la función de los anticuerpos así como sus interacciones con los antígenos.

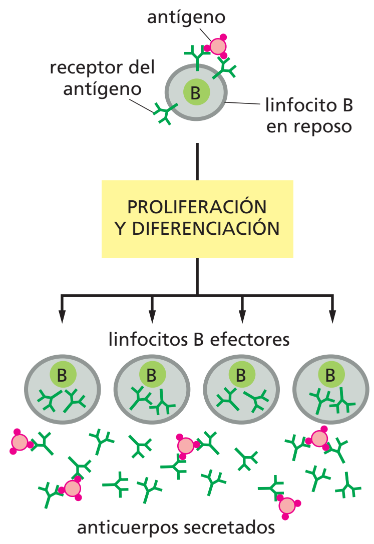


Figura 25–17 Anticuerpos unidos a la membrana o secretados producidos por un clon de linfocitos B. Cuando un antígeno (ayudado por un linfocito T colaborador –no se muestra) se une y, en consecuencia, activa a un linfocito B virgen o de memoria, éste prolifera y se diferencia en células efectoras. Estos linfocitos efectores producen y secretan anticuerpos con un solo tipo de lugar de unión al antígeno, el mismo que portaban los anticuerpos unidos a membrana que actuaban como receptores del antígeno.

Los linfocitos B producen anticuerpos tanto en forma de receptores de antígeno de superficie celular como de proteínas secretadas

Todas las moléculas de anticuerpo producidas por cada linfocito B tienen el mismo lugar de unión para el antígeno. Los primeros anticuerpos producidos por un linfocito B recién formado no se secretan, sino que quedan insertados en la membrana plasmática, donde actúan como receptores para el antígeno. Cada linfocito B tiene aproximadamente 10^5 receptores de este tipo en la membrana plasmática. Como trataremos más adelante, cada uno de estos receptores se halla asociado de forma estable a un complejo proteico transmembrana que activa vías de señalización intracelular en respuesta a la unión del antígeno al receptor.

Cada clon de linfocitos B produce una sola clase de anticuerpo, con un único lugar de unión al antígeno. Cuando un linfocito virgen o un linfocito B de memoria es activado por un antígeno (con la ayuda de los linfocitos T colaboradores), dicho linfocito prolifera y se diferencia en una célula efectora secretora de anticuerpos. Dichas células efectoras producen y secretan grandes cantidades de anticuerpos solubles (no unidos a la membrana) que tienen el mismo lugar de unión al antígeno que el del anticuerpo de la superficie celular que inicialmente sirvió de receptor para el antígeno (**Figura 25–17**). Los linfocitos B efectores pueden comenzar a secretar anticuerpos mientras aún son linfocitos pequeños, pero el estadio final de su maduración es el de una gran célula plasmática (véase Figura 25–7B), que secreta continuamente anticuerpos al extraordinario ritmo de unas 5000 moléculas por segundo. Pese a que la mayoría de las células plasmáticas mueren al cabo de varios días, algunas sobreviven en la médula ósea roja durante meses o años y continúan secretando anticuerpos a la sangre, colaborando en la protección a largo plazo contra el patógeno que estimuló su producción.

Un anticuerpo típico tiene dos lugares idénticos de unión al antígeno

Las moléculas más sencillas de anticuerpo tienen forma de Y con dos lugares idénticos de unión al antígeno, uno en cada punta de los dos brazos de la Y (**Figura 25–18**). Debido a estos dos lugares de unión al antígeno, se las denomina *bivalentes*. Cuando las moléculas de antígeno tienen tres o más determinantes antigénicos, las moléculas de anticuerpo bivalentes pueden establecer enlaces cruzados entre moléculas de antígeno y formar como resultado amplias redes (**Figura 25–19**), que podrán ser fagocitadas y degradadas rápidamente por los macrófagos. La eficiencia de la unión del antígeno y la formación de enlaces cruzados se incrementa de forma considerable por la presencia en los anticuerpos de una *región bisagra* flexible, que permite variar la distancia entre los dos lugares de unión al antígeno (**Figura 25–20**).

El efecto protector de los anticuerpos no se debe sólo a su capacidad de unir y fijar el antígeno. La cola de la molécula en forma de Y participa en muchas otras actividades de los anticuerpos. Más adelante se explicará que diferentes anticuerpos con lugares idénticos de unión al antígeno pueden tener uno cualquiera de los diferentes tipos de cola, cada uno de los cuales confiere al anticuerpo propiedades funcionales distintas, como por ejemplo la capacidad de activar el complemento, unirse a células fagocitarias o atravesar la placenta desde la madre hasta el feto.

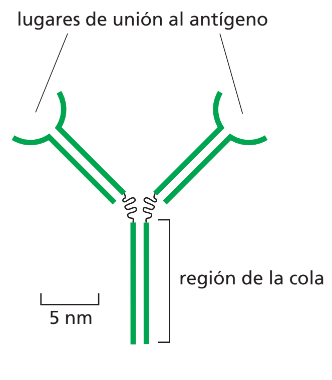


Figura 25–18 Esquema de una molécula de anticuerpo. Obsérvese que sus dos lugares de unión al antígeno son idénticos.

Una molécula de anticuerpo está compuesta por cadenas pesadas y cadenas ligeras

La unidad estructural básica de una molécula de anticuerpo consta de cuatro cadenas polipeptídicas, dos **cadenas ligeras (L)** (*light*) idénticas (cada una de ellas de unos 220 aminoáci-

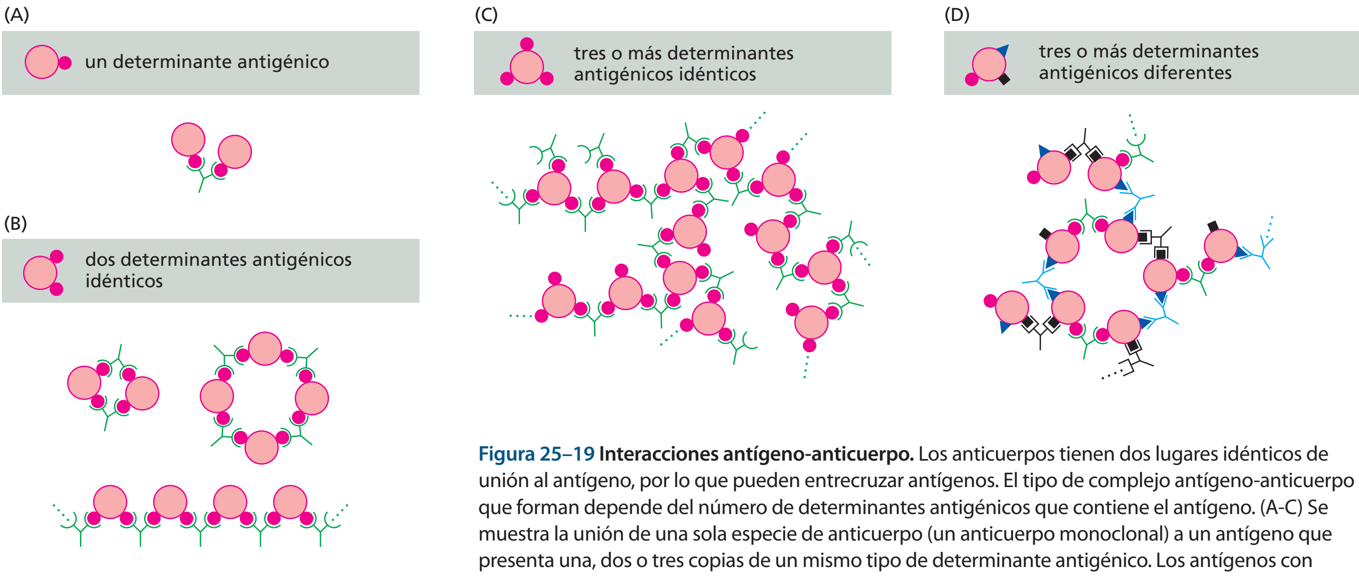


Figura 25–19 Interacciones antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos tienen dos lugares idénticos de unión al antígeno, por lo que pueden entrecruzar antígenos. El tipo de complejo antígeno-anticuerpo que forman depende del número de determinantes antigénicos que contiene el antígeno. (A-C) Se muestra la unión de una sola especie de anticuerpo (un anticuerpo monoclonal) a un antígeno que presenta una, dos o tres copias de un mismo tipo de determinante antigénico. Los antígenos con dos determinantes antigénicos idénticos pueden formar pequeños complejos circulares o cadenas lineales con los anticuerpos, mientras que los antígenos con tres o más determinantes antigénicos idénticos pueden formar grandes redes tridimensionales que, en solución, precipitan rápidamente. (D) La mayoría de antígenos presentan diversos determinantes antigénicos (véase Figura 25–29A) y los distintos anticuerpos que reconocen cada uno de estos determinantes cooperan en el entrecruzamiento del antígeno y forman grandes entramados tridimensionales.

dos) y dos **cadenas pesadas (H)** (***heavy***) idénticas (por lo general de unos 440 aminoácidos). Las cuatro cadenas se mantienen unidas entre sí gracias a una combinación de uniones no-covalentes y covalentes (enlaces disulfuro). La molécula está compuesta por dos mitades idénticas, cada una de ellas con el mismo lugar de unión al antígeno y, normalmente, tanto la cadena ligera como la cadena pesada cooperan entre sí formando la superficie de unión al antígeno (**Figura 25–21**).

Existen cinco clases diferentes de cadenas pesadas de anticuerpo, cada una de las cuales tiene propiedades biológicas distintas

En los mamíferos existen cinco *clases* diferentes de anticuerpos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, cada una de las cuales tiene su propia clase de cadena pesada: α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Las moléculas de IgA tienen cadenas α, las moléculas de IgG tienen cadenas γ, etc. Además, existen varias subclases de inmunoglobulinas IgG e IgA; por ejemplo: en humanos existen cuatro subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) constituidas, respectivamente, por las cadenas pesadas γ_1, γ_2 γ_3, y γ_4. Las diferentes cadenas pesadas proporcionan una conformación distintiva a las regiones de la bisagra y a la cola de los anticuerpos, confiriendo a cada clase (y subclase) unas propiedades características de cada una.

La **IgM**, cuya cadena pesada es μ, es la primera clase de anticuerpo que producen los linfocitos B en desarrollo, aunque posteriormente muchos linfocitos B pasan a producir otras clases de anticuerpo (como veremos más adelante). Los primeros linfocitos del linaje de linfocitos B que fabrica Ig son los *linfocitos pro-B*, que sólo fabricas cadenas μ. Éstos dan lugar a los *linfocitos pre-B*, en los que las cadenas μ se asocian con las denominadas *cadenas ligeras sustitutas* (que suplen a las cadenas ligeras genuinas) y se insertan en la membrana plasmática. La señalización a través de estos receptores de los linfocitos pre-B es necesaria para que la célula progrese en su desarrollo y llegue a producir las cadenas ligeras definitivas. Las nuevas cadenas ligeras se combinan con las cadenas μ y desplazan las cadenas ligeras sustitutas, formando las moléculas de IgM de cuatro cadenas (dos cadenas μ y dos cadenas ligeras). A continuación estas moléculas se insertan en la membrana plasmática, lugar en el que actúan como receptores de antígenos; en este momento, la célula recibe el nombre de *linfocito B virgen inmaduro*. Una vez abandona la médula ósea roja, el linfocito comienza a producir también moléculas de **IgD** asociadas a la membrana que presentan el mismo lugar de unión al antígeno que las moléculas de IgM. Ahora el linfocito se denomina *linfocito B*

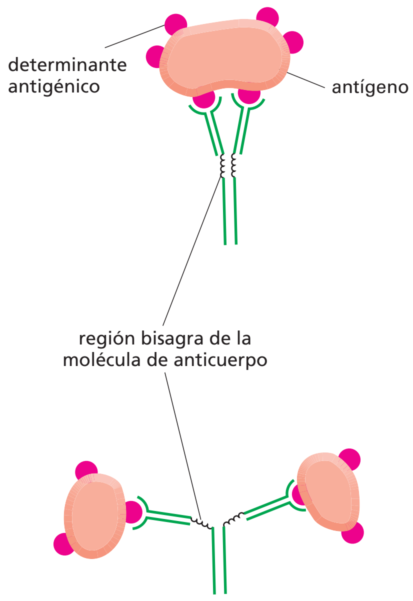


Figura 25–20 Región bisagra de una molécula de anticuerpo. Debido a su flexibilidad, la región bisagra incrementa la eficiencia de la unión al antígeno y de su entrecruzamiento.

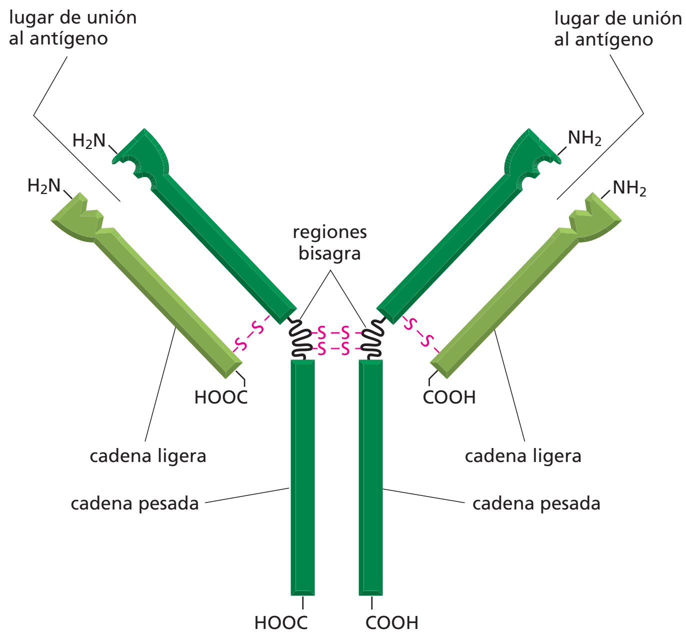


Figura 25–21 Esquema de una molécula bivalente de anticuerpo. Está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Los dos lugares de unión al antígeno son idénticos entre sí. Cada uno de ellos está formado por las regiones N-terminal de una cadena ligera y de una cadena pesada. Las dos cadenas pesadas forman también la cola y la región bisagra del anticuerpo.

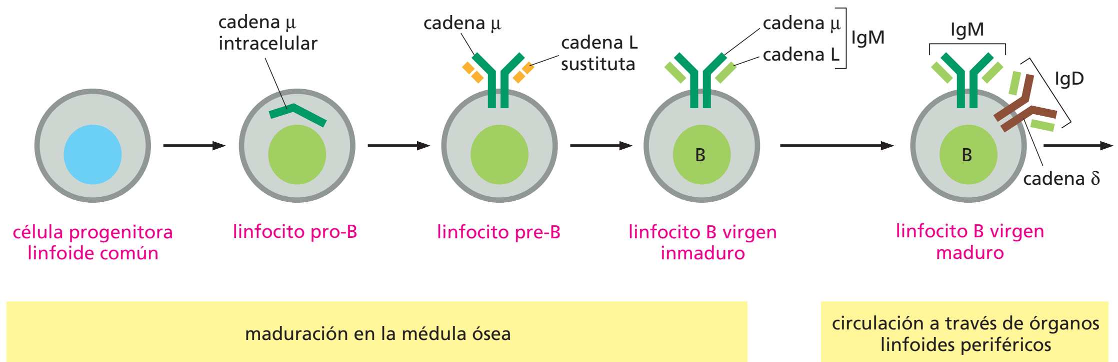
virgen maduro y es capaz de responder a antígenos extraños en los órganos linfoides periféricos (**Figura 25–22**).

La IgM no sólo es la primera clase de anticuerpo en aparecer en la superficie celular de los linfocitos B en desarrollo, sino que también es la principal clase de Ig secretada a la sangre en las fases iniciales de la respuesta primaria de anticuerpos frente a la primera exposición al antígeno. (A diferencia de las moléculas de IgM, las de IgD sólo se secretan en pequeñas cantidades y fundamentalmente actúan como receptores de antígenos en la superficie celular.) La forma de IgM secretada es un pentámero compuesto por cinco unidades de cuatro cadenas, de forma que tiene un total de diez lugares de unión para el antígeno. Cada pentámero contiene una copia de otra cadena polipeptídica denominada *cadena J* (***j****oining*; unión). Los linfocitos secretores de IgM producen la cadena J, que se inserta covalentemente entre dos regiones adyacentes de la región Fc (**Figura 25–23**).

Cuando un antígeno que presenta varios determinantes antigénicos idénticos (véase Figura 25–19) se une a una única molécula pentamérica de IgM secretada, cambia la estructura del pentámero, permitiéndole activar el sistema del complemento. Como se trató en el Capítulo 24, cuando el antígeno se localiza en la superficie de un microorganismo, la activación resultante del sistema del complemento puede marcar el microorganismo para ser fagocitado o matarlo directamente. Como se describirá más adelante, la activación del complemento puede incrementar en gran medida la respuesta inmunitaria contra un antígeno: por ejemplo, la unión de un componente del complemento activado a un complejo antígeno-anticuerpo, puede incrementar en más de mil veces la capacidad del antígeno para estimular la respuesta mediada por linfocitos B (véase la Figura 25–71A).

La clase principal de inmunoglobulinas que se hallan en la sangre es la de las **IgG**, que son monómeros de cuatro cadenas (véase la Figura 25–21) producidas en grandes cantida-

Figura 25–22 Principales etapas de la diferenciación de un linfocito B. Todas las etapas que se indican son independientes del antígeno. Los linfocitos pro-B fabrican cadenas μ, pero éstas permanecen en el retículo endoplasmático hasta que se fabrican las cadenas ligeras sustitutas. Aunque no se muestra en el esquema, todas las moléculas Ig de la membrana plasmática se hallan asociadas a proteínas transmembrana que transmiten señales al interior de la célula (véase Figura 25–70). Tras la activación por su antígeno extraño específico y por los linfocitos T colaboradores, los linfocitos B vírgenes maduros proliferan y se diferencian en células secretoras de anticuerpo o en células de memoria (no mostrado).



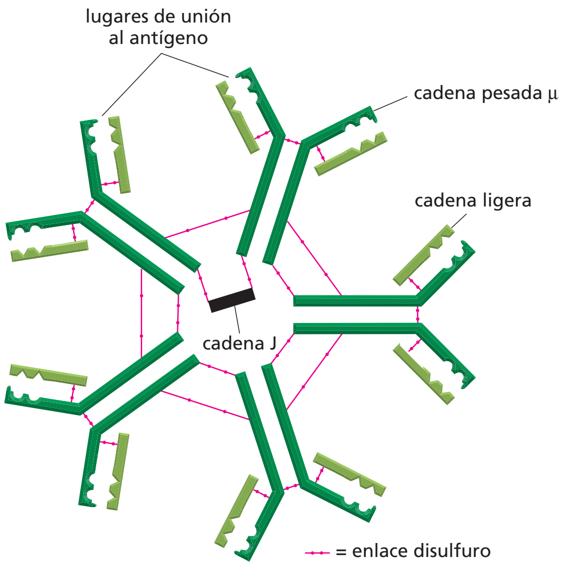


Figura 25–23 Molécula pentamérica de IgM. Las cinco unidades de cuatro cadenas están unidas entre sí por enlaces disulfuro (en *rojo*). Una sola cadena J, que presenta una estructura similar a la de un único dominio Ig (se describirá más adelante), está unida de manera covalente por enlaces disulfuro entre dos cadenas pesadas μ. La cadena J es necesaria para la formación del pentámero. La adición de cada una de las cuatro cadenas de las sucesivas unidades IgM requiere una cadena J que se desprende, excepto la última que queda retenida. Obsérvese que las moléculas IgM no presentan región bisagra.

des durante las respuestas de anticuerpos secundarias. Además de activar el sistema del complemento, la región Fc de una molécula de IgG se une a receptores específicos de macrófagos y de neutrófilos. Estas células fagocitarias, en gran parte mediante estos **receptores Fc** (llamados así porque las colas de los anticuerpos se denominan región *Fc*) unen, ingieren y destruyen a los microorganismos que han sido recubiertos por anticuerpos IgG producidos en respuesta a la infección (**Figura 25–24**).

Algunos subtipos de IgG son los únicos anticuerpos que pueden pasar de la madre al feto a través de la placenta. Las células de la placenta que se hallan en contacto con la sangre materna tienen receptores Fc que unen estas moléculas de IgG de transmisión hemática y median su paso hacia el feto. En primer lugar, los anticuerpos son captados de la sangre ma-

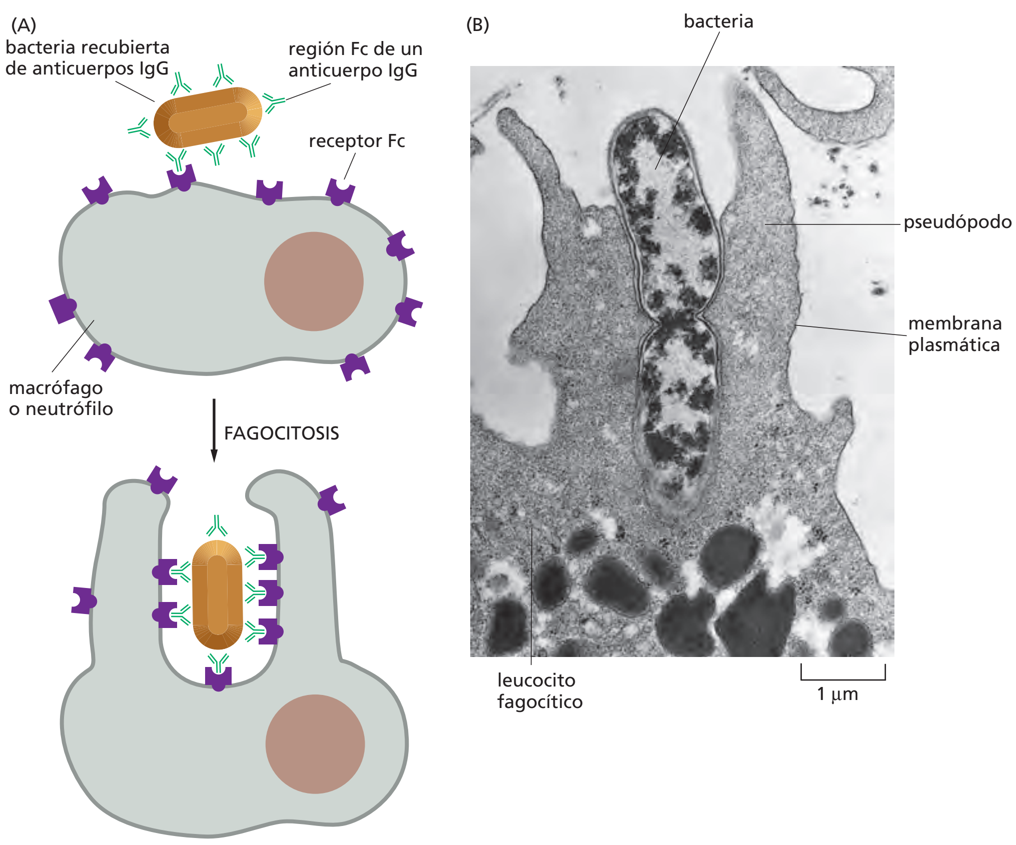


Figura 25–24 Fagocitosis activada por anticuerpo. (A) Una bacteria recubierta por anticuerpos IgG es eficazmente fagocitada por un macrófago o un neutrófilo, los cuales tienen receptores de superficie capaces de unirse a la región Fc de las moléculas de IgG. La unión de esta bacteria recubierta de anticuerpos a estos receptores Fc, activa el proceso de fagocitosis. La cola de una molécula de anticuerpo recibe el nombre de región Fc porque al digerir anticuerpos con papaína (enzima proteolítica) los fragmentos correspondientes a la región de la cola cristalizan fácilmente. (B) Electromicrografía de un neutrófilo fagocitando una bacteria recubierta de IgG que se está dividiendo. El proceso por el cual los anticuerpos (o el complemento) que recubren al patógeno incrementan la eficiencia con la que dicho patógeno es fagocitado se denomina *opsonización*. (B, por cortesía de Dorothy F. Bainton, de R.C. Williams, Jr. y H.H. Fudenberg, Phagocytic Mechanisms in Health and Disease. New York: Intercontinental Medical Book Corporation, 1971.)

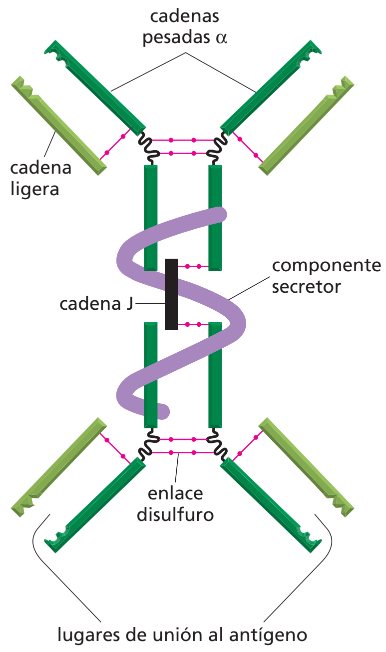


Figura 25–25 Esquema de una molécula dimérica de IgA presente en las secreciones. Además de los dos monómeros de IgA, existe una sola cadena J y una cadena polipeptídica adicional denominada *componente secretor*, el cual deriva de los receptores Fc (véase Figura 25–26) y parece proteger a las moléculas de IgA de la digestión por las enzimas proteolíticas de las secreciones.

terna mediante una endocitosis mediada por receptor; luego son transportados a través de la célula en el interior de vesículas y liberados por exocitosis a la sangre fetal (proceso denominado *transcitosis*; véase la Figura 25–26). Otras clases de anticuerpos no se unen a estos receptores Fc por lo que no pueden atravesar la placenta. La IgG se secreta en la leche materna y así es captada por el recién nacido desde el intestino hacia la sangre mediante transcitosis, proporcionándole protección contra las infecciones.

La **IgA** es la principal clase de anticuerpo de las secreciones (saliva, lágrimas, leche y secreciones respiratorias e intestinales). Las IgA de la sangre son monómeros de cuatro cadenas que se ensamblan en dímeros cuando se les añaden dos polipéptidos más antes de ser liberadas en las secreciones (**Figura 25–25**). Se transportan a través de las células de un epitelio de secreción, desde el medio extracelular hasta el material de secreción a través de transcitosis mediada por otro tipo de receptor Fc que es exclusivo de los epitelios de secreción (**Figura 25–26**). Este tipo de receptor Fc también puede transportar, aunque de modo menos eficiente, moléculas de IgM hasta las secreciones. De este modo, individuos con una deficiencia selectiva en IgA, el principal tipo de deficiencia de anticuerpos, se hallan sólo parcialmente afectados por este defecto.

La región Fc de las moléculas de **IgE**, que son monómeros de cuatro cadenas, se une con una afinidad extraordinariamente elevada ($K_a \sim 10^{10}$ litros/mol) a otra clase de receptores Fc. Estos receptores se localizan en la superficie de los *mastocitos* de los tejidos y de los *basófilos* de la sangre; a su vez, las moléculas de IgE unidas a ellos actúan como receptores para el antígeno. La unión del antígeno desencadena la secreción por parte de las células de una serie de citoquinas y aminas activas en términos biológicos, sobre todo *histamina* (**Figura 25–27**). La histamina provoca una dilatación y un aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos favoreciendo la penetración de leucocitos sanguíneos, anticuerpos y componentes del complemento en los lugares donde los mastocitos se han activado. Las aminas liberadas por mastocitos y basófilos son, en gran parte, las responsables de las manifestaciones clínicas de reacciones *alérgicas* como la fiebre del heno, el asma y la urticaria. Los mastocitos también secretan factores que atraen y activan a una clase especial de leucocitos denominados *eosinófilos*. Estas células también poseen receptores Fc que unen moléculas de IgE y pueden matar nematodos parásitos extracelulares, especialmente si dichos nematodos se hallan recubiertos de anticuerpos IgE.

Además de las cinco clases de cadenas pesadas presentes en las moléculas de anticuerpo, los vertebrados superiores tienen dos tipos de cadenas ligeras, **κ** y **λ**, que en apariencia

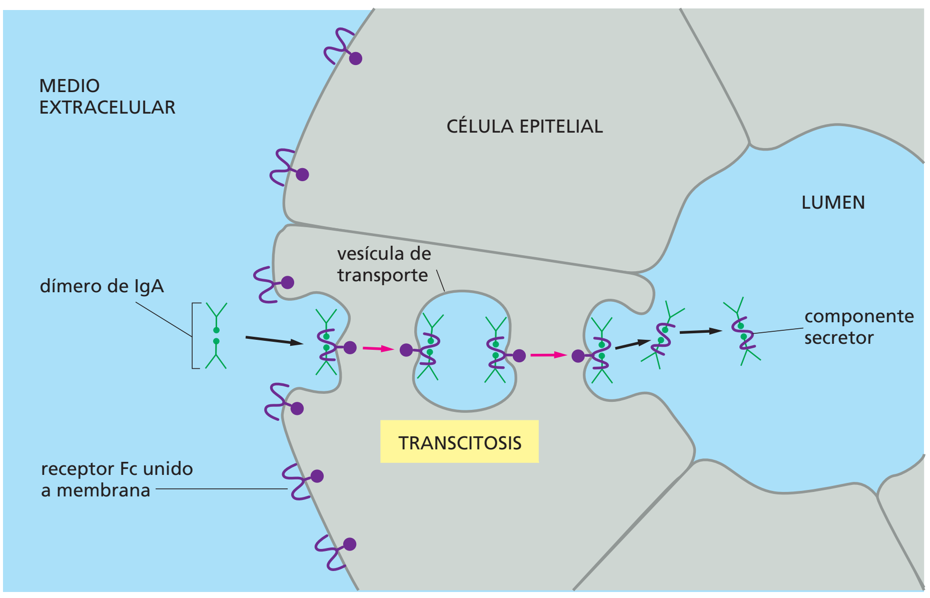


Figura 25–26 Mecanismo de transporte de una molécula dimérica de IgA a través de una célula epitelial. La molécula de IgA, a modo de dímero que contiene una cadena J, se une a una proteína receptora transmembrana de la superficie no luminal de la célula epitelial secretora. (La cadena J no se ha incluido en el esquema para simplificarlo.) Los complejos receptor-IgA son ingeridos por endocitosis mediada por receptor, transportados en vesículas a través del citoplasma de la célula epitelial y secretados por exocitosis en el lumen, en el lado opuesto de la célula. Cuando queda expuesto en el lumen, la parte del receptor Fc que está unido al dímero de IgA (el *componente secretor*), se escinde de su cola transmembrana y libera así un anticuerpo, como el mostrado en la Figura 25–25.

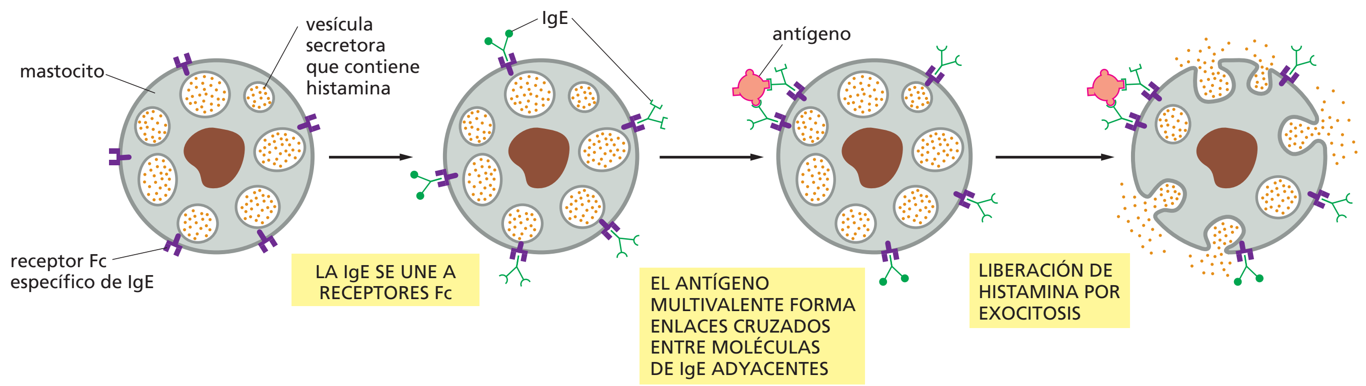


Figura 25–27 Función de las IgE en la secreción de histamina por los mastocitos. Un mastocito (o un basófilo) une moléculas de IgE secretadas por los linfocitos B activados. Los anticuerpos IgE solubles se unen a las proteínas receptoras Fc de la membrana plasmática del mastocito que reconoce específicamente la región Fc de estos anticuerpos. Las moléculas IgE unidas de este modo actúan como receptores de superficie celular para el antígeno. Así, a diferencia de los linfocitos B, cada mastocito (y basófilo) presenta un conjunto de anticuerpos en su membrana plasmática con una gran variedad de centros de unión al antígeno. Cuando una molécula de antígeno se une a estos anticuerpos IgE y los entrecruza, activa en el mastocito la liberación por exocitosis de histamina y de otros mediadores locales.

son funcionalmente indistinguibles. Cualquier tipo de cadena ligera puede estar asociado con cualquiera de las cadenas pesadas. Sin embargo, una determinada molécula de anticuerpo siempre contiene cadenas ligeras idénticas y cadenas pesadas idénticas; de este modo, por ejemplo, una molécula de IgG puede tener cadenas ligeras κ o λ pero no ambas a la vez. Como resultado de ello, los lugares de unión al antígeno de un determinado anticuerpo son siempre idénticos. Dicha simetría es crucial para la función de formación de enlaces cruzados de los anticuerpos secretados (véase la Figura 25–19).

Todos los tipos de anticuerpo pueden ser fabricados en la forma unida a la membrana, así como en una forma soluble secretada. Las dos formas difieren solamente en el extremo C-terminal de la cadena pesada. Las cadenas pesadas de las moléculas de anticuerpo unidas a la membrana tienen un extremo C-terminal transmembrana hidrofóbico, que las ancla en la bicapa lipídica de la membrana plasmática de los linfocitos B. Por el contrario, las cadenas pesadas de las moléculas de anticuerpo secretadas poseen un extremo C-terminal hidrofílico, que les permite salir de la célula. El intercambio entre los tipos de anticuerpo fabricados tiene lugar porque la activación de los linfocitos B por antígeno (y de los linfocitos T colaboradores) induce un cambio en el modo en que los transcritos de RNA de las cadenas H son producidos y procesados en el núcleo (véase la Figura 7–99).

La **Tabla 25–1** resume las características de las distintas clases de anticuerpos humanos.

La intensidad de las interacciones antígeno-anticuerpo depende tanto del número como de la afinidad de los lugares de unión al antígeno

La unión de un antígeno a un anticuerpo, como la unión de un sustrato a una enzima, es reversible. La intensidad de la interacción viene determinada por la suma de numerosas fuerzas relativamente débiles no-covalentes como los enlaces de hidrógeno, fuerzas hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals, e interacciones iónicas. Estas fuerzas débiles sólo son eficaces cuando la molécula de antígeno está lo bastante cerca como para permitir que alguno de sus átomos encaje en los huecos complementarios existentes en la superficie del anticuerpo. Las regiones complementarias de una unidad de anticuerpo de cuatro cadenas son

Tabla 25–1 Propiedades de las principales clases de anticuerpos en el ser humano

PROPIEDADES	CLASE DE ANTICUERPO				
	IgM	IgD	IgG	IgA	IgE
Cadenas pesadas	μ	δ	γ	α	ε
Cadenas ligeras	κ o λ	κ o λ	κ o λ	κ o λ	κ o λ
Número de unidades de cuatro cadenas	5	1	1	1 o 2	1
Porcentaje del total de Ig en sangre	10	<1	75	15	<1
Activa el complemento	++++	–	++	–	–
Atraviesa la placenta	–	–	+	–	–
Se une a macrófagos y a neutrófilos	–	–	+	–	–
Se une a los mastocitos y a los basófilos	–	–	–	–	+

sus dos lugares idénticos de unión al antígeno; la región correspondiente del antígeno es un *determinante antigénico* (**Figura 25–28**). La mayoría de las macromoléculas antigénicas presentan muchos determinantes antigénicos diferentes por lo que se denominan *multivalentes*; si dos o más de los determinantes son idénticos (como sucede en un polímero con estructura repetitiva), se habla de un antígeno *polivalente* (**Figura 25–29**).

La reacción reversible de unión entre un antígeno con un solo determinante antigénico (indicado como Ag) y un anticuerpo con un solo lugar de unión al antígeno (indicado como Ab: ***anti**body*; anticuerpo) se puede expresar de la siguiente manera:

$$Ag + Ab \leftrightarrow AgAb$$

El punto de equilibrio depende tanto de las concentraciones de Ag y de Ab como de la intensidad de su interacción. Evidentemente, a medida que aumente la concentración de Ag mayor será la fracción de Ab que se asociará con él. Por lo general, la fuerza de la interacción se expresa como la **constante de afinidad** (***K*****a**) (véase Figura 3–43), donde

$$K_a = [AgAb]/[Ag][Ab]$$

(los corchetes indican la concentración de cada componente en el equilibrio).

La constante de afinidad, también denominada constante de asociación, se puede determinar midiendo la concentración de Ag libre necesaria para ocupar la mitad de los lugares de unión al antígeno que posee el anticuerpo. Cuando la mitad de estos lugares están ocupados, $[AgAb] = [Ab]$ y $K_a = 1/[Ag]$. Por lo tanto, el valor inverso de la concentración de antígeno que da lugar a la mitad de la unión máxima es igual a la constante de afinidad del anticuerpo por el antígeno. El rango de valores oscila entre 5×10^4 y 10^{11} litros/mol.

La **afinidad** de un anticuerpo por un determinante antigénico refleja la fuerza de la unión de una sola copia del determinante antigénico a un solo lugar de unión del antígeno y es independiente del número de lugares de unión del antígeno. Sin embargo, cuando un antígeno polivalente, que transporta varias copias de un mismo determinante antigénico, se combina con un anticuerpo polivalente del tipo IgM (véase Figura 25–23), la fuerza de dicha unión se incrementa notablemente, ya que para que el antígeno y el anticuerpo puedan disociarse, se tienen que romper de forma simultánea todas las uniones antígeno-anticuerpo. Una molécula de IgG bivalente puede unirse a un antígeno polivalente con una fuerza por lo menos 100 veces mayor si en lugar de participar un solo lugar de unión participan ambos lugares de unión al antígeno. La fuerza total de la unión de un anticuerpo bivalente o polivalente a un antígeno polivalente se designa como la **avidez** de la interacción.

Si la afinidad de los lugares de unión de una molécula de IgG y de IgM es la misma, la molécula de IgM (con 10 lugares de unión) tendrá una avidez muy superior por un antígeno polivalente que una molécula de IgG (que tiene dos lugares de unión). Esta diferencia de avidez, a menudo de 10^4 veces o más, es importante debido a que generalmente los anticuerpos producidos en las primeras fases de una respuesta inmunitaria tienen afinidades muy inferiores a las que muestran los producidos más tarde. Debido a su elevada avidez total, las IgM –la principal clase de Ig producida en las primeras fases de las respuestas inmunitarias primarias– actúan de forma eficaz a pesar de que cada uno de sus lugares de unión presente una afinidad baja.

Hasta aquí se han tratado aspectos generales de la estructura y función de los anticuerpos. A continuación se describirán detalles de su estructura, elucidados mediante el análisis de su secuencia de aminoácidos y de su estructura tridimensional.

Tanto las cadenas ligeras como las pesadas de los anticuerpos presentan regiones constantes y regiones variables

La comparación de las secuencias de aminoácidos de distintas moléculas de anticuerpo reveló una notable característica con importantes implicaciones genéticas. Tanto las cadenas pesadas como las cadenas ligeras tienen una secuencia variable en su extremo amino terminal y una secuencia constante en su extremo carboxilo terminal. Por consiguiente, al comparar las secuencias de aminoácidos de muchas cadenas κ diferentes se observa que las mitades carboxilo terminal o son iguales o sólo muestran pequeñas diferencias, mientras que las mitades amino terminal son diferentes. Las cadenas ligeras tienen una **región constante** de aproximadamente 110 aminoácidos de largo y una **región variable** de este mismo tamaño. La región variable de las cadenas pesadas (en su extremo amino terminal) también tiene unos 110 aminoácidos de largo pero la región constante es tres o cuatro veces mayor

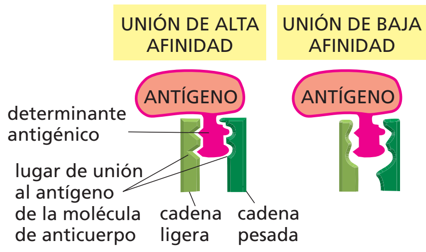


Figura 25–28 Unión del antígeno al anticuerpo. Este esquema muestra la interacción del determinante antigénico de una macromolécula con uno de los lugares de unión al antígeno de dos moléculas distintas de anticuerpo, una de alta y otra de baja afinidad. El determinante antigénico se mantiene en el lugar de unión gracias a la acción de fuerzas débiles no-covalentes; el lugar de mejor adaptación al antígeno es el que presenta mayor afinidad. Obsérvese que, normalmente, tanto las cadenas pesadas como las ligeras de la molécula de anticuerpo participan en la formación del lugar de unión al antígeno.

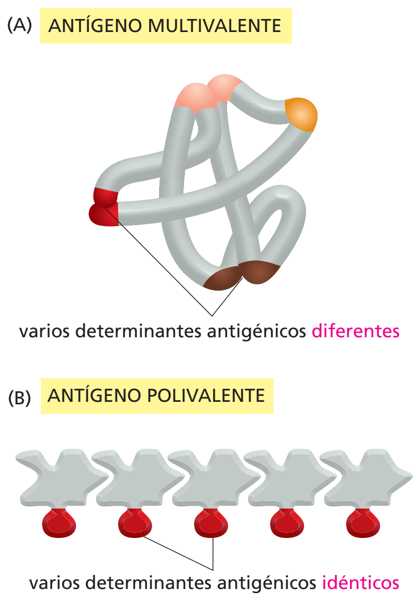


Figura 25–29 Moléculas con varios determinantes antigénicos. (A) Proteína globular que presenta varios determinantes antigénicos *diferentes*. Por lo general, distintas regiones de una cadena polipeptídica quedan juntas en la estructura plegada y forman cada uno de los determinantes antigénicos de la superficie de la proteína, como se indica para tres de los cuatro determinantes. (B) Una estructura polimérica con muchos determinantes antigénicos *idénticos*.

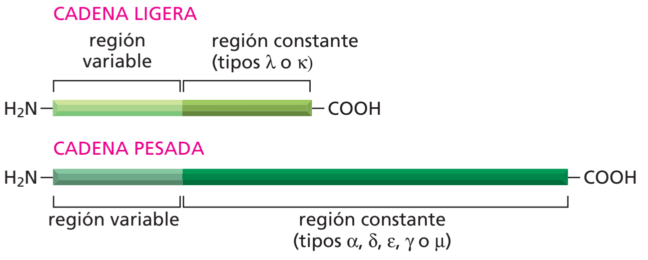


Figura 25–30 Regiones constantes y variables que tienen las cadenas de inmunoglobulina. Las regiones variables de las cadenas ligeras y las pesadas forman los lugares de unión al antígeno, mientras que las regiones constantes de las cadenas pesadas determinan el resto de las propiedades biológicas del anticuerpo.

(de 330 o 440 aminoácidos) dependiendo de la clase de inmunoglobulina de que se trate (**Figura 25–30**).

Los extremos amino terminales de las cadenas ligeras y de las cadenas pesadas son los que se unen entre sí formando el lugar de unión al antígeno (véase Figura 25–21); la variabilidad de sus secuencias de aminoácidos constituye la base estructural de la diversidad de estos lugares de unión. La mayor diversidad de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas tiene lugar en tres pequeñas **regiones hipervariables** en cada cadena; las zonas restantes de la región variable, conocidas como *regiones de sostén*, son relativamente constantes.

El lugar de unión al antígeno está formado por tan sólo los 5 a 10 aminoácidos de cada región hipervariable (**Figura 25–31**). En consecuencia, el tamaño del determinante antigénico reconocido por un anticuerpo es en comparación pequeño y puede ser tan sólo de unos 10 residuos de aminoácido localizados en la superficie de una proteína globular.

Las cadenas ligeras y las cadenas pesadas están formadas por dominios Ig repetitivos

Tanto las cadenas ligeras como las cadenas pesadas están formadas por segmentos repetitivos, cada uno de los cuales tiene una longitud de unos 110 aminoácidos y un enlace disulfuro intracatenario. Cada uno de estos segmentos repetitivos se pliega independientemente formando unidades funcionales compactas denominadas **dominios de inmunoglobulina (Ig)**. Como muestra la **Figura 25–32**, una cadena ligera consta de un dominio variable (V_L) y otro constante (C_L), equivalentes a las regiones variables y constantes indicadas en la parte superior de la Figura 25–30. Estos dominios V_L se emparejan con el dominio variable (V_H) y el primer dominio constante (C_H1) de la cadena pesada, formando la región de unión al antígeno. Los dominios C_L se emparejan con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1), y los restantes dominios constantes de la cadena pesada forman la región Fc, que determinará las propiedades biológicas del anticuerpo. La mayoría de las cadenas pesadas presentan tres dominios constantes (C_H1, C_H2 y C_H3) aunque las de las moléculas de IgM e IgE presentan cuatro.

La similitud existente entre los diferentes dominios sugiere que, probablemente, las cadenas de anticuerpo surgieron durante la evolución gracias a una serie de duplicaciones

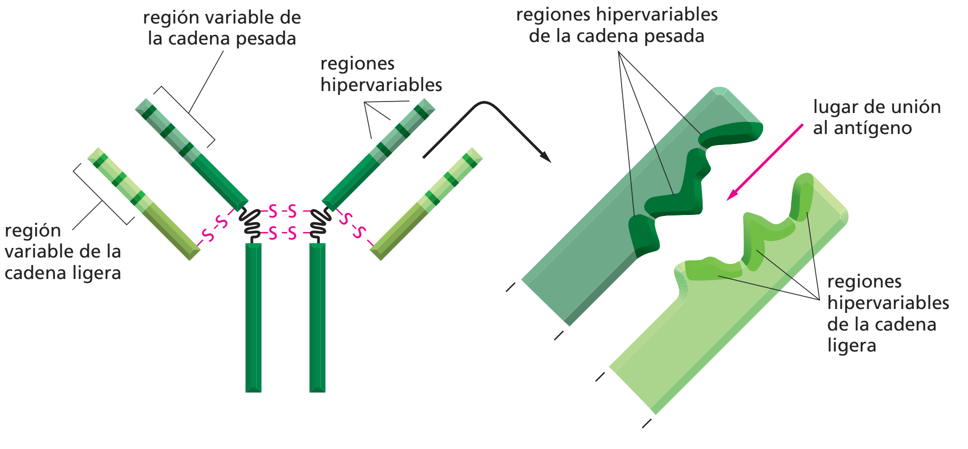


Figura 25–31 Regiones hipervariables de los anticuerpos. Esquema que ilustra cómo las tres regiones hipervariables de cada cadena ligera y pesada forman, en conjunto, el lugar de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo.

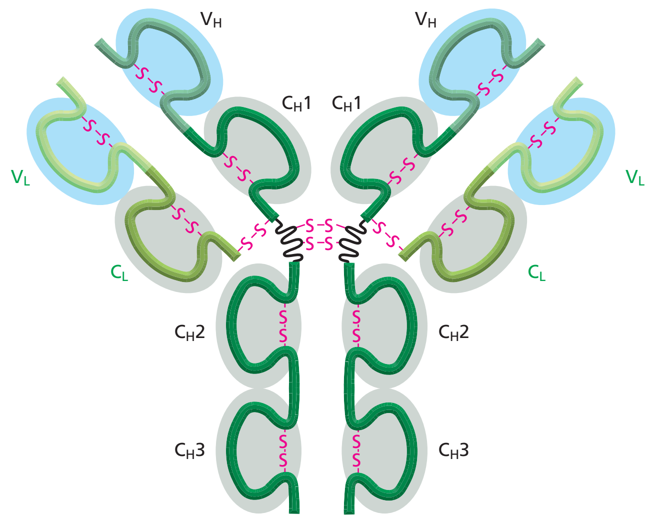


Figura 25–32 Dominios de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras y las pesadas de una molécula de anticuerpo están plegadas en dominios repetitivos similares. Las zonas variables (sombreadas en *azul*) de las cadenas ligeras y pesadas (V_L y V_H respectivamente) forman los lugares de unión al antígeno, mientras que los dominios constantes de las cadenas pesadas (principalmente C_H2 y C_H3) determinan el resto de las propiedades biológicas de la molécula. Las cadenas pesadas de los anticuerpos IgM e IgE no presentan región bisagra y tienen un domino constante adicional (C_H4). Las interacciones hidrofóbicas entre los dominios de cadenas adyacentes ayudan a mantener juntas las cadenas en la molécula de anticuerpo: por ejemplo, V_L se une a V_H, C_L a C_H1, etc. (véase Figura 25–34). Todos los anticuerpos presentan los dominios C_H2 glicosilados (no se muestra) y las cadenas de oligosacáridos varían de un anticuerpo a otro, y modifican sus propiedades biológicas.

génicas, empezando por un gen primordial que codificaba un único dominio de 110 aminoácidos de función desconocida. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que cada dominio de la región constante de una cadena pesada está codificado por una secuencia codificante aislada (exón) (**Figura 25–33**).

El lugar de unión al antígeno se halla formado por bucles hipervariables

La cristalografía con rayos X ha permitido estudiar tanto fragmentos de anticuerpo como algunas moléculas intactas. Estos estudios han revelado que la forma en la que están construidos los millones de lugares diferentes de unión al antígeno sigue un patrón estructural común.

Como se ilustra en la **Figura 25–34**, los dominios de las Ig tienen estructuras tridimensionales muy similares que consisten en dos láminas β unidas mediante un enlace disulfuro. Como describiremos más adelante otras muchas proteínas de la superficie de los linfocitos y de otras células, muchas de las cuales actúan como moléculas de adhesión intercelular (tratadas en el Capítulo 19), contienen dominios similares y, por tanto, son miembros de la *superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig)*, que es muy grande.

Los dominios variables de las moléculas de Ig presentan la característica propia de tener su conjunto particular de tres regiones hipervariables, que se disponen en tres *bucles hiper-*

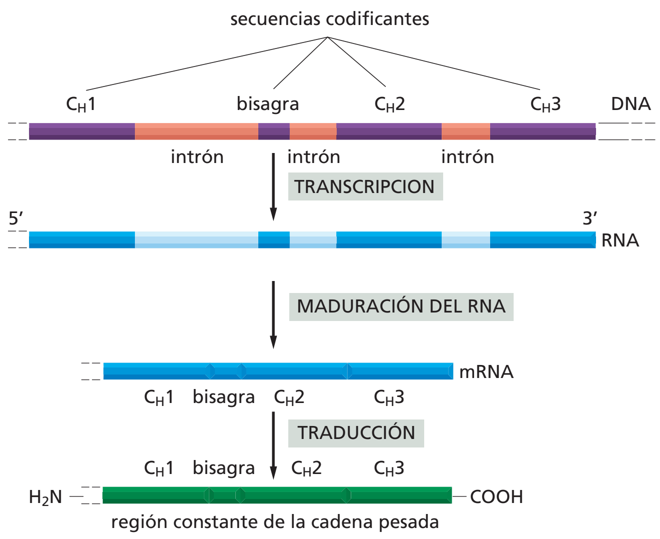


Figura 25–33 Organización de las secuencias de DNA que codifican la región constante de las cadenas pesadas de los anticuerpos, como es el caso de la IgG. Las secuencias codificantes (exones) de cada dominio y de la región bisagra están separadas por secuencias no-codificantes (intrones). Los intrones se eliminan mediante la maduración de los transcritos primarios de RNA, que da lugar al mRNA. Se cree que la presencia de intrones en el DNA puede haber facilitado las duplicaciones accidentales de segmentos de DNA que, en el transcurso de la evolución, han dado lugar a los genes de los anticuerpos (se trata en el Capítulo 4). Las secuencias de DNA y de RNA que codifican la región variable de la cadena pesada no se muestran en la figura.

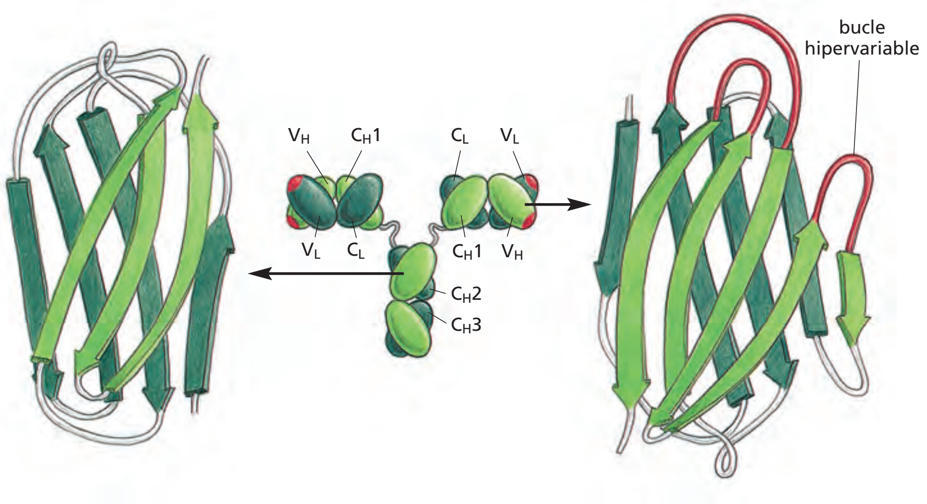


Figura 25–34 Estructura plegada de una molécula de anticuerpo IgG, basada en estudios de cristalografía mediante rayos X. <GCCG> En el centro se muestra la estructura de la proteína completa. A la izquierda, la estructura de un dominio constante y, a la derecha, la de uno variable. Ambos dominios están formados por dos láminas β unidas por un enlace disulfuro (no se muestra). Obsérvese que todas las regiones hipervariables (en *rojo*) forman bucles en el extremo más distal del dominio variable donde forman el lugar de unión al antígeno (véase también Figura 3-41).

variables (véase la Figura 25–34). Los bucles hipervariables de los dominios variables ligero y pesado se agrupan formando los lugares de unión al antígeno. El dominio variable de una molécula de anticuerpo consta de una estructura rígida altamente conservada, con unos bucles hipervariables unidos entre sí en uno de los extremos. Por lo tanto, es posible generar una enorme diversidad de lugares de unión al antígeno cambiando sólo la longitud y la secuencia de aminoácidos de los bucles hipervariables, sin que ello altere la estructura tridimensional global que es necesaria para la función del anticuerpo.

El análisis por rayos X de cristales de fragmentos de anticuerpo unidos a un determinante antigénico ha revelado con exactitud de qué forma cooperan, en determinados casos, los bucles hipervariables de los dominios variables ligero y pesado entre sí formando la región de unión al antígeno. Las dimensiones y la forma de cada lugar varían según la conformación de la cadena polipeptídica de los bucles hipervariables la cual, a su vez, viene determinada por la secuencia de aminoácidos de las cadenas laterales de los bucles. La forma de los lugares de unión depende del tipo de anticuerpo: invaginaciones, hendiduras, ondulaciones o incluso protuberancias (**Figura 25–35**). Los ligandos más pequeños tienden a unirse a profundas invaginaciones, mientras que los más grandes tienden a unirse a superficies más planas. Además, una vez unido el antígeno, los lugares de unión pueden alterar su forma de manera que el ligando queda mejor encajado.

Después de tratar la estructura y la función de los anticuerpos, podemos pasar a considerar la cuestión crucial que ha preocupado a los inmunólogos durante años: ¿cuáles son los mecanismos genéticos que permiten producir millones de moléculas de anticuerpo diferentes?

Resumen

Los anticuerpos defienden a los vertebrados de las infecciones, inactivando virus y toxinas bacterianas así como reclutando al sistema del complemento y a varios tipos de leucocitos que eliminan los patógenos invasores. Una molécula de anticuerpo característica tiene forma de Y, con dos lugares de unión al antígeno idénticos en sus extremos y con lugares de unión al complemento y a diversos receptores de la superficie celular en el pie de la Y.

Cada clon de linfocitos B produce moléculas de anticuerpo con un lugar de unión al antígeno específico. En un principio, durante el desarrollo de los linfocitos B en la médula ósea, las moléculas de anticuerpo son insertadas en la membrana plasmática, donde actúan como receptores para los antígenos. En los órganos linfoides periféricos, la unión del antígeno a estos receptores junto con las señales coestimuladoras producidas por los linfocitos T colaboradores activa la proliferación de los linfocitos B y su diferenciación a linfocitos de memoria o a linfocitos efectores productores de anticuerpos. Los linfocitos efectores secretan grandes cantidades de anticuerpos que tienen el mismo lugar de unión al antígeno que el de los anticuerpos unidos a la membrana.

Una molécula de anticuerpo típica está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas idénticas entre sí y dos cadenas ligeras también idénticas entre sí. Los lugares de unión al antígeno están formados por los dos tipos de cadenas, pesadas y ligeras. Existen cinco clases de anticuerpos (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), cada una de las cuales tiene una cadena H característica (α, δ, ε, γ y μ, respectivamente). Las cadenas pesadas también forman la cola de la molécula de an-

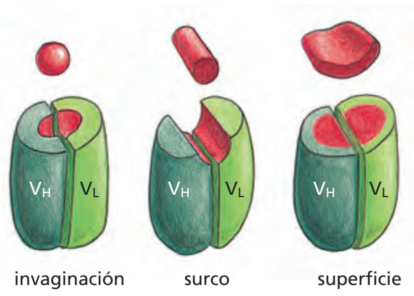


Figura 25–35 Variedad de lugares de unión al antígeno en los anticuerpos. Los bucles hipervariables de diferentes dominios V_L y V_H pueden combinarse entre sí y formar una gran variedad de superficies de unión. Los determinantes antigénicos y los lugares de unión al antígeno de los anticuerpos aparecen en *rojo*. Sólo se muestra un lugar de unión al antígeno por cada anticuerpo.

ticuerpo (región Fc), la cual determina a qué proteínas se unirá el anticuerpo y, por consiguiente, cuáles serán las propiedades biológicas de cada una de las clases de anticuerpo. Cualquiera de los dos tipos de cadena ligera (κ o λ) puede asociarse con cualquier clase de cadena pesada. Sin embargo, parece que el tipo de cadena ligera no tiene influencia sobre las propiedades del anticuerpo, excepto sobre la especificidad por el antígeno.

Tanto las cadenas ligeras como las pesadas constan de diferentes dominios Ig: estructuras β de unos 110 aminoácidos con plegamientos. Una cadena ligera tienen un dominio variable (V_L) y uno constante (C_L), mientras que una cadena pesada tiene una región variable (V_H) y tres o cuatro regiones constantes (C_H). La variación de la secuencia de aminoácidos en las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas está concentrada en pequeñas regiones hipervariables. Éstas sobresalen en un extremo de estos dominios formando bucles que constituyen el lugar de unión al antígeno.

GENERACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE LOS ANTICUERPOS

El organismo humano puede producir probablemente más de 10^{12} moléculas diferentes de anticuerpos, que constituyen el **repertorio primario de anticuerpos**, preinmune, incluso en ausencia de estimulación por antígenos. El repertorio primario está formado por anticuerpos de la clase IgM e IgD y es, según parece, lo bastante amplio como para asegurar que siempre haya un lugar de unión que encaje con cualquier determinante antigénico potencial, aunque esta unión sea de baja afinidad. (Los lugares de unión al antígeno de muchos anticuerpos pueden reaccionar de manera cruzada con otros determinantes antigénicos relacionados aunque diferentes, lo que hace que la fuerza defensiva del anticuerpo primario sea aún mayor.)

Los linfocitos B (y los linfocitos T colaboradores) tras ser estimulados por el antígeno, pueden cambiar su producción de fabricar IgM e IgD a fabricar otra clase de anticuerpos; este proceso se denomina *cambio de clase*. Además, la afinidad de estos anticuerpos por su antígeno incrementa progresivamente con el tiempo durante un proceso denominado *maduración de la afinidad*. Así, la estimulación por el antígeno genera un **repertorio secundario de anticuerpos**, con una diversidad enormemente incrementada de ambas clases de Ig y de lugares de unión al antígeno.

Los anticuerpos son proteínas y las proteínas están codificadas por genes. Por consiguiente, la diversidad de los anticuerpos plantea un problema genético particular: ¿cómo puede un animal producir más anticuerpos que genes hay en su genoma? (El genoma humano, por ejemplo, contiene sólo alrededor de 25.000 genes.) Este problema no es tan alarmante como podría parecer a primera vista. Debido a que las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos se combinan formando el lugar de unión al antígeno, un animal con 1000 genes que codifiquen cadenas ligeras y 1000 genes que codifiquen cadenas pesadas podría combinar sus productos de 1000×1000 maneras diferentes formando 10^6 lugares de unión al antígeno distintos (a pesar de que en la realidad no todos los tipos de cadena ligera puede combinarse con cualquier cadena pesada formando un lugar de unión al antígeno). Sin embargo, existen mecanismos genéticos únicos que capacitan al sistema inmunitario adquirido para generar un número casi ilimitado tanto de cadenas ligeras como de cadenas pesadas diferentes de una forma muy económica.

No todos los vertebrados utilizan los mismos mecanismos genéticos para generar diversidad de anticuerpos e incluso existen diferencias importantes entre los mecanismos utilizados por diferentes mamíferos. A continuación se revisan los mecanismos utilizados por los ratones y los humanos, en los que la diversidad de anticuerpos se genera en dos etapas. En primer lugar, antes de la estimulación por el antígeno, los linfocitos B en desarrollo unen *segmentos génicos* separados de DNA generando los genes que codifican el repertorio primario de anticuerpos IgM e IgD de baja afinidad. En segundo lugar, tras la estimulación por el antígeno, dichos genes pueden sufrir dos cambios adicionales: mutaciones, que pueden aumentar la afinidad del lugar de unión al antígeno, y reordenaciones del DNA, que cambian la clase de anticuerpo fabricada. El conjunto de estos cambios genera el repertorio secundario de anticuerpos IgG, IgA e IgE de alta afinidad.

Esta sección se inicia con el estudio de los mecanismos que utilizan los linfocitos B para generar el repertorio primario de anticuerpos y después se describirán los mecanismos que utilizan para generar el repertorio secundario.

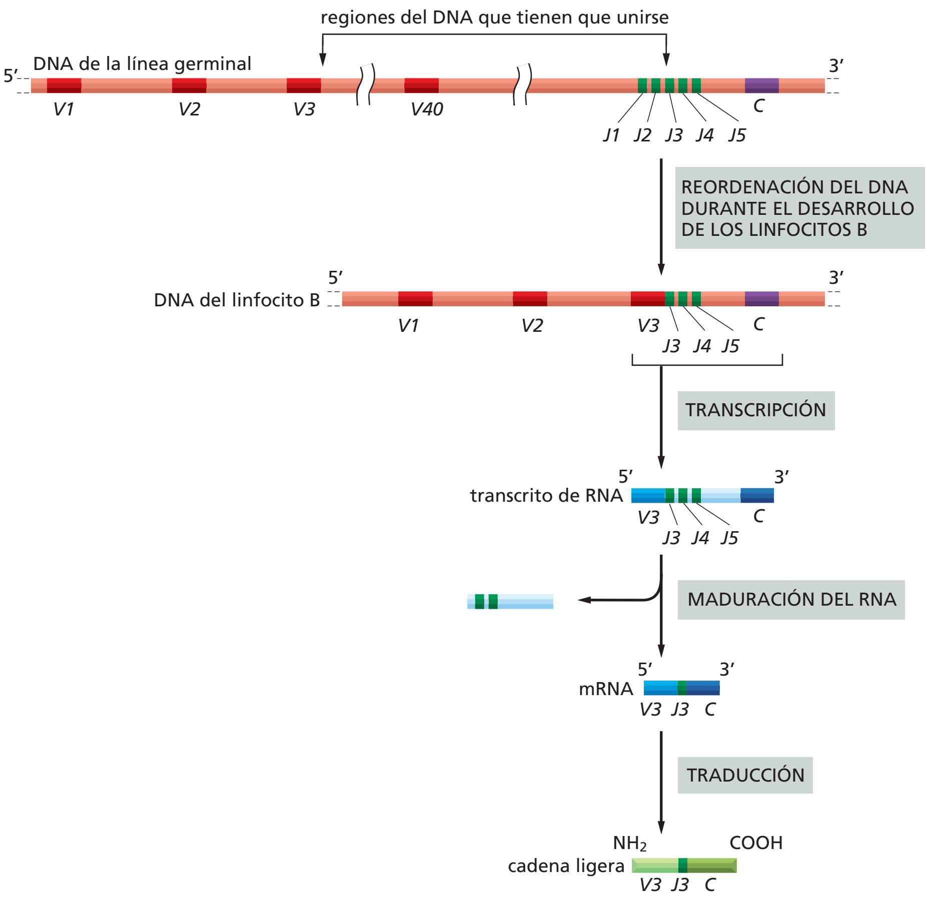


Figura 25–36 Proceso de unión *V-J* que participa en la producción de una cadena ligera κ humana. En el DNA de la "línea germinal" (en la que los genes de las inmunoglobulinas no se han reordenado y, en consecuencia, no se expresan), el grupo de los cinco segmentos génicos *J* está separado de la secuencia codificante de la región *C* por un corto intrón, y separado de los 40 genes *V*, por miles de pares de nucleótidos. Durante el desarrollo de un linfocito B, el segmento génico *V* elegido al azar (*V3* en este caso) se desplaza quedando exactamente junto a uno de los segmentos génicos *J* (*J3* en este caso). Las secuencias génicas *J* "sobrantes" (*J4* y *J5*) junto con el intrón se transcriben (junto con los segmentos génicos unidos *V3* y *J3* y el segmento codificante de la región *C*) y luego son eliminados durante la maduración del RNA, generando moléculas de mRNA en las que las secuencias *V3*, *J3* y *C* son contiguas. Entonces, estos mRNA se traducen a cadenas ligeras κ. Un segmento génico *J* codifica los aproximadamente 15 aminoácidos del extremo C-terminal de la región *V*, y una corta secuencia que contiene la unión de los segmentos *V-J* codifica la tercera región hipervariable de la cadena ligera, que es la zona más variable de la región V.

Durante el desarrollo de los linfocitos B, los genes de los anticuerpos se ensamblan a partir de segmentos génicos diferentes

Los ratones y los humanos generan su repertorio de anticuerpos ensamblando **segmentos génicos** separados durante el desarrollo de los linfocitos B. Cada tipo de cadena de anticuerpo –las cadenas κ ligeras, las cadenas λ ligeras y las cadenas pesadas– está codificado por un locus diferente situado en un cromosoma diferente. Cada locus contiene un gran número de segmentos génicos codificantes de la región V de la cadena de anticuerpo y uno o más segmentos génicos codificantes de la región C. Durante el desarrollo de un linfocito B en la médula ósea (o en el hígado fetal) se ensambla, mediante recombinación genética específica de lugar (estudiada en el Capítulo 5), una secuencia codificante completa para cada una de las dos cadenas de anticuerpo que tienen que sintetizarse. Además de reunir los segmentos génicos individuales del gen que codifica un anticuerpo, estas reordenaciones también activan la transcripción a partir del promotor del gen mediante cambios en las posiciones relativas de las secuencias activadoras y silenciadoras que actúan sobre el gen. Así, una cadena completa de anticuerpo sólo se puede sintetizar después de que se produzca una reordenación del DNA.

Cada una de las regiones V de una cadena ligera está codificada por una secuencia de DNA ensamblada a partir de dos fragmentos génicos: un **segmento génico *V*** largo y un segmento de *unión* corto, o **segmento génico *J*** (***j**oining*; no debe confundirse con la proteína *cadena J* –véase la Figura 25–23, codificada en otro lugar del genoma). La **Figura 25–36** ilustra la secuencia de procesos implicados en la producción de una cadena polipeptídica ligera κ a partir de sus segmentos génicos distintos. Cada región V de una cadena pesada se fabrica de modo similar, combinando segmentos génicos, incorporando, además, un *segmento de diversidad* o **segmento génico *D*** (**Figura 25–37**).

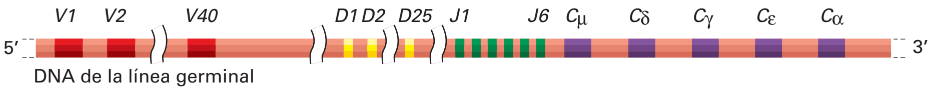


Figura 25–37 Locus de la cadena pesada en humanos. Hay 40 segmentos *V*, 25 *D*, 6 *J* y un grupo ordenado de secuencias codificantes de la región *C*. Cada uno de los conjuntos codifica una clase diferente de cadenas pesadas. El segmento *D* (y parte del segmento *J*) codifica los aminoácidos de la tercera región hipervariable, que es la parte más variable de la región *V* de la cadena pesada. Los mecanismos genéticos implicados en la producción de una cadena pesada son los mismos que los que se muestran en la Figura 25–36 para las cadenas ligeras, con la excepción de que en este caso se necesitan dos etapas de reordenación del DNA en lugar de una: primero, un segmento *D* se une a un segmento *J*, y luego un segmento *V* se une a los segmentos *DJ* reordenados. La figura no ha sido dibujada a escala: por ejemplo, la longitud total del locus de la cadena pesada supera las 2 megabases.

El elevado número de segmentos génicos *V*, *J* y *D* heredados, disponibles para codificar cadenas de anticuerpo, contribuye de manera sustancial, por sí mismo, a la diversidad de los anticuerpos y la combinación de estos segmentos (denominada *diversificación combinatoria*) incrementa ampliamente esa contribución. En humanos, por ejemplo, cualquiera de los 40 segmentos *V* del locus de la cadena ligera κ puede unirse a cualquiera de los 5 segmentos *J* (véase Figura 25–36), de forma que dicho locus puede codificar al menos 200 (40×5) regiones V diferentes de cadena κ. De forma similar, cualquiera de los 40 segmentos *V* del locus de la cadena pesada puede unirse a cualquiera de los 25 segmentos *D* y a cualquiera de los 6 segmentos *J*, pudiendo codificar como mínimo 6000 ($40 \times 25 \times 6$) regiones V diferentes de cadena pesada.

La diversificación combinatoria resultante del ensamblaje, en diferentes combinaciones, de los segmentos génicos *V*, *J* y *D* heredados, que acabamos de describir, constituye un importante mecanismo de diversificación de los lugares de unión al antígeno de los anticuerpos. Se estima que únicamente mediante este mecanismo, denominado *recombinación V(D)J*, un humano podría producir 320 regiones V_L diferentes (200 κ y 120 λ) y 6000 regiones V_H diferentes. En principio, estas regiones podrían luego combinarse entre sí produciendo $1{,}9 \times 10^6$ (320×6000) lugares diferentes de unión al antígeno. Además, como trataremos a continuación, el propio mecanismo de unión también incrementa de forma notable este número de posibilidades (probablemente en más de 10^8 veces) y, por tanto, el repertorio primario de anticuerpos es mayor que el número total de linfocitos B (alrededor de 10^{12}) de cualquier individuo de la especie humana.

La unión imprecisa de los segmentos génicos aumenta la diversidad de las regiones V

Durante el proceso de la **recombinación V(D)J**, la recombinación específica de lugar une segmentos génicos de anticuerpo para las secuencias codificantes funcionales de las regiones V_L y V_H. Cada segmento génico está flanqueado por secuencias de DNA conservadas que actúan como *secuencias señales de recombinación* en el proceso de unión, de forma que se asegura que sólo se recombinen los segmentos génicos adecuados. Así, por ejemplo, un segmento *V* de cadena ligera siempre se unirá a un segmento *J* y no a otro segmento *V*. Esta unión está mediada por un complejo enzimático, denominado *recombinasa V(D)J*, del que forman parte dos proteínas específicas de los linfocitos en desarrollo, así como por enzimas reparadoras del DNA dañado presentes en cualquiera de nuestras células.

Las proteínas linfocitarias específicas de la recombinasa V(D)J, RAG1 y RAG2, están codificadas por dos genes estrechamente ligados denominados *Rag-1* y *Rag-2* (***r****ecombination* ***a****ctivating* ***g****enes*; genes promotores de la recombinación). Para llevar a cabo la unión V(D)J, las dos proteínas se asocian entre sí formando un complejo (denominado **RAG**), que actúa como una endonucleasa introduciendo discontinuidades en la doble cadena entre los segmentos génicos que deben unirse y sus secuencias señal de recombinación flanqueantes. Entonces, RAG inicia el proceso de unión y recluta enzimas implicadas en la reparación del DNA de doble cadena que tiene lugar en todas las células (**Figura 25–38**). Los ratones o los humanos deficientes en alguno de los dos genes *Rag* o en la combinación de extremos no homólogos son muy susceptibles a las infecciones, ya que son incapaces de llevar a cabo la recombinación V(D)J y, en consecuencia, no disponen de linfocitos B o T funcionales, situación denominada *inmunodeficiencia combinada grave* (*SCID*: ***s****evere* ***c****ombined* ***i****mmuno****de****ficiency*). (Como se describirá más adelante, los linfocitos T utilizan la misma recombinasa V(D)J para ensamblar los fragmentos génicos que codifican sus receptores específicos de antígeno.)

A menudo, durante la combinación de los segmentos génicos del anticuerpo (y del receptor del linfocito T), al igual que ocurre en la combinación de extremos no homólogos (véase Figura 5–51A), se pierde un número variable de nucleótidos de los extremos de los segmentos a recombinar, pudiéndose insertar de manera aleatoria uno o más nucleótidos. Esta pérdida y ganancia aleatorias de nucleótidos en los lugares de unión, denominada **diversificación de la unión**, aumenta en gran medida la diversidad de las secuencias codificantes de la región V generadas por recombinación V(D)J, especialmente en la tercera región hipervariable. Este incremento en la diversificación tiene un precio, ya que en muchas ocasiones producirá un cambio de pauta de lectura originando un gen no funcional. Alrededor de dos de cada tres reordenaciones resultan "improductivas", de modo que muchos de los linfocitos B en desarrollo nunca llegan a producir moléculas funcionales de anticuerpo y mueren en la médula ósea.

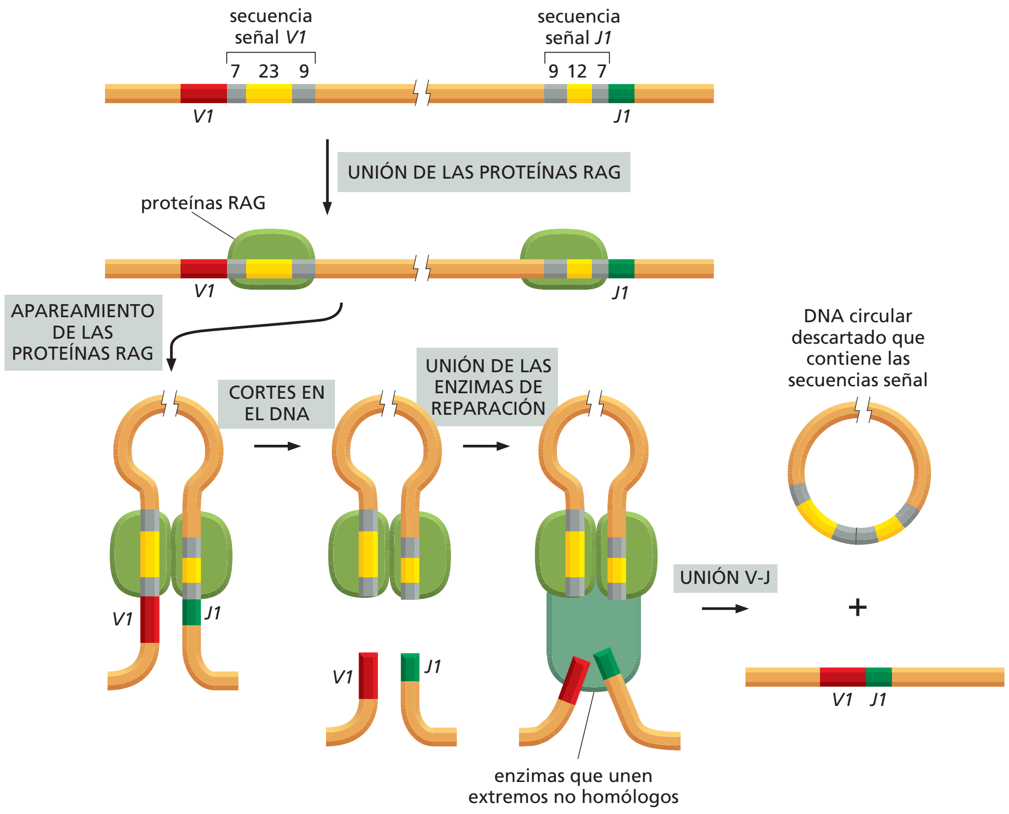


Figura 25–38 El papel de las secuencias señal de recombinación en la agrupación de segmentos génicos mediada por RAG. En el ejemplo, V1 se une a J1 en un locus de cadena ligera. En la recombinación V(D)J se hallan implicadas dos tipos de secuencias señal de DNA: ambas tienen la misma secuencia de 7 pares de bases (pb) en un extremo y la misma secuencia de 9 pb en el otro extremo, pero en uno de los tipos los extremos se hallan separados por 12 pb mientras que en el otro tipo el espaciador es de 23 pb. Cuando una proteína RAG se une al espaciador de 12 pb y otra al de 23 pb y ambas proteínas RAG se unen entre sí, las dos secuencias señal quedan yuxtapuestas. El complejo RAG escinde las dos secuencias señal por sus extremos de 7 pb y las enzimas de reparación del DNA unen entre sí los segmentos V1 y J1 escindidos. Las secuencias señal también se unen entre sí y se eliminan como una pequeña secuencia de DNA circular que contiene el DNA localizado inicialmente entre V1 y J1.

El mismo proceso y las mismas secuencias señal se utilizan para unir los segmentos V, D y J de las cadenas pesadas. La reordenación de las secuencias señal descrita asegura la recombinación de los segmentos génicos adecuados.

Los linfocitos B que generan moléculas funcionales de anticuerpo que se unen con fuerza a antígenos propios en la médula ósea roja son peligrosos. Dichos linfocitos B mantienen la expresión de proteínas RAG y pueden llevar a cabo una segunda ronda de reordenaciones V(D)J en el locus de la cadena ligera (normalmente el locus κ) que conllevará un cambio en la especificidad del anticuerpo de superficie celular que producen; se trata del proceso conocido como **edición de receptores**. Para incrementar aún más la protección, los linfocitos B autorreactivos que tras este proceso no hayan cambiado su especificidad son eliminados mediante el proceso de eliminación clonal (véase Figura 25–13).

El control de la recombinación V(D)J asegura la monoespecificidad de los linfocitos B

Los linfocitos B son *monoespecíficos*. Es decir, todos los anticuerpos generados por un mismo linfocito B tienen idénticos lugares de unión al antígeno. Este hecho permite a los anticuerpos establecer uniones cruzadas con los antígenos y generar grandes agregados que facilitan la eliminación de dichos antígenos (véase Figura 25–19). Además, un linfocito B activado secreta anticuerpos, cuya especificidad es la misma que la de los anticuerpos receptores unidos a la membrana, garantizando así la especificidad de las respuestas de anticuerpo (véase Figura 25–17).

Para conseguir esta monoespecificidad, cada linfocito B tiene que fabricar un sólo tipo de región V_L y un sólo tipo de región V_H. Puesto que los linfocitos B, al igual que otras células somáticas, son diploides, cada célula tiene seis loci codificantes de cadenas de anticuerpo: dos loci para las cadenas pesadas (uno de cada progenitor) y cuatro loci para las cadenas ligeras (un κ y un λ de cada progenitor). Si las reordenaciones de DNA tienen lugar de modo independiente en cada locus de cadena pesada y en cada locus de cadena ligera, un único linfocito podría fabricar hasta ocho anticuerpos diferentes, cada uno de ellos con un lugar diferente de unión al antígeno.

Sin embargo, cada linfocito B sólo utiliza dos de los seis loci de anticuerpo: uno de los dos loci de cadena pesada y uno de los cuatro de cadena ligera. Así, cada linfocito B tiene que escoger no sólo entre sus loci κ y λ de cadena ligera, sino también entre los loci maternos y paternos de las cadenas ligeras y pesadas. Esta segunda elección se denomina **exclusión**

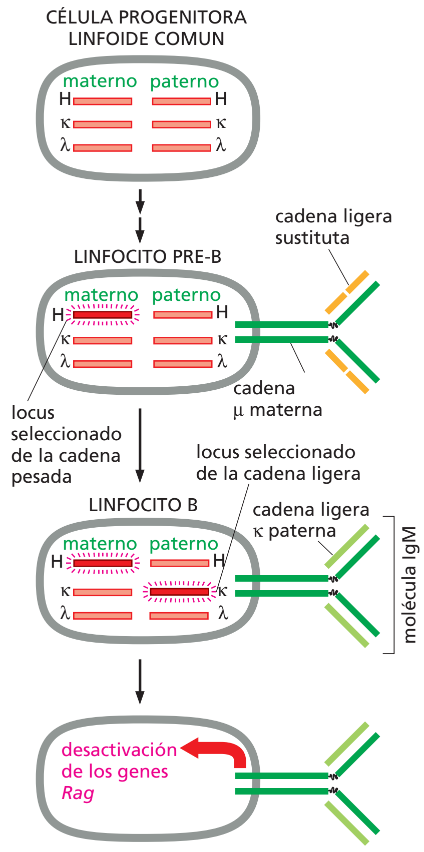


Figura 25–39 Selección de los loci de anticuerpos en el desarrollo de un linfocito B en la médula ósea. Para producir anticuerpos con un solo tipo de lugar de unión al antígeno, un linfocito B en desarrollo utiliza un solo locus de cadena L y uno solo de cadena H. Se cree que la selección entre los loci materno y paterno es al azar. Sin embargo, en el linfocito B en desarrollo, el ensamblaje de las secuencias codificantes de región V sigue un orden preciso, un segmento cada vez, empezando habitualmente con el locus de la cadena H. En este locus, los segmentos *D* se unen primero a los segmentos J_H en ambos cromosomas, paterno y materno; a continuación, se produce la unión V_H a DJ_H en uno de estos cromosomas (no se muestra). Si esta reordenación da lugar a un gen funcional, se producen cadenas μ completas (que siempre son el primer tipo de cadena H producido) que se expresarán en la superficie celular en asociación con las cadenas ligeras sustitutas (véase Figura 25–22). Entonces el linfocito bloquea cualquier otra posible reordenación de los segmentos génicos de la región V_H e inicia la reordenación de V_L. La reordenación V_L suele producirse en primer lugar en el locus κ, y si ésta falla, tendrá lugar en otros loci κ o en los λ. Si la unión V_L a J_L produce una cadena ligera, ésta se combina con las cadenas μ ya existentes y forman una molécula de anticuerpo IgM, que se insertará en la membrana plasmática. Los receptores de superficie celular del tipo IgM capacitan al linfocito B recién formado a que reciba señales extracelulares que impidan posteriores recombinaciones V(D)J, inhibiendo la expresión de los genes *Rag-1* y *Rag-2*.

Si un linfocito B en desarrollo produce un receptor con elevada afinidad por un antígeno propio, la expresión del gen *Rag* se mantiene y el linfocito sufre nuevas recombinaciones V(D)J en el locus de la cadena ligera (proceso denominado edición de receptores; véase Figura 25–13), cambiando, así, la especificidad del receptor (no se muestra). Si una célula no puede ensamblar una región V_H funcional y una región V_L también funcional será incapaz de producir anticuerpos y morirá por apoptosis (no se muestra).

alélica. Esta exclusión alélica también ocurre en la expresión de algunos genes que codifican los receptores de linfocito T y en genes que codifican los receptores del olfato en la mucosa nasal (estudiados en el Capítulo 15). Sin embargo, en la mayoría de los casos de proteínas codificadas por genes autosómicos, en cada célula las copias maternas y paternas de los genes se expresan aproximadamente igual.

Durante el desarrollo de los linfocitos B, la exclusión alélica y la elección entre las cadenas ligeras κ y λ dependen de una autorregulación negativa del proceso de la recombinación V(D)J. La reordenación funcional de un locus de anticuerpo suprime las reordenaciones en los demás loci que codifican el mismo tipo de cadena de anticuerpo (**Figura 25–39**). Así por ejemplo, en los clones de linfocitos B obtenidos de ratones transgénicos que expresan un gen de cadena μ reordenado, normalmente la reordenación de todos los genes endógenos de cadena pesada queda suprimida. Resultados similares a éstos se han obtenido también para las cadenas ligeras. Sin embargo, la supresión no se produce si el producto de la reordenación génica no genera al final un receptor que se inserte en la membrana plasmática. Así, se ha propuesto que la supresión de posteriores reordenaciones tiene lugar como consecuencia del proceso de ensamblaje del receptor en sí mismo o por señales extracelulares que actúan sobre dicho receptor.

Aunque no se conocen diferencias biológicas entre las regiones constantes de las cadenas ligeras κ y λ, la presencia de dos loci diferentes de las regiones variables de las cadenas ligeras representa una ventaja. Esto incrementa la probabilidad de que un linfocito pre-B que haya ensamblado con éxito una secuencia codificante de la región V_H, también ensamble con éxito una secuencia codificante de la región V_L y se convierta en linfocito B. Esta probabilidad es aún mayor ya que antes de que un linfocito pre-B en desarrollo fabrique cadenas ligeras normales, ya fabrica cadenas ligeras sustitutas (véase Figura 25–22), que se ensamblan con cadenas pesadas μ. Los receptores resultantes se expresan en la superficie celular y permiten la proliferación celular, generando grandes cantidades de células progenitoras algunas de las cuales producirán con éxito cadenas ligeras funcionales genuinas.

La formación de un linfocito B funcional es un proceso complejo y muy selectivo: finalmente todos los linfocitos B que no son capaces de producir moléculas de anticuerpo correctas, mueren por apoptosis.

Ahora el centro de atención se trasladará de los mecanismos responsables de la formación del repertorio primario de anticuerpos, antes de la estimulación por el antígeno, a los mecanismos responsables de generar el repertorio secundario de anticuerpos, tras la activación por el antígeno. Empezaremos por describir el mecanismo de tipo darwiniano por el que se incrementa la afinidad de los lugares de unión al antígeno por su antígeno específico.

La hipermutación somática dirigida por el antígeno acaba de afinar las respuestas de los anticuerpos

Tal como se describió, a medida que va transcurriendo el tiempo tras la inmunización, se produce un aumento progresivo de la afinidad de los anticuerpos producidos contra el antígeno inmunizante. Este fenómeno, que se conoce como **maduración de la afinidad**, se debe a la acumulación de mutaciones puntuales en las secuencias codificantes de la región V, tanto de las cadenas pesadas como de las ligeras. Dichas mutaciones tienen lugar después de ensamblarse las regiones codificantes. Cuando los linfocitos B ya han sido estimulados por el antígeno y por los linfocitos T colaboradores en un órgano linfoide periférico, algunos de los linfocitos B activados proliferan con mucha rapidez en los folículos linfoides (véase Figura 25–16) y forman estructuras denominadas *centros germinales*. En esta zona, los linfocitos B mutan a la velocidad aproximada de una mutación por secuencia codificante de región V en cada generación celular. Puesto que esto representa, aproximadamente, un millón de veces más que la velocidad de mutación espontánea en otros genes, y tiene lugar en células somáticas y no en células germinales (tratado en el Capítulo 21), el proceso se denomina **hipermutación somática**.

Tan sólo una pequeña parte de estos anticuerpos modificados generados por el proceso de hipermutación presentarán un incremento en la afinidad por el antígeno. Puesto que los mismos genes de anticuerpo generan los receptores para el antígeno de la superficie de los linfocitos B, los antígenos estimularán sobre todo los escasos linfocitos B que expresen estos receptores con afinidad incrementada por el antígeno. Los clones de estos linfocitos B modificados serán los que con más probabilidad sobrevivirán y proliferarán, especialmente cuando la cantidad de antígeno disminuya a niveles muy bajos hacia el final de la respuesta. La mayoría de los linfocitos B que quedan en el centro germinal morirán por apoptosis. Como resultado de ciclos repetidos de hipermutación somática seguidos de la proliferación inducida por antígenos de algunos clones de linfocitos B de memoria y efectores, a lo largo de la respuesta inmunitaria se generan abundantes anticuerpos de afinidad creciente, lo cual proporciona una protección contra los patógenos cada vez más eficiente. (En algunos mamíferos, incluidas las ovejas y las vacas, tiene lugar una hipermutación somática similar que diversifica el repertorio primario de anticuerpos antes de que los linfocitos B encuentren su antígeno.)

La identificación de una enzima implicada en la hipermutación somática constituyó un gran avance en la comprensión del mecanismo molecular de dicho proceso. Se denomina **desaminasa inducida por activación** (**AID**: ***a****ctivation-****i****nduced* ***d****eaminase*) porque se expresa específicamente en los linfocitos B activados y desamina la citosina (C) a uracilo (U) en el DNA transcrito codificante de la región V. La desaminación da lugar a desapareamientos U:G en la doble hélice de DNA y la reparación de dichos desapareamientos genera diversos tipos de mutaciones, según cuál sea la vía de reparación seguida (**Figura 25–40**). La hipermutación somática sólo afecta a las secuencias codificantes de la región V que se están transcribiendo, seguramente porque la enzima AID se une de forma específica a los transcritos de RNA (tratado en el Capítulo 7). AID también interviene cuando los linfocitos B activados cambian la producción de IgM a otras clases de anticuerpo, como ya se ha visto.

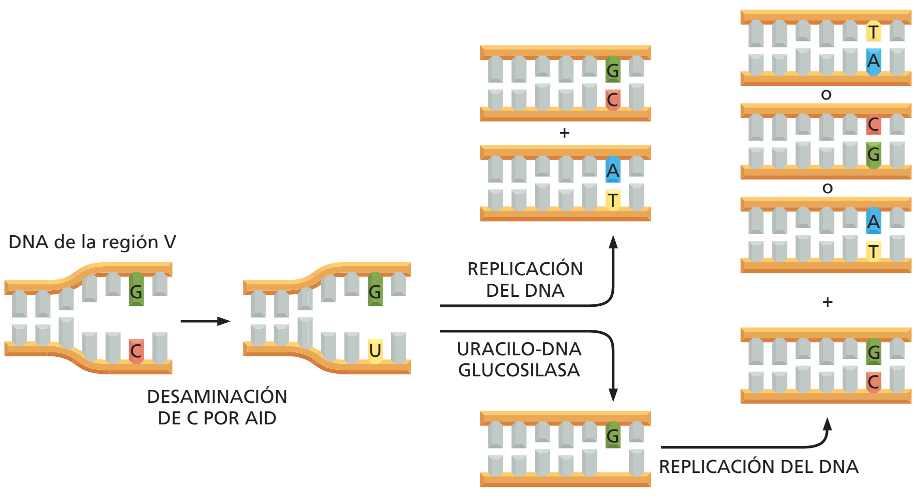


Figura 25–40 Algunas vías por las que AID puede dar lugar a mutaciones durante la hipermutación somática. AID desamina algunas citosinas que dan lugar a uracilo, en el DNA de la región V, y provoca errores de apareamiento U:G que dan lugar a mutaciones por varias vías. Algunas de estas mutaciones se originan cuando se replica el DNA que contiene un apareamiento U:G no reparado (véase Figura 5–49A). Otras se producen cuando la uracilo DNA glucosilasa elimina el uracilo antes de la replicación del DNA, generando una cadena de DNA molde, copiada por la DNA polimerasa, a la cual le falta una base. Finalmente otras (no mostradas) ocurren cuando el área próxima al error de apareamiento U:G se escinde, mediante el sistema de reparación de errores de apareamiento (descrito en el Capítulo 5), y genera una discontinuidad que puede ser reparada por DNA polimerasas que originarán mutaciones tanto en los pares A:T como en los C:G.

Los linfocitos B pueden cambiar la clase del anticuerpo que producen

Como ya se ha tratado anteriormente, todos los linfocitos B empiezan la síntesis de anticuerpos produciendo moléculas IgM, que insertan en la membrana plasmática donde actuarán como receptores para el antígeno. Tras abandonar la médula ósea roja, y antes de interaccionar con el antígeno, los linfocitos B empiezan produciendo tanto moléculas IgM como IgD, que actúan como receptores de antígeno ligados a membrana y presentan el mismo lugar de unión al antígeno (véase Figura 25–22). Tras la estimulación por el antígeno y por los linfocitos T colaboradores, muchos de estos linfocitos se convierten en linfocitos efectores que secretan IgM; estos anticuerpos IgM serán los predominantes en la respuesta primaria humoral. Sin embargo, en las etapas finales de la respuesta inmunitaria, cuando en los linfocitos B tiene lugar la hipermutación somática, la combinación del antígeno y de las citoquinas derivadas de los linfocitos T colaboradores activa a muchos linfocitos B a cambiar, pasando de producir anticuerpos IgM e IgD unidos a la membrana, a generar anticuerpos IgG, IgE o IgA; este proceso se denomina **cambio de clase**. Algunos de estos linfocitos se convierten en células de memoria, que en su superficie expresan la correspondiente clase de molécula de anticuerpo, y otros se convierten en linfocitos efectores, secretores de anticuerpos. Las moléculas de IgG, IgA e IgE reciben colectivamente el nombre de *clases secundarias* de anticuerpo debido a que sólo se producen después de la estimulación por el antígeno y porque dominan en las respuestas de anticuerpos secundarias y generan el repertorio secundario de anticuerpos. Como se ha descrito, cada una de las diferentes clases de anticuerpos se especializa en el ataque contra patógenos utilizando diferentes procesos en lugares distintos.

La clase de un anticuerpo viene determinada por la región constante de su cadena pesada. Por lo tanto, el hecho de que los linfocitos B puedan cambiar la clase de anticuerpo que producen sin alterar el lugar de unión al antígeno implica que una misma secuencia codificante de la región V_H (que determina la zona de unión al antígeno de la cadena pesada) puede asociarse de manera secuencial con diferentes segmentos codificantes C_H. Este hecho supone importantes implicaciones funcionales. Significa que en un animal determinado, un lugar de unión al antígeno en concreto, que ha sido seleccionado por antígenos ambientales, puede distribuirse entre las diferentes clases de inmunoglobulinas y adquirir de esta manera las propiedades biológicas propias de cada clase.

El cambio de un linfocito B que pasa de producir IgM e IgD a producir alguna de las clases secundarias de anticuerpos viene acompañado de un cambio irreversible en el DNA. Se trata del proceso denominado **recombinación de cambio de clase,** que supone la eliminación de todos los segmentos génicos C_H que se hallan entre la secuencia codificante VDJ y el segmento génico C_H específico que la célula está destinada a expresar. La recombinación de cambio de clase difiere del proceso de reordenación V(D)J en varios aspectos. (1) Tiene lugar tras la estimulación por el antígeno, principalmente en los centros germinales, y depende de los linfocitos T colaboradores. (2) Utiliza secuencias señal de recombinación distintas, denominadas *secuencias de cambio*, que están formadas por cortas secuencias repetidas en tándem a lo largo de varias kilobases. (3) Implica cortar y empalmar las secuencias de cambio, que son secuencias no codificantes, quedando la secuencia codificante inalterada (**Figura 25–41**). (4) Y lo que es más importante, el mecanismo molecular es diferente. Depende de AID, también implicada en la hipermutación somática, y no de RAG, responsable de la recombinación V(D)J.

Las citoquinas que promueven el cambio de clase inducen la producción de factores de transcripción que activan la transcripción de las secuencias de cambio necesarias en cada momento y permiten que AID se una a dichas secuencias. Una vez producida la unión, AID inicia la recombinación cambio de clase desaminando algunas citosinas a uracilos en la proximidad de las secuencias de cambio. Probablemente, la escisión de estos uracilos por la uracilo-DNA glucosilasa (véase la Figura 25–40) genera discontinuidades en la doble cadena que serán de nuevo unidas por un tipo de combinación de extremos no homólogos (descrita en el Capítulo 5).

Así, mientras que el repertorio primario de anticuerpos en ratones y humanos se genera por recombinación V(D)J mediante RAG, el repertorio secundario de anticuerpos se genera por hipermutación somática y por recombinación de cambio de clase, ambas mediadas por AID. La **Figura 25–42** resume los principales mecanismos estudiados en este capítulo implicados en la diversificación de los anticuerpos.

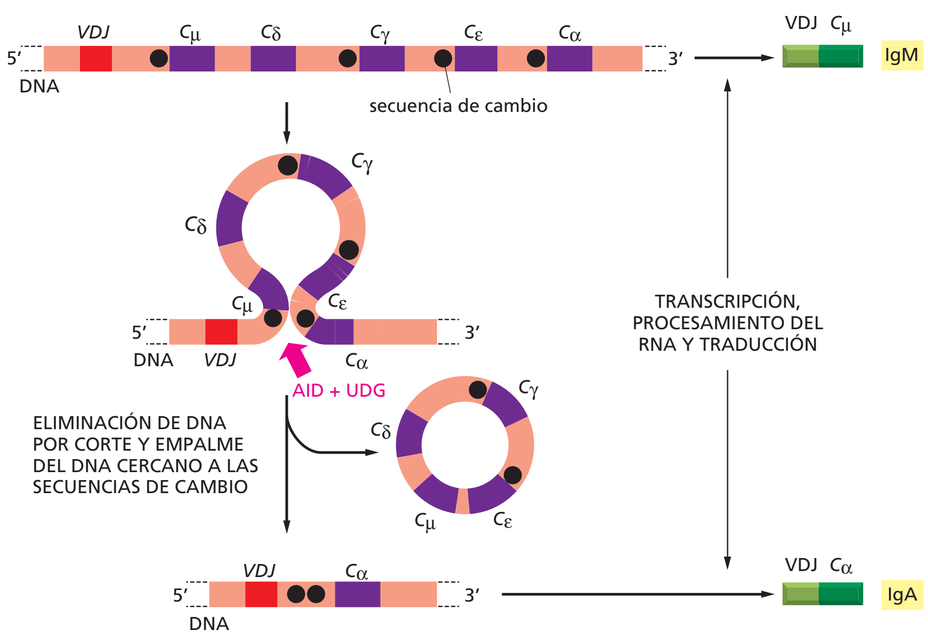


Figura 25–41 Ejemplo de la reordenación del DNA que tiene lugar en la recombinación de cambio de clase. Cuando un linfocito B que produce anticuerpos IgM a partir de una secuencia de DNA *VDJ* ensamblada es estimulado, pasa a producir anticuerpos IgA. En este proceso, elimina el DNA entre la secuencia *VDJ* y la secuencia codificante C_α. Las secuencias de DNA específicas (*secuencias de cambio*), localizadas en el lado 5′ de cada secuencia codificante C_H (excepto C_δ), se recombinan entre sí, eliminándose así el DNA intermedio. Como se trata en el texto, la recombinación depende de AID y de la uracilo DNA glucosilasa (UDG), las mismas enzimas implicadas en la hipermutación somática (véase Figura 25–40).

Resumen

Los anticuerpos están codificados por tres loci situados en cromosomas diferentes, cada uno de los cuales produce una cadena polipeptídica diferente. Uno codifica las cadenas ligeras κ, otro codifica las cadenas ligeras λ y el otro codifica las cadenas pesadas. Cada locus de anticuerpo contiene segmentos génicos separados que codifican las distintas zonas de las regiones variables de cada una de las cadenas de anticuerpo. Cada locus de cadena ligera contiene una o más secuencias codificantes de la región constante (C) así como grupos de segmentos génicos variables (V) y de unión (J). El locus de las cadenas pesadas contiene grupos de secuencias codificantes de la región C y grupos de segmentos génicos de la región V, D (de diversidad) y J.

Durante el desarrollo de los linfocitos B en la médula ósea (o en el hígado fetal), antes de la estimulación por el antígeno, la recombinación específica de lugar dependiente del complejo RAG reúne segmentos génicos separados. Un segmento génico V_L se recombina con un segmento génico J_L produciendo una secuencia de DNA codificante de la región V de la cadena ligera; un segmento génico V_H se recombina con un segmento D y uno J_H produciendo una secuencia de DNA codificante de la región V de la cadena pesada. Cada uno de los segmentos génicos ensamblados se cotranscribe con la secuencia apropiada de la región C, dando lugar a una molécula de RNA que codifica la cadena polipeptídica completa. Cuando un linfocito B fabrica cadenas pesadas y ligeras funcionales, que forman lugares de unión al antígeno (y no unen antígenos propios con elevada afinidad), desconecta el proceso de reordenación V(D)J, asegurando así que el linfocito fabrique un único tipo de lugar de unión al antígeno.

Combinando de diversas maneras los segmentos génicos heredados que codifican las regiones V_L y V_H, durante el desarrollo de los linfocitos B, los humanos podemos producir centenares de cadenas ligeras diferentes y miles de cadenas pesadas diferentes. Debido a que el lugar de unión al antígeno se forma donde se encuentran las zonas hipervariables de V_L y de V_H, las cadenas ligeras y pesadas pueden asociarse potencialmente formando anticuerpos con millones de lugares de unión al antígeno diferentes. Esta cifra se ve incrementada en gran medida por la pérdida y la ganancia de nucleótidos en el lugar de unión de los segmentos génicos. Estos anticuerpos, generados por recombinación V(D)J dependiente de RAG, antes de ser estimulados por el antígeno, son anticuerpos IgM e IgD de baja afinidad, y constituyen el repertorio primario de anticuerpos.

Los anticuerpos se diversifican aún más cuando son estimulados por el antígeno en los órganos linfoides periféricos, a través de procesos de hipermutación somática y recombinación de cambio de clase, que dependen de AID y de los linfocitos T colaboradores, y que generan anticuerpos IgG, IgA e IgE de alta afinidad, que constituyen el repertorio secundario de anticuerpos. El cambio de clase permite que el mismo lugar de unión al antígeno sea incorporado por anticuerpos con funciones biológicas diferentes.

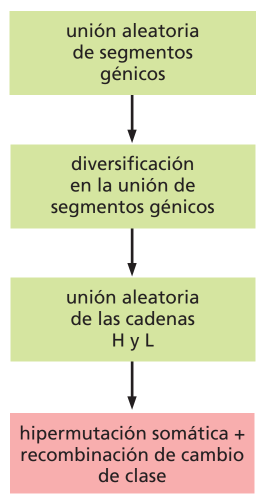


Figura 25–42 Principales mecanismos implicados en la diversificación de los anticuerpos en ratones y en humanos. Los mecanismos sombreados en *verde* tienen lugar durante el desarrollo de los linfocitos B en la médula ósea (o en el hígado fetal); los coloreados en *rojo* se producen cuando los linfocitos B son estimulados por antígenos extraños y por linfocitos T colaboradores en los órganos linfoides periféricos, al final de la respuesta primaria o durante la respuesta secundaria.

LINFOCITOS T Y PROTEÍNAS MHC

Como ocurre con las respuestas mediadas por anticuerpos, las reacciones inmunitarias mediadas por células son altamente específicas para el antígeno y son por lo menos tan importantes como los anticuerpos en la defensa contra las infecciones que pueden presentar los vertebrados. De hecho, para iniciar muchas de las respuestas inmunitarias adquiridas, incluidas la mayoría de las respuestas humorales, son necesarios los linfocitos T colaboradores. Además, a diferencia de los linfocitos B, los linfocitos T pueden colaborar en la eliminación de los patógenos que, en caso contrario, permanecerían invisibles en el interior de las células huésped. El resto del capítulo se dedicará a a tratar de resolver de qué forma los linfocitos T consiguen este objetivo.

Las respuestas mediadas por linfocitos T se diferencian de las de linfocitos B al menos en dos aspectos fundamentales. En primer lugar, los linfocitos T son inducidos a proliferar y diferenciarse en células efectoras por un antígeno extraño, sólo si éste se muestra en la superficie de *células presentadoras de antígeno*, normalmente células dendríticas en órganos linfoides periféricos. Los linfocitos T necesitan para su activación la participación de células presentadoras de antígeno, ya que la forma del antígeno que reconocen es diferente de la que reconocen los linfocitos B. Así, mientras que los linfocitos B reconocen, por ejemplo, antígenos proteicos intactos, los linfocitos T reconocen fragmentos de antígenos proteicos parcialmente degradados en el interior de células presentadoras de antígeno. Unas proteínas especiales denominadas *proteínas MHC* (comentadas en el Capítulo 24) unen dichos fragmentos peptídicos y los transportan hasta la superficie de la célula presentadora de antígeno, exponiendo, así, el antígeno a los linfocitos T.

La segunda diferencia es que, una vez activados, los linfocitos T efectores actúan únicamente en un radio limitado en un órgano linfoide periférico o después de haber migrado al lugar de la infección. Por el contrario, los linfocitos B efectores secretan anticuerpos que pueden actuar en lugares alejados. Los linfocitos T efectores interactúan de forma directa con otras células del huésped, a las que destruyen (como p. ej. en el caso de células huésped infectadas) o marcan de algún modo (como p. ej. en el caso de un linfocito B o un macrófago). Nos referiremos a estas células huésped como *células diana*. Sin embargo, como estas células diana para ser reconocidas por linfocitos T también presentan antígenos unidos a proteínas MHC en su superficie, también se consideran células presentadoras de antígeno.

Existen tres clases principales de linfocitos T: linfocitos T citotóxicos, linfocitos T colaboradores y linfocitos T reguladores (supresores). Los *linfocitos T citotóxicos* efectores eliminan directamente las células que han sido infectadas por un virus o por algún otro patógeno intracelular. Los *linfocitos T colaboradores* contribuyen a estimular las respuestas de otras células, principalmente macrófagos, células dendríticas, linfocitos B, y linfocitos T citotóxicos. Los *linfocitos T reguladores* suprimen la actividad de otras células, en especial de los linfocitos T efectores autorreactivos.

En esta sección se describirán estas tres clases de linfocitos T y sus funciones respectivas. Veremos cómo reconocen antígenos extraños en la superficie de células presentadoras de antígeno y células diana, teniendo en cuenta el papel clave de las proteínas MHC en este proceso de reconocimiento. Por último, se analizará cómo se seleccionan los linfocitos T durante su desarrollo en el timo asegurando la supervivencia y la maduración de aquellos linfocitos cuyos receptores sean potencialmente útiles. En primer lugar, se describirá la naturaleza de los receptores de la superficie celular que utilizan los linfocitos T para reconocer los antígenos.

Los receptores de los linfocitos T (TCR) son heterodímeros similares a los anticuerpos

Debido a que las respuestas de los linfocitos T dependen del contacto directo con una célula presentadora de antígeno o una célula diana, los **receptores de los linfocitos T** (**TCR**: ***T c**ell **r**eceptor*), a diferencia de lo que ocurre con los anticuerpos producidos por los linfocitos B, únicamente existen en la forma integral de membrana y no son secretados. Por este motivo, resultó difícil aislar los TCR y hasta la década de 1980 no se identificó su estructura molecular. Los TCR son similares a los anticuerpos. Están compuestos por dos cadenas polipeptídicas cada una de las cuales contiene dos dominios similares a Ig, uno variable y uno constante (**Figura 25–43**A). Además, la estructura tridimensional de la región extracelular

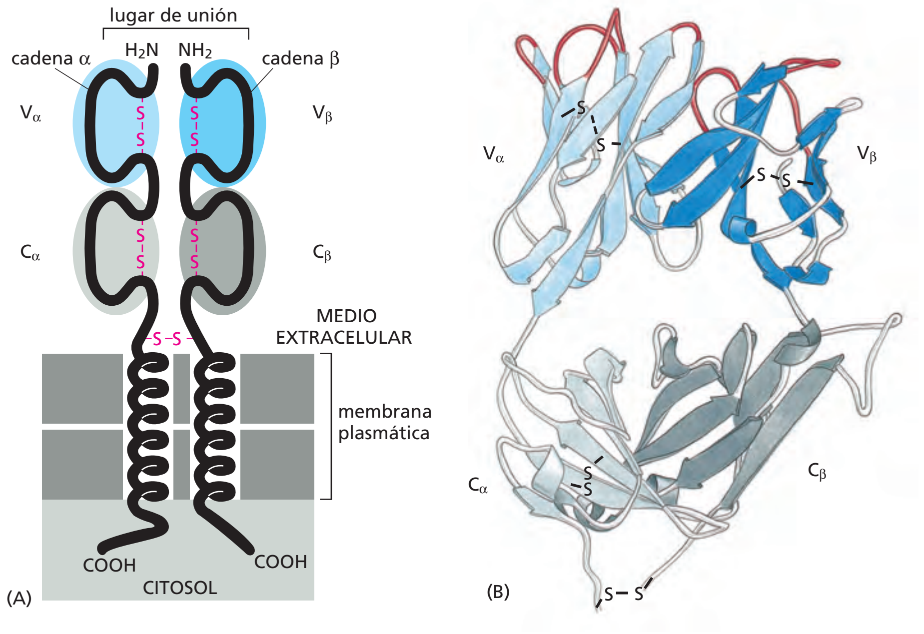


Figura 25–43 Receptor heterodimérico de linfocitos T (TCR). (A) Esquema en el que se muestra que el receptor está compuesto por una cadena polipeptídica α y una β. Cada cadena tiene una longitud de aproximadamente 280 aminoácidos y tiene una gran porción extracelular que está plegada en dos dominios Ig: uno variable (V) y el otro constante (C). El lugar de unión al antígeno está formado por un dominio V_α y otro V_β (sombreados en *azul*). A diferencia de los anticuerpos, que presentan dos lugares de unión al antígeno, los TCR presentan uno sólo. El heterodímero αβ está asociado de forma no covalente a un gran conjunto de proteínas de membrana invariables (no se muestran), que colaboran en la activación de los linfocitos T cuando los TCR se unen al antígeno. Un linfocito T normal tiene alrededor de 30.000 complejos receptores de este tipo en su superficie. (B) Estructura tridimensional de la porción extracelular de un TCR. El lugar de unión al antígeno está formado por bucles hipervariables de los dominios V_α y V_β (en *rojo*) y es similar en cuanto a sus dimensiones y geometría al lugar de unión del antígeno de las moléculas de anticuerpo. (B, basado en K.C. Garcia et al., *Science* 274:209-219, 1996. Con la autorización de AAAS.)

del TCR se ha determinado mediante difracción de rayos X, y ha resultado ser muy similar a uno de los brazos de la molécula de anticuerpo en forma de Y (Figura 25–43B).

En la mayoría de linfocitos T, los TCR tienen una cadena α y una cadena β. Los loci que codifican las cadenas α y β se localizan en cromosomas diferentes. Como en el caso del locus de la cadena pesada de un anticuerpo, los loci TCR contienen segmentos génicos *V, D* y *J* separados (o sólo segmentos génicos *V* y *J* en el caso del locus de la cadena α), que se juntan por recombinación específica de lugar durante el desarrollo de los linfocitos T en el timo. Con una sola excepción, todos los mecanismos utilizados por los linfocitos B para generar diversidad en los anticuerpos también son utilizados por los linfocitos T para generar diversidad en sus TCR. De hecho, utilizan la misma recombinasa V(D)J y también son necesarias las proteínas RAG estudiadas anteriormente. El mecanismo que no es funcional en la génesis de diversidad de los TCR es el de la hipermutación somática estimulada por el antígeno. Por tanto, la afinidad de los receptores permanece baja ($K_a \sim 10^5$-10^7 litros/mol), a pesar de que los linfocitos T con afinidades más altas son seleccionados preferentemente por el antígeno para persistir como células de memoria. Los linfocitos T compensan en parte esta baja afinidad incrementando su avidez como resultado de la unión simultánea de varios TCR a varios ligandos unidos a la membrana (los complejos MHC-péptido que se tratarán más adelante). Además, varios correceptores así como proteínas de adhesión intercelular estrechan fuertemente la unión de un linfocito T a la célula presentadora de antígeno o a la célula diana.

Un número reducido de linfocitos T, en lugar de producir cadenas α y β, producen un tipo de receptor heterodimérico distinto –aunque relacionado con TCR α/β– compuesto por cadenas γ y δ. En los humanos, dichos linfocitos representan el 5-10% de los linfocitos T sanguíneos pero puede ser la población de linfocitos T dominante en los epitelios (en la piel y en el intestino, p. ej.). Las funciones de estos linfocitos son menos conocidas que las de los linfocitos que expresan los TCR α/β, por lo que no se analizarán.

Como ocurre en el caso de los receptores de antígeno en los linfocitos B, los TCR se hallan estrechamente asociados a diversas proteínas unidas a la membrana que se hallan implicadas en la transmisión de la señal desde el receptor que ha sido activado por el antígeno al interior de la célula (véase Figura 25–66). Más adelante trataremos con detalle de estas proteínas pero primero describiremos los mecanismos especiales por los que los linfocitos T reconocen antígenos extraños en la superficie de las células presentadoras de antígeno.

Los linfocitos T son activados o inducidos a la tolerancia por las células dendríticas a través de la presentación de antígeno

Para que los linfocitos T citotóxicos o los linfocitos T colaboradores vírgenes puedan, respectivamente, destruir o ayudar a las células diana, tienen que ser activados a proliferar y

diferenciarse en células efectoras. Esta activación tiene lugar en órganos linfoides periféricos sobre la superficie de **células dendríticas** activadas (**Figura 25–44**) que exponen los antígenos extraños unidos a proteínas MHC en su superficie, junto con proteínas coestimuladoras. Por el contrario, los linfocitos T de memoria pueden ser activados por otros tipos de células presentadoras de antígeno, como son los macrófagos y los linfocitos B, así como las propias células dendríticas.

Existen diversos tipos de célula dendrítica que interaccionan con los linfocitos T, aunque presentan una sola función conocida, la de presentar los antígenos que tienen que activar o suprimir a los linfocitos T. Las células dendríticas inmaduras se localizan por todo el organismo, incluyendo los órganos linfoides centrales y periféricos. En el lugar en el que encuentran microorganismos invasores, endocitan los patógenos o sus productos. Si el encuentro no tiene lugar en un órgano linfoide, las células dendríticas transportan los antígenos extraños a través de la linfa hasta ganglios linfáticos locales o hasta los órganos linfoides asociados al intestino. Su encuentro con el patógeno activa los receptores de reconocimiento de patrón de las células dendríticas, que entonces son inducidas a madurar pasando de ser células que capturan antígenos a células activadas que presentan antígenos, con capacidad para activar a los linfocitos T (véase Figura 25–5). Para activar a los linfocitos T vírgenes, las células dendríticas también pueden ser activadas por daño tisular o por linfocitos T colaboradores efectores. En las lesiones tisulares, las células que mueren por necrosis liberarían proteínas de choque térmico y cristales de ácido úrico que activarían a las células dendríticas (descrito en el Capítulo 18).

Las células dendríticas activadas muestran en su membrana tres tipos moleculares de proteínas implicadas en la activación de los linfocitos T que los convertirá en linfocitos efectores o en linfocitos de memoria (**Figura 25–45**): (1) *proteínas MHC*, que presentan el antígeno extraño al TCR; (2) *proteínas coestimuladoras*, que se unen a receptores complementarios de la superficie del linfocito T, y (3) *moléculas de adhesión intercelular*, que permiten al linfocito T permanecer unido a la célula presentadora de antígeno el tiempo necesario para poder ser activada, que por lo general es de horas. Además, las células dendríticas activadas secretan diversas citoquinas que influyen en el tipo de linfocito T efector que se desarrolla (se tratará más adelante), así como el lugar al que el linfocito T migra tras ser estimulado. Así, por ejemplo, los linfocitos T activados por células dendríticas aisladas de las placas de Peyer, asociadas al intestino (véase Figura 25–3), migran al intestino delgado, donde se supone que encontrarán sus antígenos, pero no lo harán así los linfocitos activados por células dendríticas aisladas de los ganglios linfáticos.

Las células dendríticas no activadas también desempeñan funciones importantes. Colaboran en la inducción de la tolerancia de los linfocitos T autorreactivos, tanto en el timo como en otros órganos; dichas células presentan antígenos propios en ausencia de las moléculas coestimuladoras necesarias para activar los linfocitos T vírgenes. Inducen la autotolerancia al menos por dos vías: estimulando respuestas abortivas que inactivan o inducen a la apoptosis a los linfocitos T, y activando linfocitos T reguladores que suprimen la actividad de otros linfocitos T.

Antes de tratar el papel de las proteínas MHC en la presentación de antígeno a los linfocitos T, vamos a analizar las funciones de los tres tipos principales de linfocito T.

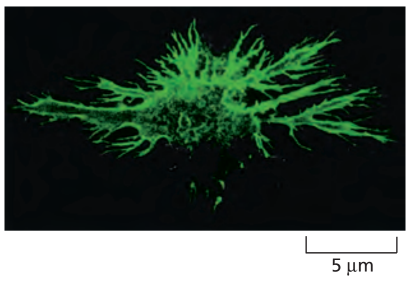


Figura 25–44 Micrografía de fluorescencia de una célula dendrítica en cultivo. Este tipo de célula presentadora de antígeno recibe su nombre por las largas prolongaciones o "dendritas" que presenta. La célula ha sido marcada con un anticuerpo monoclonal que reconoce un antígeno de superficie en este tipo celular. (Por cortesía de David Katz.)

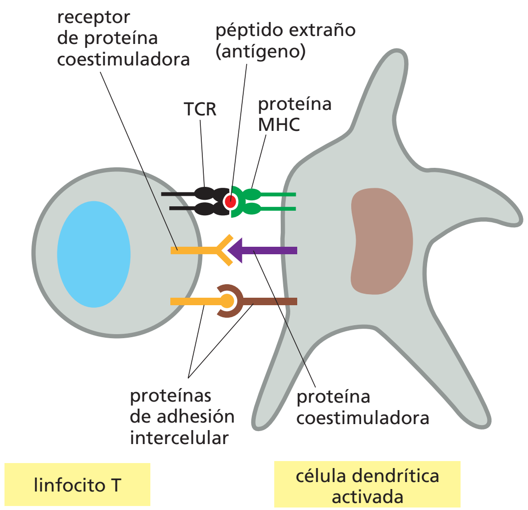


Figura 25–45 Los tres tipos de proteínas de la membrana plasmática de las células dendríticas activadas implicadas en la activación de los linfocitos T. En el esquema no aparecen las cadenas polipeptídicas invariables que se hallan siempre asociadas de manera estable al receptor de linfocitos T (TCR).

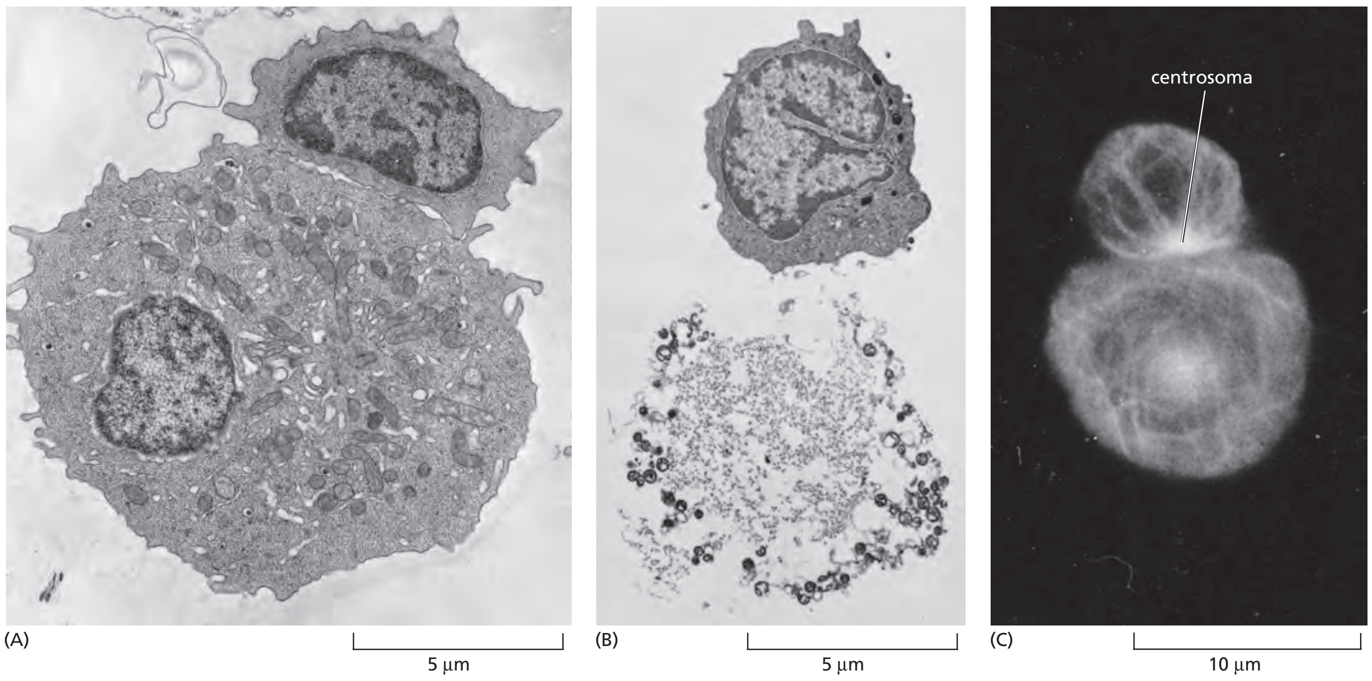


Figura 25–46 Linfocitos T citotóxicos durante el proceso de destrucción de células diana en cultivo. <GTCA>
(A) Electromicrografía en la que aparece un linfocito T citotóxico uniéndose a una célula diana. Los linfocitos T citotóxicos se obtuvieron de ratones inmunizados con las células diana, que son células tumorales extrañas. (B) Electromicrografía en la que aparece un linfocito T citotóxico y una célula tumoral que ha sido destruida por el linfocito. Al contrario de lo que ocurre en una placa de cultivo, en el animal la célula diana destruida sería fagocitada por las células vecinas en lugar de desorganizarse de la forma en que aparece aquí. (C) Micrografía de inmunofluorescencia de un linfocito T y de una célula tumoral tras ser incubados con anticuerpos antitubulina. Obsérvese que en el linfocito T, el centrosoma se localiza en el punto de contacto con la célula diana –una sinapsis inmunológica. Los gránulos de secreción (no aparecen) del linfocito T son transportados inicialmente a lo largo de los microtúbulos hacia el centrosoma, que entonces se desplaza hasta la sinapsis, liberando allí el contenido de sus gránulos. Véase también la Figura 16–103. (A y B, de D. Zagury et al., *Eur. J. Immunol.* 5:818-822, 1975. Con la autorización de John Wiley & Sons, Inc. C, reproducido de B. Geiger, D. Rosen y G. Berke, *J. Cell. Biol.* 95:137-143, 1982. Con la autorización de Rockefeller University Press.)

Los linfocitos T citotóxicos efectores inducen la autoeliminación de las células diana infectadas

Las **linfocitos T citotóxicos** protegen a los vertebrados contra patógenos intracelulares como virus y algunas bacterias o parásitos que se multiplican en el citoplasma de la célula huésped donde permanecen indemnes al ataque por anticuerpos. Estos linfocitos proporcionan esta protección destruyendo la célula infectada antes de que los microorganismos puedan proliferar y salir de ella e infectar otras células próximas. Como se describirá más adelante, los microorganismos intracelulares pueden ser reconocidos por los linfocitos T porque las células de los vertebrados tienen mecanismos que les permiten mostrar en su superficie fragmentos de sus proteínas intracelulares mientras están unidas a proteínas MHC.

Cuando un linfocito T citotóxico es activado por una célula presentadora de antígeno a convertirse en linfocito efector, podrá eliminar cualquier célula diana que contenga el mismo patógeno. Mediante su TCR, el linfocito T efector reconoce a un antígeno microbiano unido a una proteína MHC en la superficie de una célula diana infectada. Entonces, el linfocito T reorganiza su citoesqueleto y enfoca su maquinaria eliminadora hacia esta diana (**Figura 25–46**). Este enfoque se consigue cuando los TCR se agrupan –junto con diversos correceptores, moléculas de adhesión y proteínas señalizadoras– en la interfase entre el linfocito T y la célula diana, formando una *sinapsis inmunológica*. Algo similar sucede cuando un linfocito T colaborador efector interacciona con su célula diana. De este modo, las células vecinas no se ven afectadas por las señales liberadas por los linfocitos T efectores.

El linfocito T citotóxico efector, una vez adherido a su célula diana, para eliminarla puede utilizar una de las dos estrategias, ambas dirigidas a inducir la autodestrucción de la célula diana a través de apoptosis (estudiada en el Capítulo 18). Durante la eliminación de una célula diana, el linfocito T citotóxico suele liberar una proteína formadora de poros, denominada **perforina**, homóloga al componente C9 del complemento (véase Figura 24–49). La perforina se almacena en vesículas de secreción de los linfocitos T citotóxicos y se libera mediante exocitosis en el punto de contacto con la célula diana. La perforina polimeriza entonces en la membrana plasmática de la célula diana formando canales transmembrana. Las vesículas de secreción también contienen serina proteasas, las cuales se supone que entran en el citosol de la célula diana a través de los canales de perforina. Una de las proteasas, denominada *granzima B*, activa una proteína proapoptótica Bcl2 denominada *Bid* generando *tBid*, una forma truncada de la proteína; tBid libera citocromo *c* de las mitocondrias e induce una cascada proteolítica de caspasas que destruye la célula por apoptosis (descrito en el Capítulo 18) (**Figura 25–47**A). Los ratones en los que se ha inactivado el gen de la perforina, no pueden generar linfocitos T citotóxicos específicos de

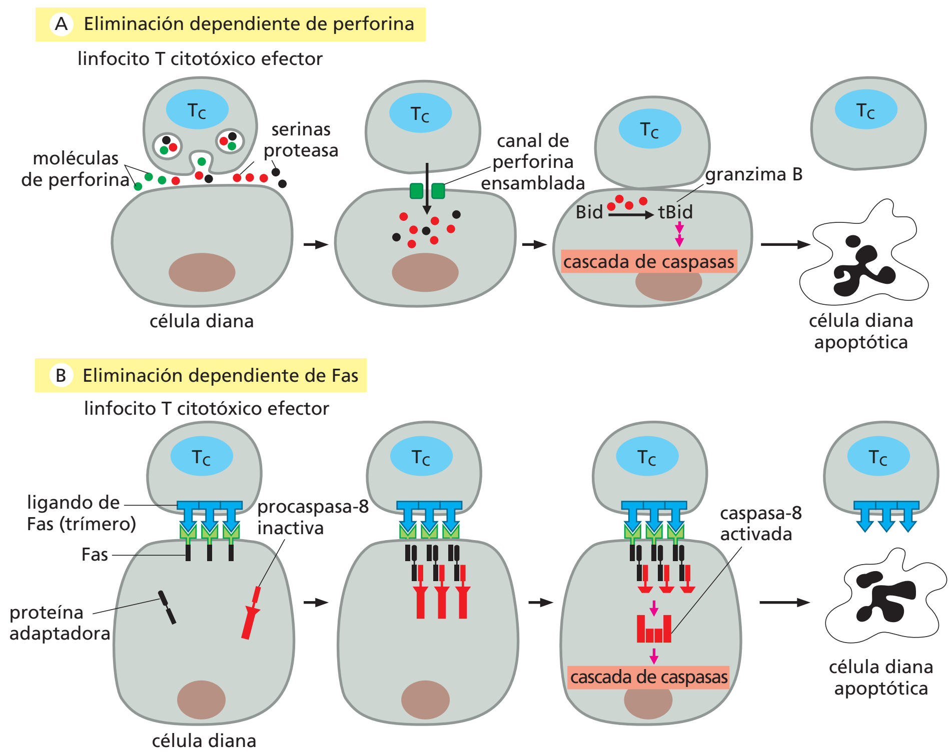


Figura 25–47 Dos estrategias utilizadas por los linfocitos T citotóxicos efectores para eliminar sus células diana. En ambos casos, los linfocitos T deben contactar con la célula diana para eliminarla; un único linfocito T citotóxico puede eliminar de forma secuencial multitud de células diana. (A) El linfocito T citotóxico (T_C) libera perforina y enzimas proteolíticas sobre una célula diana infectada, mediante un proceso de exocitosis local. La elevada concentración de Ca^{2+} en el medio extracelular provoca que la perforina se inserte en la membrana plasmática de la célula diana y forme canales transmembrana. A través de estos canales, las enzimas proteolíticas entran en el citosol de la célula diana. Una de estas enzimas, la granzima B, corta la proteína Bid, generando la forma truncada tBid, que libera citocromo *c* de las mitocondrias iniciando así la cascada de caspasas que conduce a la apoptosis.
(B) La proteína homotrimérica ligando Fas, de la membrana de los linfocitos T citotóxicos, se une y activa el receptor Fas, proteína localizada en la membrana de las células diana. La cola citoplasmática de Fas tiene un *dominio de muerte* que, al activarse, se une a una proteína adaptadora, la cual recluta *procaspasa-8*. Las moléculas de procaspasa-8 agrupadas se activan e inician una cascada proteolítica de caspasas que conduce a la apoptosis (véase Figura 18–6).

patógenos y muestran una mayor susceptibilidad a determinadas infecciones intracelulares virales y bacterianas.

En la segunda estrategia de eliminación, el linfocito T citotóxico induce la muerte de la célula diana a través de la cascada de caspasas pero no de un modo tan directo. Una proteína homotrimérica de la superficie del linfocito T citotóxico denominada **ligando de Fas** se une a proteínas receptoras transmembrana de la célula diana denominadas **Fas**. La unión altera las proteínas Fas y sus extremos citosólicos provocan el reclutamiento, a través de proteínas adaptadoras, de la procaspasa-8. Las moléculas de procaspasa-8 reclutadas se activan e inician una cascada de caspasas que conduce a la apoptosis (Figura 25–47B).

Los linfocitos T colaboradores efectores colaboran en la activación de otras células de los sistemas inmunitarios innato y adquirido

Al contrario de lo que ocurre con los linfocitos T citotóxicos, los **linfocitos T colaboradores** son clave en la defensa contra patógenos tanto extracelulares como intracelulares. Colaboran en la estimulación de los linfocitos B en la generación de anticuerpos que ayuden a inactivar o eliminar patógenos extracelulares y sus toxinas. También activan a los macrófagos para que destruyan los patógenos intracelulares que se multiplican en los fagosomas de los propios macrófagos y ayudan a activar a los linfocitos T citotóxicos para que eliminen las células diana infectadas. También pueden estimular a las células dendríticas a mantener su activación.

Cuando un linfocito T colaborador es activado por una célula presentadora de antígeno y se convierte en célula efectora, dicho linfocito colaborador ya puede participar en la activación de otras células y lo hace secretando diversas citoquinas coestimuladoras y presentando en su superficie proteínas coestimuladoras. Un linfocito T colaborador virgen, al ser activado por una célula dendrítica mediante la unión al antígeno, se diferencia en dos posibles tipos de célula efectoras, denominados T_H1 y T_H2. Los *linfocitos T_H1* participan principalmente en la inmunidad contra los microorganismos intracelulares y colaboran en la activación de macrófagos, linfocitos T citotóxicos y linfocitos B. Los *linfocitos T_H2* están implicados principalmente en la inmunidad contra patógenos extracelulares, en especial parásitos pluricelulares, y colaboran en la activación de linfocitos B en la producción de anticuerpos contra el patógeno (**Figura 25–48**). Como se describirá más adelante, la naturaleza del patógeno invasor y el tipo de respuesta inmunitaria innata que desencadena determinan el tipo de célula T cola-

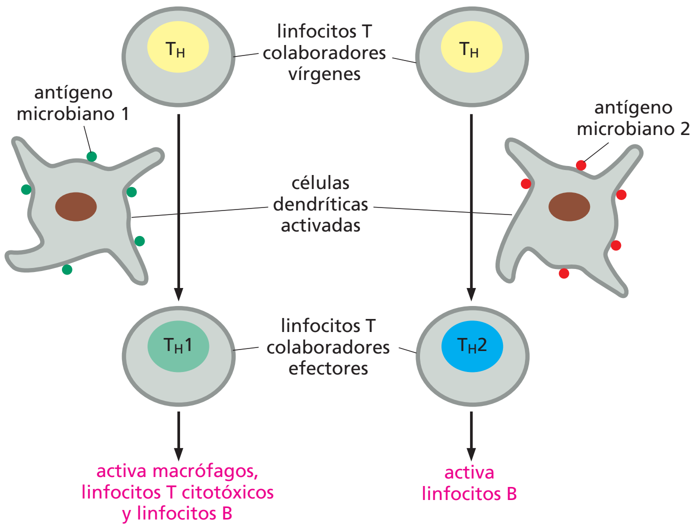


Figura 25–48 Diferenciación de linfocitos T colaboradores vírgenes en linfocitos efectores colaboradores T_H1 o T_H2 en un órgano linfoide periférico. La naturaleza de la célula dendrítica activada y las características del patógeno que la ha activado determinan el tipo de linfocito colaborador que se desarrolla.

boradora que se desarrolla. Este hecho, a su vez, determina la naturaleza de las respuestas inmunitarias adquiridas movilizadas para combatir los patógenos.

En ocasiones, un linfocito T colaborador virgen que encuentra su antígeno en un órgano linfoide periférico, se diferencia en linfocito efector y en lugar de favorecer la respuesta inmunitaria, la suprime. Tal como veremos más adelante, este tipo de *linfocito T regulador* se desarrolla sobre todo en el timo como un tipo diferente de linfocito T.

Los linfocitos T reguladores suprimen la actividad de otros linfocitos T

El estudio y la caracterización de los **linfocitos T reguladores** no han resultado sencillos, a causa fundamentalmente de la falta de marcadores apropiados para identificar dichas células. De hecho, durante años los inmunólogos cuestionaban su existencia. Se identificaron inicialmente por su capacidad para suprimir la actividad de otros linfocitos, por lo que se les denominó *linfocitos T supresores*. Cuando se dispuso de marcadores apropiados para su identificación, fueron rebautizados como *linfocitos T reguladores*, capaces de suprimir la actividad de linfocitos T colaboradores y citotóxicos y de las células dendríticas. Aunque representan menos del 10% de los linfocitos T sanguíneos y de los presentes en los órganos linfoides periféricos, los linfocitos T reguladores desempeñan un papel clave en la autotolerancia inmunológica, suprimiendo la actividad de los linfocitos T efectores colaboradores y citotóxicos autorreactivos. Además ayudan a evitar una respuesta excesiva de los linfocitos T contra los antígenos microbianos en las infecciones crónicas. En ambos casos, contribuyen a evitar que las respuestas inmunitarias adquiridas dañen los tejidos del huésped.

Un importante avance en el conocimiento de los linfocitos T reguladores fue la identificación de un factor de transcripción, *Foxp3*, expresado de modo exclusivo por estas células. Además de convertirse en un marcador incontrovertible de linfocitos T reguladores, se trata de un elemento clave en su desarrollo. Así, los individuos –tanto ratones como humanos– cuyo gen para esta proteína esté inactivado, no generan linfocitos T reguladores y desarrollan de manera temprana enfermedades autoinmunitarias mortales que afectan diversos órganos. No se conoce el mecanismo por el cual los linfocitos T reguladores suprimen la acción de los linfocitos T efectores o de las células dendríticas, pero se ha propuesto la implicación de las citoquinas inhibitorias secretadas *TGFβ* e *interleuquina 10* (*IL10*).

A continuación se incide de nuevo en el papel clave de las proteínas MHC en la presentación del antígeno a los linfocitos T.

Los linfocitos T reconocen péptidos extraños unidos a las proteínas MHC

Tanto los linfocitos T citotóxicos como los colaboradores son activados inicialmente en los órganos linfoides periféricos a través del reconocimiento de un antígeno extraño en la su-

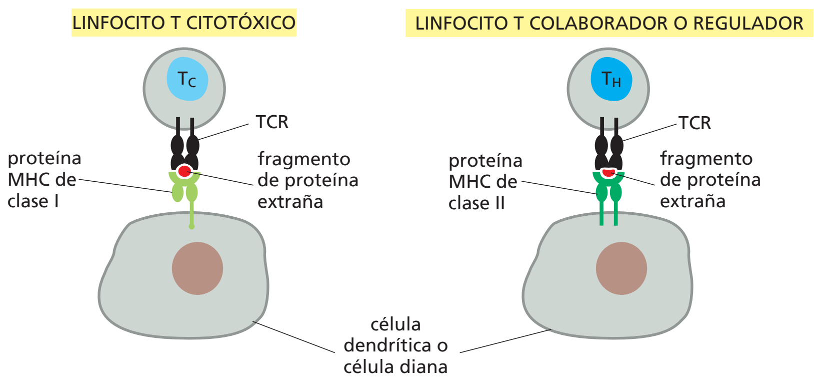


Figura 25–49 Reconocimiento por parte de los linfocitos T de péptidos extraños unidos a proteínas MHC. Los linfocitos T citotóxicos reconocen péptidos extraños asociados a proteínas MHC de clase I, mientras que los linfocitos T colaboradores y los T reguladores reconocen péptidos extraños asociados a proteínas MHC de clase II. En ambos casos, los linfocitos T reconocen los complejos MHC-péptido en la superficie de células dendríticas o de células diana.

perficie de una célula presentadora de antígeno, una célula dendrítica en el caso de los linfocitos T vírgenes. Por lo general, el antígeno se encuentra en forma de fragmentos peptídicos generados por la degradación de antígenos proteicos llevada a cabo en el interior de la célula presentadora de antígenos. El proceso de reconocimiento es dependiente de la presencia de **proteínas MHC** en las células presentadoras de antígenos, las cuales captan esos fragmentos, los transportan a la membrana plasmática y allí los presentan –junto con señales coestimuladoras– a los linfocitos T. Una vez activados, los linfocitos T reconocen los mismos complejos MHC-péptido en la superficie de la célula diana que están regulando, las cuales pueden ser linfocitos B, linfocitos T citotóxicos, macrófagos infectados en el caso de los linfocitos T colaboradores o cualquier célula infectada en el caso de linfocitos T citotóxicos; en el caso de los linfocitos T colaboradores también pueden ser las propias células dendríticas.

Las proteínas MHC están codificadas por un gran complejo génico denominado **complejo principal de histocompatibilidad** (**MHC**: ***m****ajor* ***h****istocompatibility* ***c****omplex*). Desde un punto de vista estructural y funcional se distinguen dos clases principales de proteínas MHC: las *proteínas MHC de clase I*, que presentan péptidos extraños a los linfocitos T citotóxicos, y las *proteínas MHC de clase II*, que presentan los péptidos extraños a los linfocitos T colaboradores (**Figura 25–49**).

Antes de examinar los diversos mecanismos mediante los que son procesados los antígenos proteicos para ser presentados a los linfocitos T, nos detendremos a estudiar las propias proteínas MHC, cuyo papel es tan importante en el funcionamiento de los linfocitos T.

Las proteínas MHC fueron identificadas en las reacciones de trasplante antes de conocer sus funciones

Las proteínas MHC fueron identificadas inicialmente como los principales antígenos reconocidos en las **reacciones de trasplante**. Después de trasplantar órganos entre individuos adultos de la misma especie (*alotrasplantes*) o de especies diferentes (*xenotrasplantes*), es frecuente que se produzca un rechazo del órgano trasplantado. En la década de 1950, experimentos en los que se realizaron trasplantes de piel entre diferentes cepas de ratón demostraron que el *rechazo del trasplante* es una respuesta inmunitaria adquirida frente a antígenos extraños de la membrana de las células trasplantadas. El rechazo se produce sobre todo por los linfocitos T que reaccionan frente a versiones genéticamente extrañas de proteínas de superficie celular denominadas *moléculas de histocompatibilidad* (del griego *histos,* que significa tejido). Entre ellas, las más importantes son las proteínas MHC, codificadas por el grupo de genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Las proteínas del MHC se expresan en las células de todos los vertebrados superiores. Su existencia se demostró por primera vez en ratones, recibiendo el nombre de *antígenos H-2* (antígenos de *h*istocompatibilidad-*2*). En humanos, estas moléculas se denominan *antígenos HLA* (***h****uman-****l****eucocyte-****a****ssociated*; antígenos asociados a leucocitos humanos) debido a que se describieron por primera vez en leucocitos.

Tres propiedades singulares de las moléculas MHC confundieron a los inmunólogos durante muchos años. En primer lugar, las moléculas MHC son, con mucha diferencia, los antígenos diana reconocidos en las reacciones de trasplante mediadas por linfocitos T. En segundo lugar, una fracción extraordinariamente grande de linfocitos T son capaces de reconocer las moléculas de MHC extrañas: por ejemplo, mientras que menos de un 0,001% de

los linfocitos T vírgenes de un individuo responden frente a un antígeno vírico típico, más del 10% de ellos responden frente a una proteína MHC de otro individuo. En tercer lugar, algunos de los genes que codifican las proteínas MHC son los más *polimórficos* que se conocen en vertebrados superiores. Es decir, dentro de una misma especie existe un número extraordinariamente grande de *alelos* (formas alternativas de un mismo gen), en ocasiones más de 400, sin que predomine ninguno de ellos. Puesto que cada individuo tiene por lo menos 12 genes que codifican proteínas MHC (véase más adelante), es poco probable que dos individuos presenten conjuntos idénticos de proteínas MHC. Estas diferencias hacen muy difícil el emparejamiento de un donante y un receptor para el trasplante de órganos, excepto en el caso de que se hallen próximos genéticamente.

Por supuesto, un vertebrado no tiene que protegerse de la invasión de células ajenas de otros vertebrados. Esta aparente obsesión de los linfocitos T por las moléculas MHC extrañas y el acusado polimorfismo de estas moléculas constituía un gran rompecabezas que fue resuelto al menos en parte tras el descubrimiento de que (1) las proteínas MHC unen fragmentos de proteínas extrañas y los muestran en la membrana de las células huésped presentándolos a los linfocitos T, y (2) los linfocitos T responden a las proteínas MHC extrañas de la misma manera en que responden a proteínas MHC propias que han unido antígenos extraños.

Las proteínas MHC de clase I y de clase II son heterodímeros similares estructuralmente

Las proteínas MHC de clase I y de clase II presentan estructuras muy similares. Ambas son heterodímeros transmembrana cuyos dominios extracelulares amino-terminales se unen al antígeno para su presentación a los linfocitos T.

Las **proteínas MHC de clase I** tienen una cadena α transmembrana codificada por un gen MHC de clase I y una pequeña proteína extracelular denominada *β_2-microglobulina* (**Figura 25–50**A). La β_2-microglobulina no se inserta en la membrana y está codificada por un gen que no pertenece al grupo de genes MHC. La cadena α se pliega en tres dominios globulares extracelulares (α_1, α_2 y α_3). El dominio α_3 y la β_2-microglobulina son los más próximos a la membrana y son similares a un dominio Ig. Los dos dominios amino-terminales de la cadena α, que son los más alejados de la membrana, contienen los aminoácidos polimórficos (variables) que son reconocidos por los linfocitos T en las reacciones de trasplante. Estos dominios son los que unen al péptido y lo presentan a los linfocitos T citotóxicos.

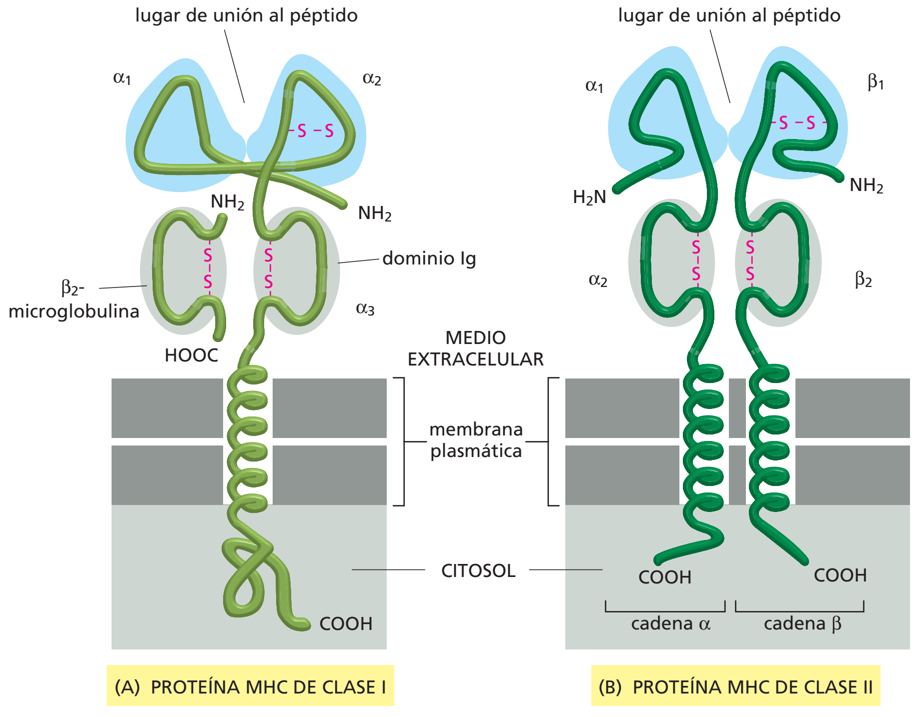


Figura 25–50 Proteínas MHC de clase I y de clase II. (A) La cadena α de la molécula de clase I presenta tres dominios extracelulares α_1, α_2 y α_3, codificados por exones diferentes. Está asociada de forma no covalente a una cadena polipeptídica menor, β_2-microglobulina, que no está codificada por el MHC. El dominio α_3 y la propia β_2-microglobulina son dominios homólogos a Ig. Mientras que la β_2-microglobulina es invariable, la cadena α es muy polimórfica, principalmente en sus dominios α_1 y α_2. (B) En las proteínas MHC de clase II, ambas cadenas son polimórficas, sobre todo en los dominios α_1 y β_1; los dominios α_2 y β_2 son homólogos a Ig. Por lo tanto, existen notables similitudes entre las proteínas MHC de clase I y las de clase II. En ambas, los dos dominios más externos (sombreados en *azul*) son polimórficos e interaccionan entre sí formando un surco que une fragmentos peptídicos de proteínas extrañas y los presenta a los linfocitos T.

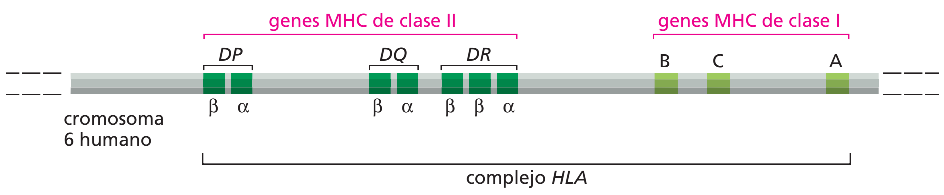


Figura 25–51 Genes MHC humanos. Este esquema muestra la localización de los genes que codifican las subunidades transmembrana de las proteínas MHC de clase I (en *verde claro*) y de clase II (en *verde oscuro*). Los genes que se muestran codifican tres tipos de proteínas MHC de clase I (HLA-A, HLA-B y HLA-C) y tres tipos de proteínas MHC de clase II (HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR). Un individuo puede producir seis tipos diferentes de proteínas MHC de clase I (tres codificados por genes maternos y tres por genes paternos) y más de seis tipos de proteínas MHC de clase II. El número de proteínas MHC de clase II que puede generarse es superior a seis porque hay dos genes DR β y porque tanto las cadenas polipeptídicas codificadas por genes maternos y como las codificadas por genes paternos pueden, en ocasiones, emparejarse.

Como en el caso de las proteínas MHC de clase I, las **proteínas MHC de clase II** son heterodímeros con dos dominios homólogos a Ig conservados, situados cerca de la membrana, y dos dominios amino-terminales polimórficos (variables) alejados de la membrana. Sin embargo, en estas proteínas ambas cadenas (α y β) están codificadas por genes MHC y son integrales de membrana (Figura 25–50B). Los dos dominios polimórficos se unen al péptido y lo presentan a los linfocitos T colaboradores o a los linfocitos T reguladores.

La presencia de dominios Ig en las proteínas de clase I y clase II sugiere que las proteínas MHC y los anticuerpos tienen una historia evolutiva común. La **Figura 25–51** muestra la localización de los genes que codifican las clases I y II de proteínas MHC en humanos. La figura ilustra además de qué forma un individuo puede producir seis tipos de proteínas MHC de clase I y un número incluso superior de proteínas MHC de clase II.

Junto con las proteínas MHC de clase I clásicas, existen numerosas *proteínas similares a las proteínas MHC de clase I*, las cuales también forman dímeros con β_2-microglobulina. Aunque estas proteínas están codificadas por genes que no pertenecen a MHC y son menos polimórficas, algunas de ellas son capaces de presentar a los linfocitos T antígenos microbianos específicos, incluyendo lípidos y glucolípidos. Las funciones de la mayor parte de ellas son desconocidas aunque de algunas se sabe que desempeñan algún papel en el desarrollo cerebral.

Las proteínas MHC unen péptidos e interaccionan con receptores de linfocitos T

Cada individuo sólo genera un reducido número proteínas MHC clásicas diferentes que, en conjunto, deben ser capaces de presentar a los linfocitos T fragmentos de péptidos de casi cualquier proteína extraña. Así, a diferencia de una molécula de anticuerpo, cada proteína MHC debe tener la capacidad de unirse a un gran número de péptidos diferentes. La base estructural de dicha versatilidad surgió del análisis de proteínas MHC realizados mediante cristalografía de rayos X.

Como se muestra en la **Figura 25–52**A, una proteína MHC de clase I presenta un solo *lugar de unión al péptido*, localizado en un extremo de la molécula, que es distal con respecto a la membrana plasmática. Este lugar consiste en un profundo surco localizado entre dos largas hélices α; el surco se estrecha en los extremos de modo que sólo resulta suficientemente grande como para alojar un péptido de 8 a 10 aminoácidos de longitud. De hecho, cuando se analizó por primera vez una proteína MHC de clase I mediante cristalografía por rayos X se encontró que este surco contenía péptidos que habían cocristalizado con la proteína MHC (Figura 25–52B), sugiriendo que el péptido, una vez unido, no suele disociarse.

Un péptido típico se une al surco de las proteínas MHC de clase I en una conformación extendida, con su grupo amino unido a aminoácidos invariables de la proteína MHC en un extremo del surco y con su grupo carboxilo terminal unido a aminoácidos invariables en el otro extremo de la depresión (**Figura 25–53**). Algunas cadenas laterales de aminoácidos se unen a aminoácidos variables (polimórficos) de la proteína MHC distribuidos por toda la depresión, mientras que otras se dirigen al exterior en una posición que será reconocida por los receptores de los linfocitos T citotóxicos. Puesto que los aminoácidos invariables de los extremos del surco de la proteína MHC reconocen características del esqueleto peptídico que son comunes a todos los péptidos, cada forma alélica de proteína MHC de clase I puede unir una gran variedad de péptidos de secuencias distintas. A su vez, la presencia de aminoácidos polimórficos a lo largo del surco de MHC, que unen cadenas laterales concretas de aminoácidos del péptido, asegura que cada forma alélica una y presente un grupo característico y distinto de péptidos. Así, los seis tipos de proteínas MHC de clase I de un individuo pueden presentar un amplio rango de péptidos extraños a los linfocitos T citotóxicos, pero en cada individuo lo hacen de forma ligeramente diferente.

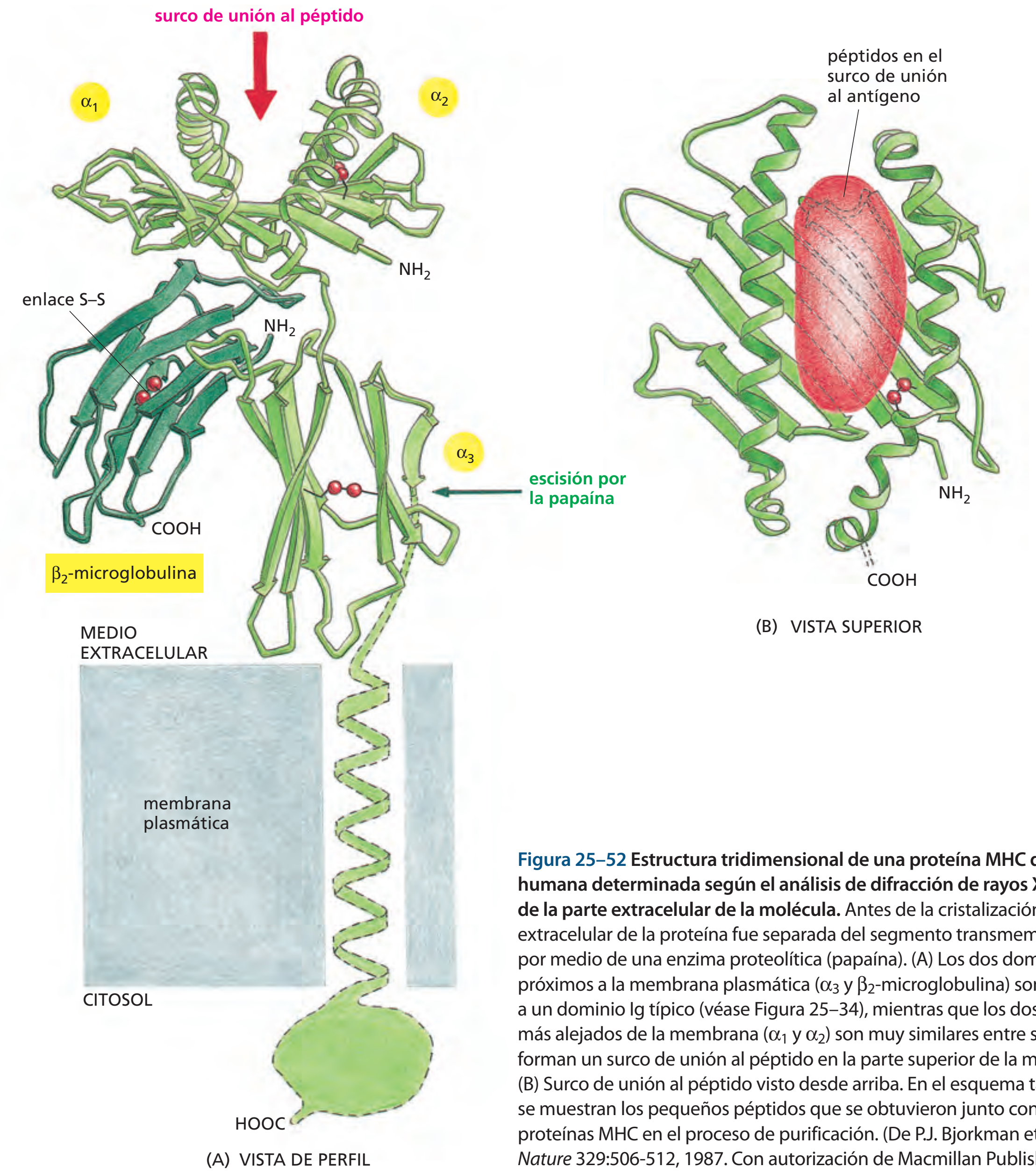


Figura 25–52 Estructura tridimensional de una proteína MHC de clase I humana determinada según el análisis de difracción de rayos X de cristales de la parte extracelular de la molécula. Antes de la cristalización, la porción extracelular de la proteína fue separada del segmento transmembrana por medio de una enzima proteolítica (papaína). (A) Los dos dominios más próximos a la membrana plasmática (α_3 y β_2-microglobulina) son similares a un dominio Ig típico (véase Figura 25–34), mientras que los dos dominios más alejados de la membrana (α_1 y α_2) son muy similares entre sí, y juntos forman un surco de unión al péptido en la parte superior de la molécula. (B) Surco de unión al péptido visto desde arriba. En el esquema también se muestran los pequeños péptidos que se obtuvieron junto con las proteínas MHC en el proceso de purificación. (De P.J. Bjorkman et al., *Nature* 329:506-512, 1987. Con autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

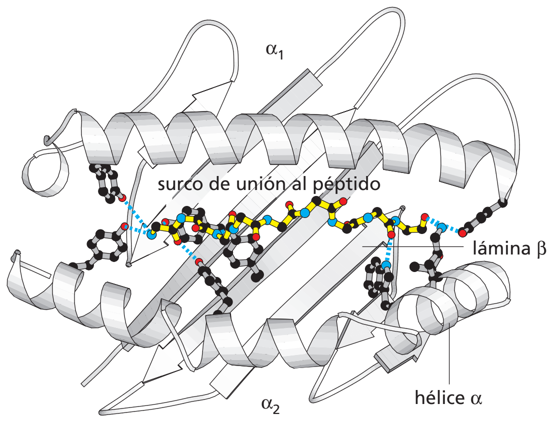


Figura 25–53 Péptido unido al surco de una proteína MHC de clase I. <AAGT> Esquema del surco visto desde arriba. El surco MHC se muestra en *gris*; está formado por los dominios α_1 y α_2 de la proteína (véanse Figuras 25–50A y 25–52A). El esqueleto del péptido unido se muestra en *amarillo*, con los átomos de carbono en *negro*, los de oxígeno en *rojo* y los de nitrógeno en *azul*; el extremo amino del péptido se sitúa a la izquierda. Obsérvese que los grupos amino y carboxilo terminales del esqueleto peptídico se unen a través de enlaces de hidrógeno e iónicos (indicados por *líneas de puntos azules*) a las cadenas laterales de aminoácidos invariables de la proteína MHC hacia los extremos del surco. Aunque no se muestra en el esquema, las cadenas laterales de algunos aminoácidos del péptido se unen a aminoácidos variables (polimórficos) del surco, mientras que otros se orientan hacia fuera pudiendo ser reconocidos por los TCR de los linfocitos T citotóxicos. (Cortesía de Paul Travers.)

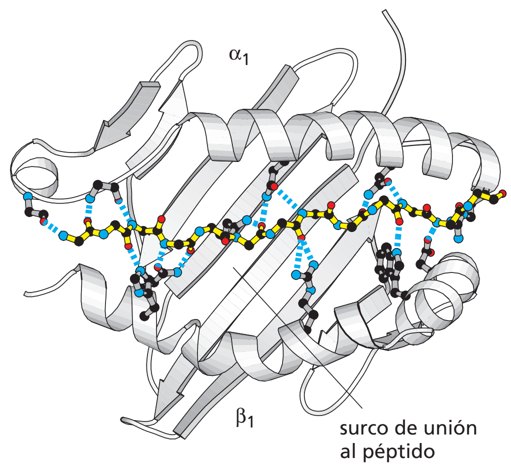


Figura 25–54 Péptido unido al surco de una proteína MHC de clase II. <GAAA> Esquema similar al de la Figura 25–53. El surco está formado por los dominios amino-terminales de las cadenas α y β (α_1 y β_1; véase Figura 25–50B). Obsérvese que el péptido se extiende más allá de los límites del surco y que su esqueleto se une mediante enlaces de hidrógeno distribuidos a lo largo de toda la longitud del péptido a cadenas laterales de aminoácidos invariables del surco. (Cortesía de Paul Travers.)

Las proteínas MHC de clase II presentan una estructura tridimensional muy similar a la exhibida por las proteínas de clase I, pero el surco de unión al antígeno no es tan estrecho en los extremos, de forma que pueden acomodar péptidos más largos, de entre 12 y 20 aminoácidos. Aunque el péptido no está unido por los extremos, es inmovilizado en el surco mediante interacciones con aminoácidos invariables de la proteína MHC distribuidos a lo largo del surco (**Figura 25–54**). Como en el caso de las proteínas MHC de clase I, ciertas cadenas laterales de aminoácidos del péptido se unen a aminoácidos polimórficos de MHC a lo largo del surco o se dirigen hacia arriba siendo reconocidos por los TCR de los linfocitos T colaboradores o de los linfocitos T reguladores. Cualquier surco de las proteínas MHC de clase II permite acomodar un conjunto de péptidos más heterogéneo que cualquiera de los surcos de las proteínas MHC de clase I. Así, aunque un individuo sólo produce unos cuantos tipos de proteínas de clase II, cada una de ellas con su surco característico de unión al péptido, el conjunto de estas proteínas puede unir y presentar a los linfocitos T colaboradores una ingente variedad de péptidos extraños, los cuales desempeñan un papel crucial en la mayoría de las respuestas inmunitarias de tipo adquirido.

Análisis cristalográficos mediante rayos X de complejos formados por un receptor de linfocito T soluble y una proteína MHC, también soluble, que contiene en su surco uno de aquellos fragmentos de péptido, muestran la manera en que el TCR reconoce el complejo MHC-péptido. Las proteínas solubles utilizadas para estos experimentos se generan mediante técnicas de DNA recombinante. En todos los casos estudiados, el TCR cruza en diagonal el surco de unión al péptido, uniéndose mediante las asas hipervariables V_α y V_β a las paredes del surco y del péptido (**Figura 25–55**). Actualmente los complejos solubles MHC-péptido se utilizan mucho en la detección de linfocitos T que presenten especificidades concretas, oligomerizándolos incluso en tetrámeros con objeto de incrementar su avidez por los receptores de los linfocitos T al poderse unir a cuatro TRC.

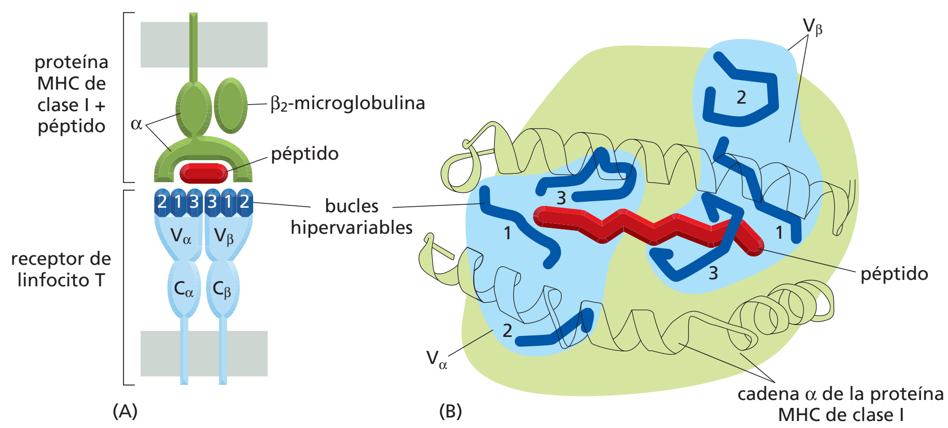


Figura 25–55 Interacción de un receptor de linfocito T con un péptido vírico unido a una proteína MHC de clase I. (A) Esquema de los bucles hipervariables de los dominios V_α y V_β del receptor del linfocito T interaccionando con el péptido y las paredes del surco de unión al péptido de la proteína MHC. Obsérvese que el tercer bucle hipervariable, que es el más variable, inicialmente interacciona con el péptido, mientras que los otros bucles hipervariables se unen a las paredes del surco de unión al péptido. (B) Esquema de la silueta de los dominios V (en *azul claro*) y de los bucles hipervariables (en *azul oscuro*) del receptor sobre el surco de unión al péptido, determinado por difracción de rayos X. El dominio V_α cubre la mitad amino del péptido, mientras que el dominio V_β cubre la mitad carboxilo. Obsérvese que el receptor está orientado en diagonal, cruzando el surco de unión al péptido. (B, adaptado de D.N. Garboczi et al., *Nature* 384:134-141, 1996. Con la autorización de Macmillan Publishers Ltd.)

Tabla 25–2 Propiedades de las proteínas MHC de clase I y de clase II humanas

	CLASE I	CLASE II
Loci genéticos	*HLA-A, HLA-B, HLA-C*	*DP, DQ, DR*
Estructura de la cadena	cadena $\alpha + \beta_2$-microglobulina	cadena α + cadena β
Distribución celular	la mayoría de células nucleadas	células dendríticas, linfocitos B, macrófagos, células epiteliales del timo y algunas otras
Presenta antígenos a	linfocitos T citotóxicos	linfocitos T colaboradores, linfocitos T reguladores
Origen de los fragmentos de péptido	principalmente proteínas sintetizadas en el citoplasma	principalmente proteínas de membrana y extracelulares endocitadas
Dominios polimórficos	$\alpha_1 + \alpha_2$	$\alpha_1 + \beta_1$
Reconocidas por el correceptor	CD8	CD4

Las proteínas MHC ayudan a dirigir a los linfocitos T hacia las dianas adecuadas

En principio, las proteínas MHC de clase I se expresan en casi todas las células nucleadas. Probablemente se debe a que los linfocitos T citotóxicos efectores deben ser capaces de reconocer y eliminar cualquier célula del organismo que sea infectada por un microorganismo intracelular, como podría ser un virus. Por el contrario, las proteínas de clase II solamente se expresan en células que captan antígenos extraños del medio extracelular e interaccionan con los linfocitos T colaboradores. Estas células también expresan proteínas MHC de clase I. Se incluyen las células dendríticas, las cuales en un primer momento activan tanto a los linfocitos T colaboradores vírgenes como a las dianas de los mismos, es decir, a los macrófagos y a los linfocitos B.

Es importante que los linfocitos T citotóxicos centren su ataque principalmente sobre las células que *producen* los antígenos extraños (como pueden ser proteínas víricas), mientras que los linfocitos T colaboradores centren su ayuda sobre todo en las células que captan antígenos extraños del medio extracelular. El primer tipo de célula diana siempre constituye una amenaza y el segundo es esencial para la defensa inmunitaria adquirida del organismo, por lo que es de vital importancia que los linfocitos T nunca confundan ambos tipos de células y dirijan incorrectamente sus funciones citotóxica y colaboradora. En consecuencia, junto con el receptor del antígeno, que reconoce un complejo MHC-péptido, cada una de las tres clases principales de linfocitos T expresa un *correceptor* que reconoce de forma separada una parte invariante de la clase apropiada de proteína MHC. Estos dos correceptores, denominados CD4 y CD8, ayudan a dirigir a los linfocitos T colaboradores (y reguladores) y a los citotóxicos, respectivamente, a sus dianas adecuadas. En la **Tabla 25–2** se revisan las propiedades de las proteínas MHC de clase I y de clase II.

Los correceptores CD4 y CD8 se unen a regiones invariables de las proteínas MHC

Generalmente, la afinidad de los TCR por los complejos MHC-péptido de la célula diana es demasiado baja para inducir por sí misma una interacción funcional entre las dos células. Así, los linfocitos T requieren *receptores accesorios* para estabilizar la interacción, ya que éstos aumentan la fuerza total de la adhesión intercelular. A diferencia de los TCR o de las proteínas MHC, los receptores accesorios no unen antígenos extraños y son invariables.

Cuando los receptores accesorios adquieren un papel esencial en la activación de los linfocitos T, al generar sus propias señales intracelulares, se denominan **correceptores**. Los más importantes y mejor conocidos son las moléculas CD4 y CD8, que son proteínas transmembrana de paso único con dominios extracelulares homólogos a Ig. Como los TRC, los correceptores reconocen a las proteínas MHC, pero se diferencian de ellos en que se unen a regiones invariables de la proteína, lejos del surco de unión al péptido. El correceptor **CD4** se expresa tanto en los linfocitos T colaboradores como en los reguladores y reconoce a las moléculas MHC de clase II, mientras que el correceptor **CD8** se expresa en los linfocitos T citotóxicos e interacciona con las moléculas MHC de clase I (**Figura 25–56**). CD4 y CD8 contribuyen al reconocimiento que realizan los linfocitos T y facilitan que dichas células se centren en un tipo concreto de proteínas MHC y, por tanto, en un tipo concreto de célula diana: el reconocimiento de las proteínas MHC de clase I permite a los linfocitos T citotóxicos cen-

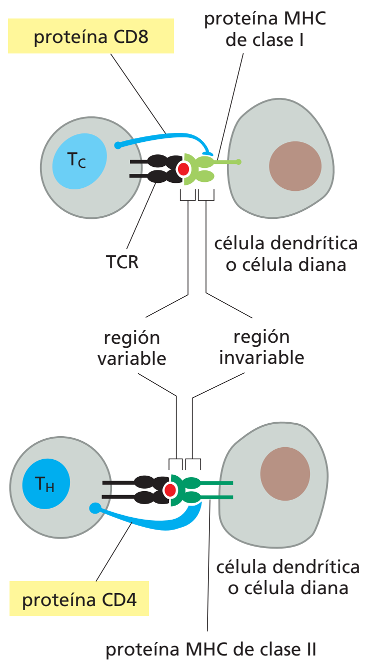


Figura 25–56 Correceptores CD4 y CD8 de la membrana plasmática de linfocitos T. Los linfocitos T citotóxicos (T_C) expresan CD8, que reconocen proteínas MHC de clase I, mientras que los linfocitos T colaboradores (T_H) y los linfocitos T reguladores (no mostrados) expresan CD4, que reconocen proteínas MHC de clase II. Obsérvese que estos correceptores se unen a la misma proteína MHC a la cual ya estaba unido el TCR, de modo que se mantienen adosados a estos receptores durante el proceso de reconocimiento del antígeno. Mientras que el TCR se une a las regiones variables (polimórficas) de la proteína MHC que conforman el surco de unión al péptido, el correceptor se une a una región invariable fuera del surco.

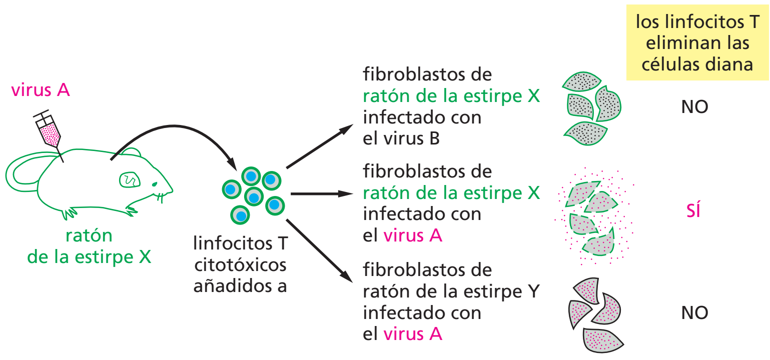


Figura 25–57 Un experimento clásico que demuestra que los linfocitos T citotóxicos efectores reconocen, además del antígeno vírico, algún elemento de la superficie de la célula diana. Ratones de la estirpe X son infectados con el virus A. Al cabo de siete días, los bazos de estos ratones contienen linfocitos T citotóxicos capaces de eliminar fibroblastos de la estirpe X en cultivo infectados por el virus. Tal como se esperaba, estos linfocitos únicamente destruyen los fibroblastos infectados por el virus A, pero no los infectados por otro virus B. Así pues, los linfocitos T citotóxicos son específicos del virus. Sin embargo estos mismos linfocitos son incapaces de eliminar fibroblastos de ratones de la estirpe Y infectados con el mismo virus A, lo cual indica que los linfocitos T citotóxicos no sólo reconocen los virus sino también alguna diferencia genética entre ambos tipos de fibroblastos. Se utilizaron estirpes especiales de ratones (conocidas como *cepas congénitas*) que eran genéticamente idénticas, excepto para los alelos de sus loci MHC de clase I, o eran genéticamente diferentes excepto para dichos alelos. De este modo, se encontró que la destrucción de células diana infectadas requiere que dichas células expresen, al menos, uno de los alelos MHC de clase I que los expresados por el ratón infectado al inicio. Este resultado indica que las proteínas MHC de clase I son de algún modo necesarias para presentar los antígenos víricos unidos a la superficie a los linfocitos T citotóxicos y además lo hacen de modo muy específico.

trarse en cualquier célula huésped, mientras que el reconocimiento de las proteínas MHC de clase II permite a los linfocitos T colaboradores centrarse en un pequeño grupo de células, principalmente células dendríticas, macrófagos y linfocitos B. La cola citoplasmática de las proteínas CD4 y CD8 se halla asociada a un miembro de la familia Src de proteínas quinasa citoplasmáticas específicas de tirosina. Dicha proteína, denominada *Lck*, fosforila diversas proteínas intracelulares en los residuos de tirosina, participando así en la activación de los linfocitos T (descrito en el Capítulo 15). Los anticuerpos que reconocen CD4 y CD8 son herramientas útiles para poder diferenciar los tipos principales de linfocitos T, tanto en humanos como en animales de experimentación: sólo los linfocitos T citotóxicos expresan CD8, mientras que los linfocitos T colaboradores y los reguladores expresan CD4.

El virus del sida (HIV) utiliza las moléculas CD4 (así como receptores de quimioquinas) para infectar los linfocitos T colaboradores. Puesto que el sida reduce los linfocitos T colaboradores, los pacientes de sida son susceptibles a ser infectados por microorganismos que, en condiciones normales, no son patógenos. En consecuencia, muchos pacientes de sida mueren por infecciones a los pocos años del inicio de los síntomas, si no son tratados con una combinación de fármacos muy potentes contra el virus. El HIV también utiliza CD4 y receptores de quimioquinas para infectar macrófagos, los cuales tienen en su membrana ambos tipos de receptores.

Antes de que un linfocito T citotóxico o un linfocito T colaborador reconozcan una proteína extraña, ésta tiene que haber sido procesada en el interior de una célula presentadora de antígeno o de una célula diana, y mostrada en la superficie de dichas células como complejos MHC-péptido. A continuación, se describirá cómo las células presentadoras de antígenos o las células diana infectadas por un virus procesan las proteínas virales presentándolas a los linfocitos T citotóxicos. Más adelante se examinará cómo se procesan las proteínas ajenas para ser presentadas a los linfocitos T colaboradores.

Los linfocitos T citotóxicos responden a fragmentos de proteínas citosólicas extrañas asociadas a proteínas MHC de clase I

Un experimento realizado en la década de 1970 demostró de modo contundente la implicación de las proteínas MHC de clase I en el reconocimiento de los antígenos virales por parte de los linfocitos T citotóxicos. Los investigadores observaron que en ratones infectados por virus, los linfocitos T citotóxicos efectores destruían células cultivadas infectadas con el mismo virus sólo si dichas células expresaban alguna de las moléculas de la misma clase MHC I del ratón infectado. Este experimento demostró que los linfocitos T citotóxicos de cualquier individuo sólo reconocerán un antígeno determinado en una célula diana si dicha célula diana expresa alguna de las formas alélicas de las proteínas MHC de clase I expresadas por ese mismo individuo, un fenómeno conocido como *restricción MHC* (**Figura 25–57**).

Experimentos posteriores sugirieron que para eliminar una célula infectada por virus, los linfocitos T citotóxicos reconocen fragmentos degradados de las proteínas internas del virus que se hallaban unidos a proteínas MHC de clase I en la superficie de la célula infectada. Debido a que los linfocitos T pueden reconocer minúsculas cantidades del antígeno extraño (tan sólo de 1 a 10 complejos MHC-péptido en el caso de los linfocitos T con receptores de mayor afinidad), para inducir el ataque de los linfocitos T citotóxicos sólo es necesario que una pequeña fracción de los fragmentos generados a partir de las proteínas víricas se una a proteínas MHC de clase I y alcance la membrana plasmática.

Las proteínas víricas interiores se sintetizan en el citoplasma de la célula infectada. Como se señaló en el Capítulo 3, en el citosol la degradación proteolítica se lleva a cabo principalmente por un mecanismo dependiente de ATP y de ubiquitina que actúa en los *proteosomas* –grandes complejos de enzimas proteolíticas construidas a partir de muchas subunidades proteicas distintas. Puesto que probablemente todos los proteosomas pueden generar fragmentos peptídicos de longitud adecuada para encajar en el surco de las proteínas MHC de clase I, incluso los proteosomas bacterianos, se sugiere que este surco se desarrolló para encajar péptidos de dicha longitud. No obstante, parece que algunos proteosomas se han especializado en producir péptidos para las proteínas MHC de clase I, ya que contienen dos subunidades codificadas por genes localizados en la misma región MHC del cromosoma.

¿Cuál es el mecanismo por el que los péptidos generados en el citosol interaccionan con los surcos de unión a péptidos de las proteínas MHC de clase I en el lumen del retículo endoplasmático (ER) (**Figura 25–58**)? La respuesta se obtuvo inicialmente a través de observaciones realizadas en células mutantes en las que las moléculas MHC de clase I no se expresan en la membrana plasmática sino que se degradan en el interior de la célula. Los genes mutantes de dichas células resultaron codificar las subunidades de una proteína perteneciente a la familia de los *transportadores ABC*, que se describió en el Capítulo 11. Este transportador se localiza en la membrana del ER y utiliza la energía de hidrólisis del ATP para bombear péptidos desde el citosol hacia el lumen del ER. Los genes que codifican estas dos subunidades están localizados en la región cromosómica MHC; si algunos de estos genes resulta inactivado por una mutación, las células son incapaces de suministrar péptidos a las moléculas MHC de clase I. En estas células mutantes, las proteínas MHC de clase I son degradadas en el interior de la célula, sin alcanzar la superficie celular, debido a que, normalmente, para que estas proteínas se plieguen de modo correcto es necesaria la unión de los péptidos: hasta que se une al péptido, una proteína MHC de clase I permanece en el ER, unida a un transportador ABC a través de una proteína chaperona; en las células mutantes, si el péptido no está unido, la proteína MHC queda atrapada y finalmente sufrirá proteolisis (**Figura 25–59**).

En todas las células, los fragmentos peptídicos proceden de las propias proteínas citosólicas y nucleares que son degradadas en el proceso de reciclaje normal de proteínas y pro-

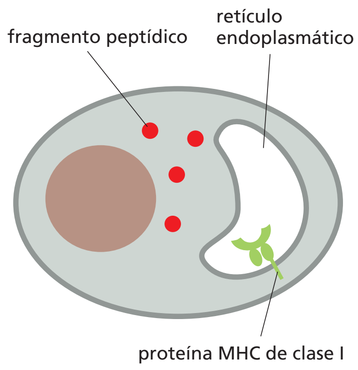


Figura 25–58 El problema del transporte del péptido. ¿Cómo pasan los fragmentos peptídicos desde el citoplasma, donde son producidos, hasta la luz del ER, donde se localizan las proteínas MHC de clase I? Es necesario un mecanismo específico de transporte.

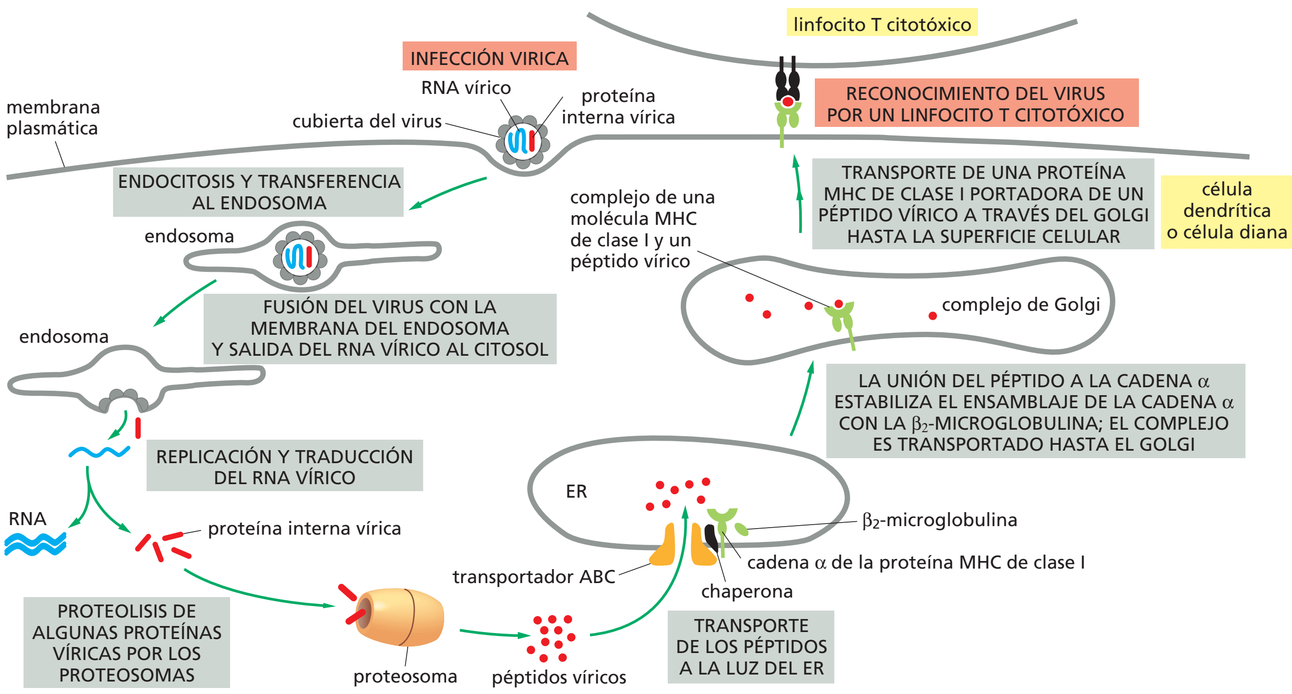


Figura 25–59 Procesamiento de una proteína vírica para su presentación a los linfocitos T citotóxicos. Un linfocito T citotóxico eliminará una célula infectada por virus cuando reconozca en su superficie fragmentos de una proteína interna vírica unida a moléculas MHC clase I. Aunque no todos los virus entran en la célula por la vía que utiliza este virus de RNA, los fragmentos de las proteínas internas del virus siempre siguen la vía representada. Únicamente es degradada y transportada a la membrana plasmática una pequeña proporción de proteínas víricas sintetizadas en el citosol, pero es suficiente para desencadenar el ataque de un linfocito T citotóxico. Diversas proteínas chaperonas (sólo se muestra una de ellas) en la luz del retículo endoplasmático colaboran en el plegamiento y la oligomerización de las proteínas MHC de clase I. Las chaperonas se unen a la cadena α de la proteína MHC de clase I y actúan de manera secuencial. La última, tal como muestra la figura, facilita la interacción entre la proteína MHC y el transportador ABC. La oligomerización de las proteínas MHC de clase I y su transporte hasta la membrana plasmática requiere la unión al péptido.

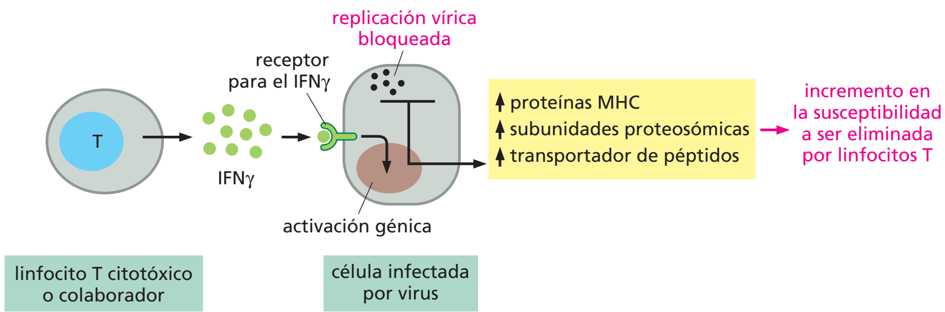


Figura 25–60 Algunos efectos del interferón-γ (IFNγ) sobre células infectadas por virus. Los receptores de IFNγ, cuando son activados, estimulan vías de señalización hacia el núcleo y alteran la transcripción génica, lo que conduce a los efectos indicados. Los efectos sombreados en *amarillo* tienden a hacer de las células infectadas una mejor diana para los linfocitos T citotóxicos, estimulando así su eliminación.

cesos de control de calidad. (Sorprendentemente, más del 30% de las proteínas fabricadas por las células de mamífero son en apariencia defectuosas y después de ser sintetizadas son degradadas en proteosomas.) Dichos péptidos son bombeados de forma constante al interior del ER y transportados a la superficie celular por proteínas MHC de clase I. Sin embargo, no son antigénicos debido a que los linfocitos T citotóxicos que podrían reconocerlos han sido eliminados o inactivados, o suprimidos por linfocitos T reguladores, durante el proceso de la autotolerancia (véase Figura 25–13).

Cuando un antígeno activa a los linfocitos T citotóxicos o a los T colaboradores T_H1, dichas células efectoras secretan **interferón–γ (IFNγ)**, citoquina que intensifica en gran medida las respuestas antivíricas. El IFNγ actúa de dos maneras sobre las células infectadas por virus: bloquea la replicación del virus e incrementa la expresión de muchos genes de la región cromosómica MHC, incluyendo los que codifican las proteínas MHC de clase I, las dos subunidades especializadas de los proteosomas y las dos subunidades del transportador de péptidos localizado en el ER (**Figura 25–60**). Así, la maquinaria de la célula huésped que se requiere para la presentación del antígeno vírico a los linfocitos T citotóxicos entra en acción de forma coordinada mediante el IFN-γ y genera una retroalimentación positiva que amplifica la respuesta inmunitaria y culmina con la muerte de la célula infectada.

Los linfocitos T colaboradores responden a fragmentos de proteínas antigénicas extrañas endocitadas y asociadas con proteínas MHC de clase II

A diferencia de los linfocitos T citotóxicos, los linfocitos T colaboradores no actúan directamente destruyendo células infectadas, sino que estimulan a los macrófagos a que resulten más efectivos en la destrucción de microorganismos intracelulares y colaboran con linfocitos B y linfocitos T citotóxicos en su respuesta frente al antígeno.

Como en el caso de los antígenos víricos presentados a los linfocitos T citotóxicos, los antígenos presentados a los linfocitos T colaboradores por las células dendríticas o por las células diana son fragmentos de degradación de la proteína extraña, que se unen a las proteínas MHC de clase II de manera similar a como los péptidos derivados de virus se unen a las proteínas MHC de clase I. Pero por lo general, tanto el origen de los fragmentos peptídicos presentados como la vía que siguen para encontrar las proteínas MHC son diferentes.

En lugar de obtenerse a partir de proteínas extrañas sintetizadas en el citoplasma de la célula diana, los péptidos presentados a los linfocitos T colaboradores se generan en endosomas. Algunos proceden de microorganismos extracelulares o de sus productos, que han sido endocitados por las células presentadoras de antígeno y degradados en el entorno ácido de los endosomas. Otros proceden de microorganismos que se desarrollan en el interior del compartimiento endosomal de las células presentadoras de antígeno. En ningún caso estos péptidos tienen que ser bombeados a través de la membrana porque se han generado en un compartimiento que es topológicamente equivalente al espacio extracelular. En lugar de penetrar en el lumen del ER, donde se sintetizan y ensamblan las proteínas MHC de clase II, se unen en un compartimiento endosómico a los heterodímeros de clase II ya ensamblados. Cuando se ha unido al péptido, la proteína MHC de clase II altera su conformación atrapando al péptido en el surco de unión y transfiriéndolo a la superficie celular para su presentación a los linfocitos T colaboradores.

Las moléculas MHC de clase II recién sintetizadas deben evitar colapsar su surco de unión de modo prematuro en el lumen del ER con péptidos bombeados desde el citosol. Para

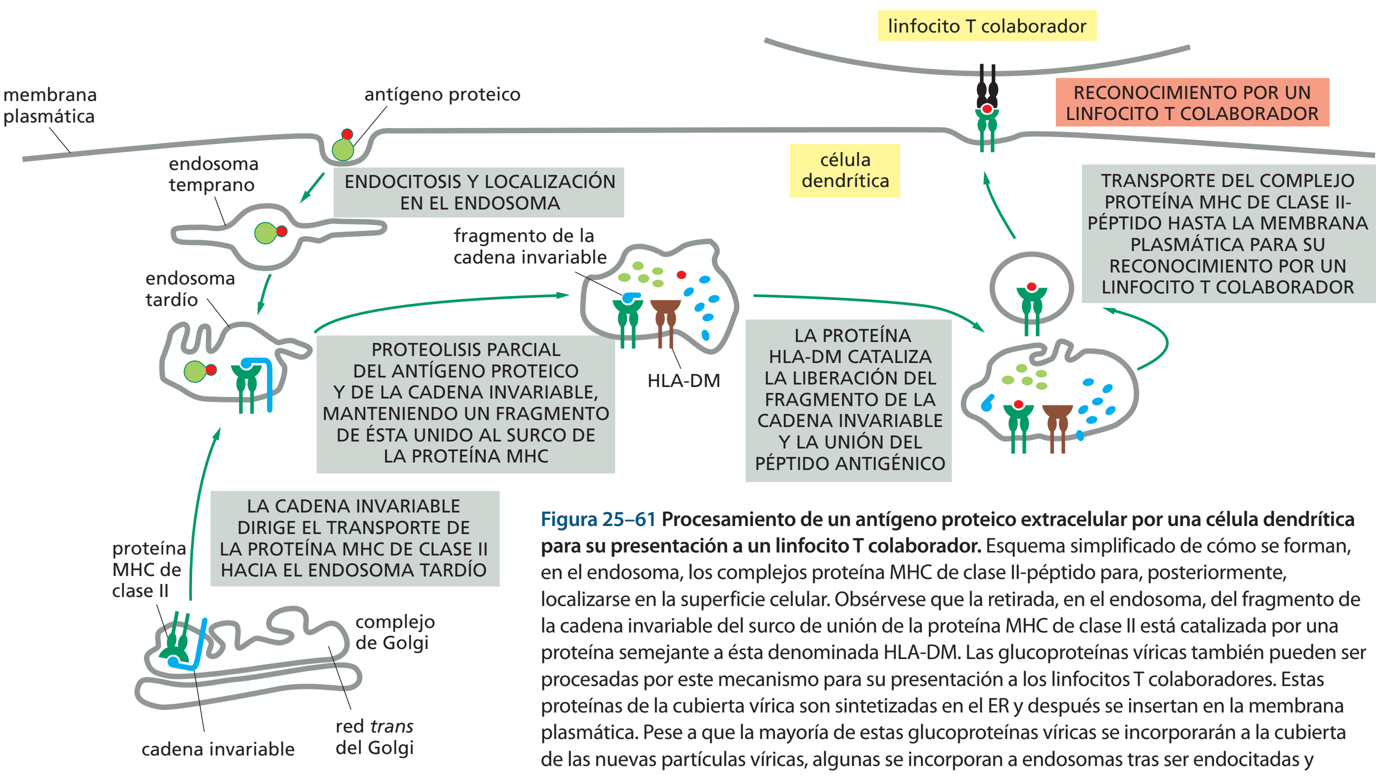


Figura 25–61 Procesamiento de un antígeno proteico extracelular por una célula dendrítica para su presentación a un linfocito T colaborador. Esquema simplificado de cómo se forman, en el endosoma, los complejos proteína MHC de clase II-péptido para, posteriormente, localizarse en la superficie celular. Obsérvese que la retirada, en el endosoma, del fragmento de la cadena invariable del surco de unión de la proteína MHC de clase II está catalizada por una proteína semejante a ésta denominada HLA-DM. Las glucoproteínas víricas también pueden ser procesadas por este mecanismo para su presentación a los linfocitos T colaboradores. Estas proteínas de la cubierta vírica son sintetizadas en el ER y después se insertan en la membrana plasmática. Pese a que la mayoría de estas glucoproteínas víricas se incorporarán a la cubierta de las nuevas partículas víricas, algunas se incorporan a endosomas tras ser endocitadas y entran así en la ruta MHC de clase II.

evitar esta unión prematura, un polipéptido especial denominado **cadena invariable** se asocia a los heterodímeros MHC de clase II recién sintetizados en el ER. Este polipéptido ocupa parcialmente el surco de unión al péptido de las proteínas MHC e impide de este modo la unión de péptidos en el lumen del ER. La cadena invariable también dirige a las moléculas MHC de clase II desde la red *trans* del Golgi al compartimiento endosomal tardío, donde se proteoliza quedando sólo un pequeño fragmento unido al surco de unión al péptido de la proteína MHC. A continuación, el péptido se libera permitiendo a las proteínas MHC unirse a los péptidos derivados de las proteínas endocitadas (**Figura 25–61**). De este modo se mantienen las diferencias funcionales existentes entre las proteínas MHC de clase I y de clase II. En efecto, las primeras presentan fundamentalmente moléculas que proceden del citosol mientras que las segundas presentan sobre todo moléculas generadas en el compartimiento endocítico.

Sin embargo, esta diferencia en la presentación del antígeno a los linfocitos T citotóxicos y a los linfocitos T colaboradores no es absoluta. Por ejemplo, las células dendríticas tienen que ser capaces de activar a los linfocitos T citotóxicos para que eliminen las células infectadas por virus incluso cuando las propias células dendríticas no han sido infectadas por el virus. Para ello, las células dendríticas utilizan un mecanismo denominado **presentación cruzada**, que comienza cuando fagocitan fragmentos de células infectadas por virus. A continuación transportan las proteínas víricas desde el interior del fagosoma hasta el citosol, donde son degradadas en los proteosomas; los fragmentos de proteínas víricas resultantes son transportados entonces hasta el lumen del ER, donde se incorporan a las proteínas MHC de clase I que allí se ensamblan. La presentación cruzada en las células dendríticas también actúa en la activación de los linfocitos T citotóxicos contra los antígenos tumorales de las células cancerosas y contra las proteínas MHC de los órganos ajenos trasplantados.

Muchas de las moléculas MHC de clase I y de clase II de la superficie de una célula diana presentan, en el surco de unión, péptidos derivados de las propias proteínas celulares. En el caso de las proteínas de clase I, se trata fundamentalmente de fragmentos de proteínas citosólicas y nucleares y, en el caso de las moléculas de clase II, son sobre todo fragmentos de proteínas de membrana y de proteínas extracelulares que son endocitadas. Sólo una pequeña fracción de las cerca de 10^5 proteínas MHC de clase I de la superficie de una célula presentadora de antígeno tendrán péptidos extraños unidos a ellas. Sin embargo, una sola copia del complejo MHC-péptido en una célula dendrítica es suficiente para estimular a un linfocito T colaborador cuyo TCR sea capaz de reconocer dicho complejo con suficiente afinidad.

Los linfocitos T útiles en potencia son seleccionados positivamente en el timo

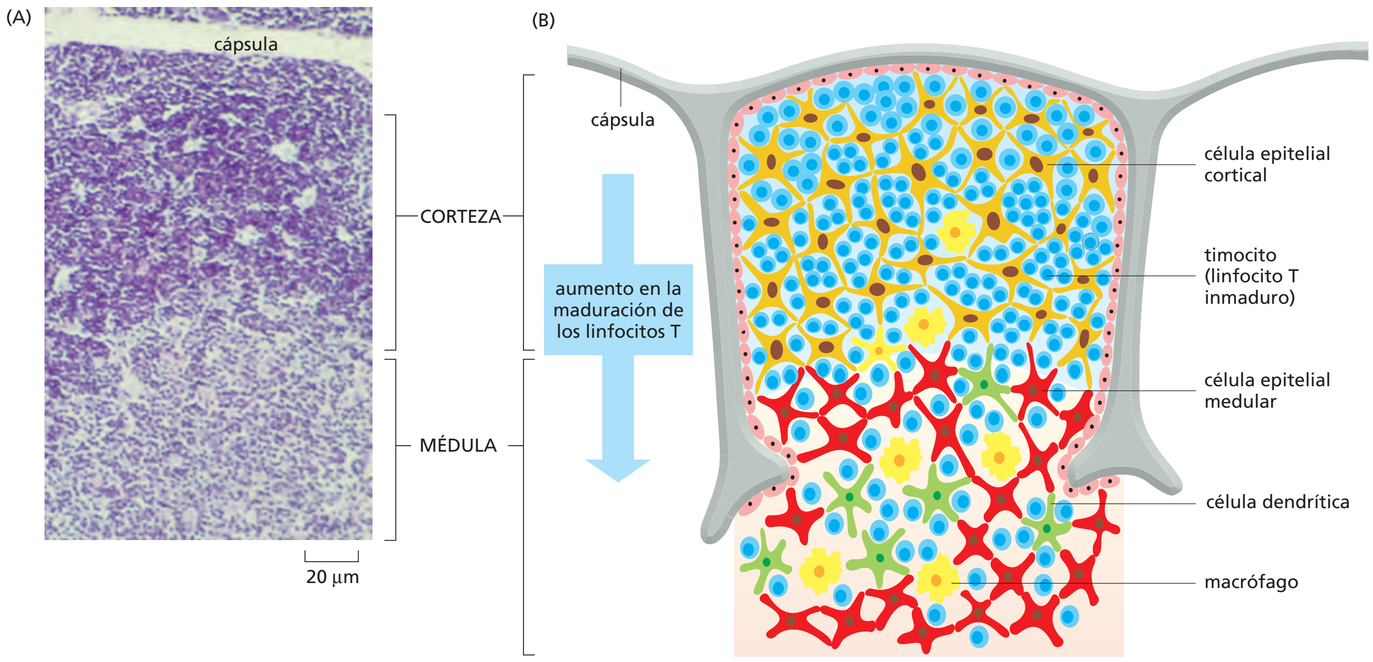
Los linfocitos T reconocen antígenos asociados a las proteínas MHC propias, pero no asociados a proteínas MHC extrañas (véase Figura 25–57): es decir, los linfocitos T muestran *restricción MHC*. Dicha restricción refleja un proceso de **selección positiva** durante el desarrollo de los linfocitos T en el timo. En este proceso, los linfocitos T inmaduros (*timocitos*), capaces de reconocer péptidos extraños presentados por proteínas MHC propias, son seleccionados y sobreviven y maduran, mientras que la mayoría de los restantes, que posiblemente no serían útiles para el animal, entran en apoptosis. Así, la restricción MHC es una propiedad del sistema inmunitario que se manifiesta durante el desarrollo de los linfocitos T en el timo.

La manera más directa de estudiar el proceso de selección es hacer un seguimiento del destino de un conjunto de linfocitos T de especificidad conocida. Esto se puede realizar utilizando ratones transgénicos para los genes de un par específico de cadenas α y β del TCR, genes que proceden de un clon de linfocitos T de especificidades MHC y antigénica conocidas. Tales experimentos muestran que los linfocitos T transgénicos sólo maduran en el timo y colonizan los órganos linfoides periféricos si el ratón transgénico expresa la misma forma alélica de proteína MHC que es reconocida por el TCR transgénico. Si el ratón no expresa la proteína MHC apropiada, los linfocitos T transgénicos mueren en el timo. De este modo, la supervivencia y maduración de un linfocito T en desarrollo dependen del emparejamiento entre su TRC y las proteínas MHC expresadas en el timo (que tienen unidos péptidos propios derivados de las propias proteínas del organismo). Experimentos similares utilizando ratones transgénicos cuya expresión de proteínas MHC está confinada a determinados tipos celulares del timo indican que las responsables de este proceso de selección positiva son las proteínas MHC expresadas por las células epiteliales del cortex (**Figura 25–62**).

La estimulación continuada por los complejos MHC-péptido propio (y de la citoquina *IL7*) es necesaria para que los linfocitos T seleccionados positivamente sobrevivan como linfocitos T vírgenes una vez abandonan el timo; esta estimulación basta para estimular la supervivencia de los linfocitos T pero no para activarlos y convertirlos en linfocitos efectores o de memoria.

Como parte del proceso de selección positiva en el timo, se seleccionan los linfocitos T que expresan TCR que reconocen proteínas MHC de clase I, dando lugar a linfocitos T citotóxicos, mientras que la selección de los que expresan TCR que reconocen proteínas MHC de clase II tiene como resultado a los linfocitos T colaboradores o a los linfocitos T reguladores. De esta manera, los ratones genéticamente deficientes en proteínas MHC de clase I también lo son en linfocitos T citotóxicos, mientras que los que son deficientes en proteínas

Figura 25–62 Organización celular del timo humano. (A) Micrografía obtenida con el microscopio óptico de un corte histológico de timo en el que se indica la corteza y la médula de un lóbulo. (B) Dibujo de un lóbulo que muestra la composición celular. La corteza contiene timocitos inmaduros y la médula timocitos maduros. Los timocitos, los macrófagos y las células dendríticas se desarrollan a partir de células que migran desde la médula ósea. Las funciones de las diferentes regiones y tipos celulares se tratarán más adelante, cuando se estudie el mecanismo de selección para la supervivencia de los timocitos en desarrollo. Debido a este proceso de selección, más del 95% de los timocitos producidos en el timo mueren por apoptosis. Las células muertas son rápidamente fagocitadas y digeridas por los macrófagos. (Adaptado de K. Murphy et al., Janeway's Immunobiology, 7.ª ed. New York: Garland Science, 2008.)



MHC de clase II carecen tanto de linfocitos T colaboradores como de linfocitos T reguladores. El desarrollo de los linfocitos T reguladores depende de grupos especiales de células epiteliales que se encuentran en la médula del timo denominados *corpúsculos de Hassall*.

Los linfocitos que se encuentran inmersos en un proceso de selección positiva, inicialmente expresan tanto correceptores CD4 como correceptores CD8, siendo ambos necesarios para el proceso de selección. En efecto, sin CD4 los linfocitos T colaboradores y los linfocitos T reguladores no se desarrollan y sin CD8 son los linfocitos T citotóxicos los afectados. Una vez desarrollados, los linfocitos T citotóxicos pierden CD4; los linfocitos T colaboradores y los reguladores pierden CD8.

Además, la selección positiva deja todavía por resolver un gran problema. Si los linfocitos T citotóxicos y los linfocitos T colaboradores en desarrollo con receptores, que reconocen péptidos propios asociados a proteínas MHC propias, maduraran en el timo y migraran hacia los tejidos linfoides periféricos, causarían estragos. Para evitar este potencial desastre se requiere un segundo proceso de *selección negativa* en el timo.

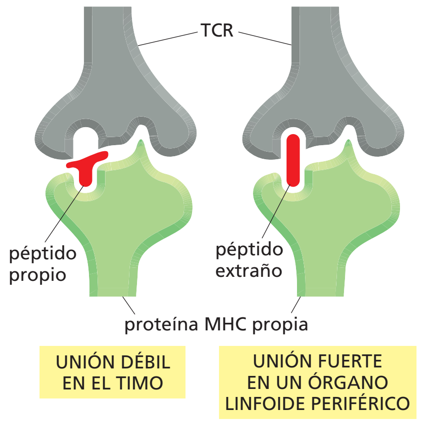


Figura 25–63 Esquema que muestra cómo un TCR seleccionado en el timo, al reconocer débilmente a un complejo proteína MHC y péptido propios, reconoce en cambio fuertemente la misma proteína MHC unida a un péptido extraño. Puesto que la unión al complejo con péptido propio es débil, y el péptido extraño no está presente en el timo, el timocito que expresa dicho TCR será seleccionado positivamente en el timo, evitando la selección negativa.

La mayoría de los linfocitos T citotóxicos y colaboradores en desarrollo que podrían ser activados por los complejos MHC-péptido propio son eliminados en el timo

Como se ha indicado, una característica fundamental del sistema inmunitario adquirido es que puede aprender a distinguir lo propio de lo no propio (extraño) y habitualmente no reacciona contra moléculas propias. Un mecanismo importante para conseguir este estado de autotolerancia inmunológica es la eliminación en el timo de los linfocitos T citotóxicos y colaboradores autorreactivos. Es decir, aquellos linfocitos T cuyos TCR se unen con suficiente intensidad a un complejo de proteína MHC-péptido propio como para ser activados. Tal como se describirá más adelante, debido a que la mayoría de linfocitos B requieren de linfocitos T colaboradores para responder frente al antígeno, la eliminación de los linfocitos T colaboradores autorreactivos también asegura que cualquier linfocito B autorreactivo que escape a los mecanismos de inducción de tolerancia sea inocuo (véase Figura 25–13).

Antes de estudiar el proceso de selección negativa por el cual los linfocitos T autorreactivos son eliminados del timo, es conveniente analizar la lógica de este sistema en dos etapas que finaliza con la selección de una pequeña fracción de linfocitos T en desarrollo que expresan TCR que se unen débilmente a una proteína MHC propia portadora de un péptido propio. Como ilustra la **Figura 25–63**, se supone que la producción de un extenso repertorio de este tipo de linfocitos garantiza que al menos algunos de ellos puedan unirse con fuerza al complejo formado por un péptido extraño con la misma proteína MHC e inducir así una respuesta inmunitaria adquirida. Por supuesto no es suficiente con que en el timo se seleccionen *positivamente* los linfocitos T que reconocen proteínas MHC propias; también se tienen que seleccionar *negativamente* aquellos linfocitos T citotóxicos y linfocitos T colaboradores que pudieran reconocer complejos de proteínas MHC-péptidos propios en los órganos linfoides periféricos. Así, se alcanzará el objetivo principal si (1) mueren los linfocitos T citotóxicos y linfocitos T colaboradores que se unen *fuertemente* a los complejos MHC-péptidos propios en el timo, mientras (2) se estimula la supervivencia de los que se unen débilmente y (3) se induce la muerte de aquellos linfocitos T que no se unen. El proceso 2 representa la mayor parte de la selección positiva ya descrita. El proceso 1 se denomina **selección negativa** o eliminación clonal en el timo (véase Figura 25–13). En los procesos 1 y 3 la muerte de los linfocitos se produce por apoptosis (**Figura 25–64**).

De nuevo, la prueba más convincente de la selección negativa en el timo procede de experimentos realizados con ratones transgénicos. Si se introducen transgenes de TCR que codifican un receptor que reconoce un antígeno peptídico específico de los machos; las hembras, que no expresan dicho péptido, presentan tanto en el timo como en los órganos linfoides periféricos numerosos linfocitos T maduros que expresan el receptor transgénico. Sin embargo, son pocos los linfocitos de ese tipo que se encuentran en los ratones macho, ya que la mayoría de ellos mueren en el timo antes de madurar. Al igual que la selección positiva, la selección negativa requiere de la interacción entre un TCR, asociado a un correceptor CD4 o CD8, y una proteína MHC apropiada. Sin embargo, a diferencia de la selección positiva de los linfocitos T colaboradores y citotóxicos, que tiene lugar principalmente en la superficie de las células epiteliales de la corteza del timo, la selección negativa de estos linfocitos se produce en la médula del timo, sobre todo en la superficie de células dendríticas que proceden de células que han migrado al timo desde la médula ósea.

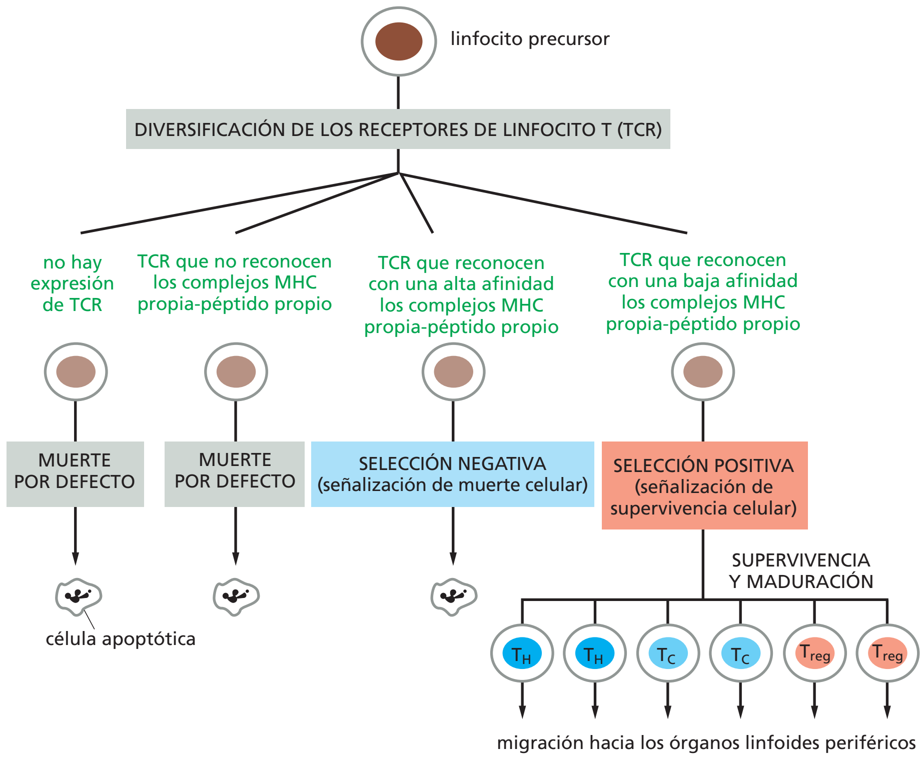


Figura 25–64 Selecciones positiva y negativa en el timo. Sólo podrán sobrevivir, madurar y migrar hacia los órganos linfoides periféricos, es decir, seleccionarse de manera positiva (véase Figura 25–63), aquellos linfocitos cuyos TCR los capaciten para responder a los complejos formados por las proteínas MHC propias y péptidos extraños. El resto de linfocitos experimentará apoptosis al no expresar TCR que reconozcan los complejos formados por las proteínas MHC propias y péptidos extraños o porque reconocen dichos complejos con demasiada intensidad y sufren, por ello, selección negativa.
Aunque no se indique, los linfocitos inmersos en la selección positiva expresan incialmente tanto correceptores CD4 como CD8. En el transcurso de la selección positiva, los linfocitos T colaboradores (T_H), los T citotóxicos (T_C), y los T reguladores (T_{reg}) divergen mediante un mecanismo poco conocido. A lo largo de este proceso, los linfocitos T colaboradores y los T reguladores maduran expresando CD4 pero no CD8, reconociendo péptidos asociados a moléculas MHC de clase II, mientras que los linfocitos T citotóxicos expresan CD8 pero no CD4 y reconocen péptidos asociados a moléculas MHC de clase I.

Algunas de las proteínas específicas de órgano se expresan de modo ectópico en la médula del timo

Tras descubrir la selección negativa de los linfocitos T que se desarrollan en el timo, la cuestión que se planteó fue de qué forma los linfocitos T evitan reaccionar contra las proteínas propias no presentes en el timo. Una explicación es que los linfocitos T potencialmente autorreactivos se eliminan o inactivan tras abandonar el timo. Este hecho ocurre cuando los linfocitos reconocen péptidos propios unidos a proteínas MHC en la superficie de células dendríticas que no han sido activadas por patógenos y que, por tanto, no presentan las señales activadoras adecuadas. Otra opción es que algunos linfocitos T efectores autorreactivos sean suprimidos por linfocitos T reguladores. Ambos mecanismos constituyen ejemplos de *tolerancia periférica* ya que, a diferencia de la eliminación de los linfocitos T que ocurre en el timo (*tolerancia central*), dichos mecanismos se producen fuera de él (véase Figura 25–13).

Se ha propuesto una tercera explicación. Un tipo especial de célula epitelial de la médula del timo expresa de modo ectópico proteínas cuya expresión se creía que está restringida a otros órganos; la insulina, por ejemplo, sintetizada por las células β en el páncreas, también es producida por un pequeño grupo de células epiteliales de la médula del timo. La expresión ectópica de muchas de estas proteínas, incluida la insulina, depende de una proteína nuclear denominada *regulador autoinmune* (*AIRE*: ***a****uto****i****mmune* ***re****gulator*), que se expresa de forma específica en las mismas células epiteliales del timo. La inactivación del gen que codifica AIRE en ratones y también en humanos ocasiona una grave enfermedad autoinmune multiorgánica; este hecho pone de manifiesto la importancia de AIRE en la tolerancia central en lo que concierne a las proteínas propias "específicas de órgano". Se desconoce el mecanismo por el cual AIRE induce la expresión ectópica de genes en la médula del timo.

La función de las proteínas MHC ayuda a explicar su polimorfismo

El papel de las proteínas MHC en la unión y presentación de antígenos extraños a los linfocitos T ayuda a explicar el gran polimorfismo de estas proteínas. En la batalla evolutiva entre patógenos y el sistema inmunitario adquirido, los patógenos tienden a modificar sus antígenos con objeto de evitar su asociación a proteínas MHC. Cuando un patógeno tiene éxito es capaz de arrasar una población a modo de epidemia. En tales circunstancias, los pocos individuos que expresan una nueva proteína MHC capaz de asociarse a un antígeno del pató-

geno modificado presentan una gran ventaja selectiva. Además, los individuos que tienen dos alelos diferentes (heterozigotos) para un determinado locus MHC tienen una mayor probabilidad de resistir la infección que los que tienen alelos idénticos para ese locus, ya que tienen una mayor capacidad para presentar péptidos procedentes de un amplio abanico de patógenos. Así, este tipo de selección tiende a promover y mantener una gran diversidad poblacional de proteínas MHC. Estudios realizados en África occidental refuerzan la idea de que las enfermedades infecciosas han sido la fuerza motora del polimorfismo de las proteínas MHC. En estos territorios viven individuos poco susceptibles a formas graves de malaria y que tienen unos determinados alelos MHC. Aunque estos alelos son, en conjunto, poco frecuentes, los presenta hasta un 25% de la población que vive en África occidental, donde esta forma de malaria es común.

Si una mayor diversidad de MHC significa una mayor resistencia a la infección, ¿por qué tan pocos loci codifican estas moléculas?, y ¿por qué no hemos desarrollado estrategias para incrementar su diversidad, por ejemplo mediante maduración alternativa de RNA o mediante mecanismos de recombinación genética encaminados a diversificar los anticuerpos y los TCR? Una posible explicación para esta diversidad restringida de las proteínas MHC es que cada vez que una nueva proteína MHC se añade al repertorio, se deben eliminar los linfocitos T cuyos TCR se unen fuertemente a los péptidos propios asociados a esa nueva proteína MHC, para mantener la autotolerancia. La eliminación de dichos linfocitos T debería contrarrestar la ventaja de añadir la nueva proteína MHC. Así, el número de proteínas MHC que expresamos representaría un equilibrio entre las ventajas de presentar una gran variedad de péptidos extraños a los linfocitos T y las desventajas de restringir el repertorio de linfocitos T mediante la selección negativa en el timo. Esta explicación es apoyada por el estudio de modelos asistidos por ordenador.

Resumen

Desde un punto de vista funcional existen tres clases principales de linfocitos T. Los linfocitos T citotóxicos eliminan directamente células infectadas induciéndolas a sufrir apoptosis. Los linfocitos T colaboradores activan la producción de anticuerpos en linfocitos B, activan los linfocitos T citotóxicos a que eliminen sus células diana, a las células dendríticas a que estimulen las respuestas mediadas por linfocitos T y a los macrófagos a que destruyan los microorganismos que los hayan invadido o que hayan sido fagocitados por ellos. Por último, los linfocitos T reguladores suprimen la actividad de los linfocitos T efectores y de las células dendríticas y son clave en la autotolerancia.

Todas las clases de linfocitos T expresan en la membrana plasmática receptores similares a los anticuerpos (TCR), que son codificados por genes que, a su vez, son organizados a partir de numerosos segmentos génicos durante el desarrollo de los linfocitos T en el timo. Los TCR reconocen fragmentos de proteínas ajenas cuando son expuestos en asociación con proteínas MHC en la superficie de las células huésped. Los linfocitos T son activados en los órganos linfoides periféricos por células presentadoras de antígeno, las cuales exponen en su membrana complejos MHC-péptido, proteínas coestimuladoras y diversas moléculas de adhesión intercelular. Las células presentadoras de antígeno más potentes son las células dendríticas, especializadas en la presentación de antígeno y necesarias para la activación de los linfocitos T vírgenes.

Las proteínas MHC de clase I y de clase II desempeñan un papel esencial en la presentación de antígenos extraños a los linfocitos T: las proteínas MHC de clase I presentan antígenos a los linfocitos T citotóxicos y las proteínas MHC de clase II presentan antígenos a los linfocitos T colaboradores y a los linfocitos T reguladores. Mientras que la expresión de las proteínas de clase I se da en casi todas las células de vertebrados, por lo general la expresión de las proteínas de clase II está restringida a aquellos tipos celulares que interaccionan con los linfocitos T colaboradores, tales como células dendríticas, macrófagos y linfocitos B.

Ambas clases de proteínas MHC tienen un solo surco de unión al péptido al cual se unen pequeños fragmentos peptídicos derivados de proteínas. Cada proteína MHC une un amplio conjunto de péptidos producidos de forma constante mediante los procesos de degradación intracelular habituales. Sin embargo, habitualmente las proteínas MHC de clase I se unen a fragmentos producidos en el citosol, mientras que las de clase II lo hacen a los fragmentos generados en los compartimientos endocíticos. Una vez formados en el interior de la célula diana, los complejos MHC-péptido son transportados a la membrana plasmática. Los complejos que contienen un péptido derivado de una proteína ajena son reconocidos por los TCR, los cuales interaccionan al mismo tiempo con el péptido y con las paredes del surco de la proteína MHC. Los linfocitos T también expresan correceptores CD4 y CD8 que reconocen simultáneamente, en las células presentadoras de antígeno o en las célu-

las diana, regiones no polimórficas de las proteínas MHC. Así, los linfocitos colaboradores y los reguladores expresan CD4 y reconocen proteínas MHC de clase II, mientras que los linfocitos T citotóxicos expresan CD8 y reconocen proteínas MHC de clase I.

Durante la maduración de los linfocitos T en el timo actúa una combinación de procesos de selección positiva y negativa generando el repertorio de TCR. Estos procesos aseguran que sólo sobrevivan y maduren los linfocitos T que presenten receptores útiles en potencia mientras que el resto muera por apoptosis. Los linfocitos T que sean capaces de responder a péptidos acomplejados con las propias proteínas MHC serán seleccionados positivamente; a continuación, los linfocitos T de este grupo que puedan reaccionar fuertemente con péptidos propios acomplejados con las proteínas MHC serán eliminados. Los linfocitos T colaboradores y citotóxicos que presenten receptores que reaccionen con antígenos propios se eliminarán, inactivarán funcionalmente o suprimirán activamente cuando reconozcan antígenos propios en células dendríticas no activadas.

LINFOCITOS T COLABORADORES Y ACTIVACIÓN LINFOCITARIA

Por diversas razones, los linfocitos T colaboradores son las células más importantes en la inmunidad adquirida, ya que son necesarios para casi todas las respuestas de este tipo de inmunidad. Son necesarios para estimular la secreción de anticuerpos por parte de los linfocitos B y ayudan a los macrófagos a destruir los patógenos fagocitados. Además, colaboran en la activación de los linfocitos T citotóxicos con objeto de eliminar las células diana infectadas y lo hacen, al menos en parte, estimulando las células dendríticas a activar de un modo más eficiente los linfocitos T citotóxicos vírgenes. Tal como se ha podido demostrar de manera dramática en los pacientes afectados de sida, sin el concurso de los linfocitos T colaboradores no podemos defendernos contra la mayoría de los microorganismos, incluso de los que habitualmente no son nocivos.

Sin embargo, los propios linfocitos T colaboradores sólo son funcionales cuando son activados a transformarse en células efectoras. Los linfocitos colaboradores vírgenes se activan por el contacto con la membrana de células dendríticas, las cuales se activan a través de respuestas de la inmunidad innata generadas tras una infección. Las respuestas innatas, fundamentalmente mediante células dendríticas activadas, también determinan hacia qué tipo de célula efectora madurará un linfocito T colaborador, definiendo así la naturaleza de las respuestas inmunitarias adquiridas inducidas.

Al final de esta sección describiremos las múltiples señales activadoras de los linfocitos T y cómo un linfocito T colaborador, una vez activado a célula efectora, induce la activación de otras células. También se considerará cómo las respuestas inmunitarias innatas determinan la naturaleza de las respuestas adquiridas mediante la inducción de la diferenciación de los linfocitos T colaboradores hacia los diferentes fenotipos efectores. Por último, analizaremos el posible origen evolutivo de las proteínas de la superfamilia Ig, que incluye las proteínas MHC, los anticuerpos y los TCR.

Las células dendríticas activadas utilizan varios mecanismos para activar a los linfocitos T

Cuando en el curso de una infección, una célula dendrítica se activa, cambia su aspecto y su conducta migratoria, aumenta la cantidad de proteínas MHC en su superficie, activa sus vías para procesar antígenos y comienza a fabricar tanto proteínas coestimuladoras expresadas en la membrana plasmática como citoquinas secretadas (incluidas las quimioquinas). Estos importantes cambios capacitan a las células dendríticas para migrar a los órganos linfoides periféricos y activar linfocitos T vírgenes en linfocitos efectores.

Las células dendríticas toman contacto con los linfocitos T a través de los receptores de los linfocitos T (TCR), que reconocen un péptido extraño acomplejado con una proteína MHC de clase II expresada en la membrana plasmática de la célula dendrítica. Pero los TCR no actúan solos en la transmisión de la señal al linfocito T: también colabora un complejo de proteínas transmembrana invariables asociado al TCR denominado **CD3** (**Figura 25–65**). Además, el correceptor CD4 de los linfocitos T colaboradores o de los linfocitos T reguladores y el CD8 de los linfocitos T citotóxicos se unen a la misma proteína MHC que el TCR y desempeñan un papel clave en la transmisión de la señal, como se ilustra en la **Figura 25–66**.

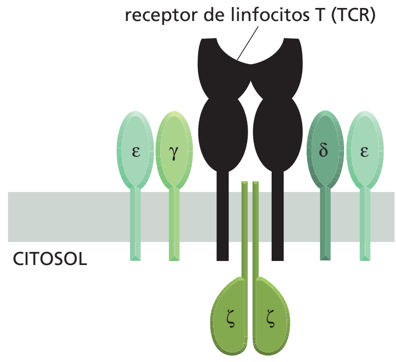


Figura 25–65 El TCR y su complejo CD3 asociado. Todos los polipéptidos que forman el complejo CD3 (señalados en *verde*) excepto las cadenas ζ (zeta) presentan dominios Ig extracelulares y, por tanto, son miembros de la superfamilia Ig. Los cuatro tipos de polipéptidos CD3 forman heterodímeros u homodímeros (mostrado en el esquema) y tras la activación del TCR son fosforilados rápidamente en residuos de tirosina del dominio intracelular (no mostrado). Como aparece en la Figura 25–66, algunas de estas tirosinas fosforiladas actuarán como lugares de acoplamiento para proteínas de señalización intracelular.

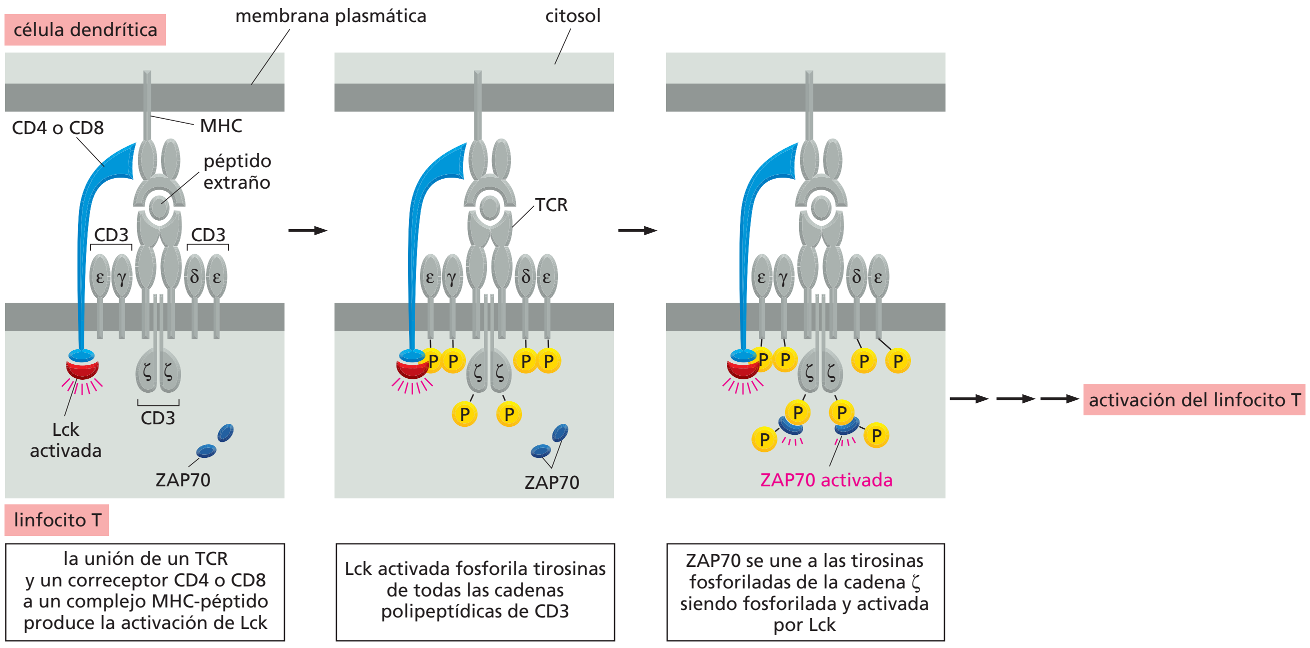


Figura 25–66 Vía de señalización iniciada tras la unión de los complejos MHC-péptido a los TCR. Tras la unión de los TCR (y CD3) a los complejos MHC-péptido que se encuentran en la superficie de una célula dendrítica, se produce la formación del complejo entre los TCR con las moléculas CD4, cuando se trata de linfocitos colaboradores, o con las moléculas CD8, cuando son citotóxicos, las cuales interaccionan con las regiones invariables de las propias proteínas de clase II o clase I, respectivamente, de la superficie de las células dendríticas. Este hecho estimula la captación de Lck, una tirosina quinasa citoplasmática de la familia Src, por parte del complejo señalizador, lo que produce la activación de esta tirosina quinasa. La activación de Lck también depende de una proteína transmembrana tirosina fosfatasa, llamada CD45, expresada por los linfocitos T, que elimina los fosfatos inhibidores de Lck (no mostrado).

Una vez activada, Lck inicia una cascada de fosforilación de tirosinas y fosforila estos residuos de las cadenas del complejo CD3. A partir de este momento las fosfotirosinas de la cadena CD3 ζ, actúan como lugares de acoplamiento para otra tirosina quinasa citoplasmática denominada *ZAP70*. Después, Lck fosforila a ZAP70, activándola. Aunque no se muestra en la figura, entonces ZAP70 fosforila tirosinas de la cola citoplasmática de otra proteína transmembrana (denominada LAT), las cuales, a su vez, actúan como lugares de acoplamiento para diversas proteínas adaptadoras y enzimas. Estas proteínas colaboran en la transmisión de la señal hasta el núcleo y otras regiones celulares al activar las vías señalizadoras fosfatidil inositol y MAP-quinasa (descritas en el Capítulo 15), así como la de la familia de GTPasas Rho, que regulan el citoesqueleto de actina (descrita en el Capítulo 16).

Para que un linfocito T se active, además de esta señalización a través de los TCR y de sus proteínas asociadas y correceptores, se requieren otras señales que proceden de la unión de proteínas expresadas en la membrana de las células dendríticas a otros receptores de los linfocitos T. Las **proteínas B7** son un ejemplo de proteínas coestimuladoras expresadas por las células dendríticas activadas que son reconocidas por la proteína correceptora **CD28** presente en la membrana de los linfocitos T. El linfocito T colaborador activado expresa una proteína coestimuladora denominada *ligando CD40* que actúa sobre *receptores de CD40* presentes en la célula dendrítica con el fin de incrementar y mantener la activación de la célula dendrítica, generando un circuito de retroalimentación positiva que amplifica la respuesta del linfocito T.

Cuando un linfocito T se une a una célula dendrítica, el linfocito T activa una integrina (proteína de adhesión) que se unirá a su ligando (similar a Ig) presente en la membrana plasmática de la célula dendrítica. Este incremento de la unión entre las dos células permite que el linfocito T permanezca unido a la célula presentadora de antígeno el tiempo necesario para ser activado.

Esta señalización inicial a través de los TCR y sus proteínas asociadas induce la activación de una **sinapsis inmunológica** en la interfase entre el linfocito T y la célula dendrítica. Los TCR y sus subunidades CD3 asociadas, los correceptores y las proteínas de señalización intracelular se hallan agrupados en el centro de estas estructuras, que rodea un anillo de proteínas de adhesión. En la interacción de un linfocito efector, colaborador o citotóxico con su célula diana se forman estructuras similares. No todos los TCR de una sinapsis se hallan unidos a péptidos extraños acomplejados con una proteína MHC sino que algunos de ellos se hallan unidos a antígenos propios contenidos en proteínas MHC y estos TCR también activan los linfocitos T (inicialmente todos los linfocitos T que reconocen de manera débil este tipo de complejos MHC-péptido propio son seleccionados positivamente en el timo).

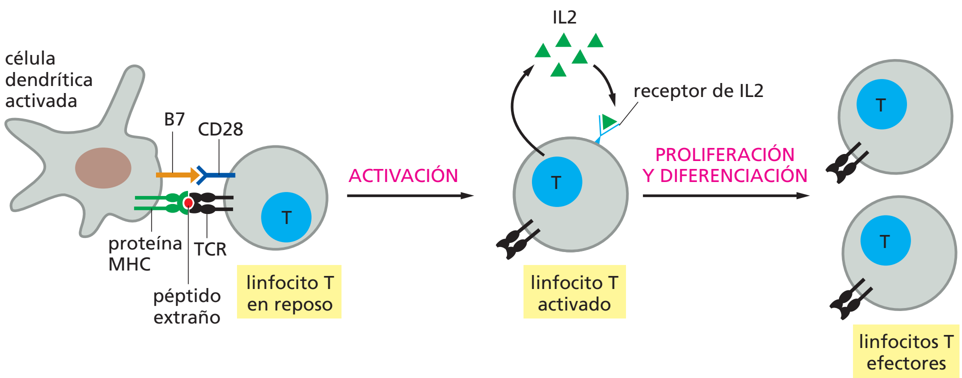


Figura 25–67 Estimulación de linfocitos T por IL-2. Este modelo es válido tanto para linfocitos T colaboradores como T citotóxicos, al menos en cultivo. La combinación de los complejos MHC-péptido con una proteína coestimuladora B7 (B7-1 o B7-2; también denominadas CD80 y CD86, respectivamente) en la superficie de una célula dendrítica activada ayuda a estimular la producción, por parte de los linfocitos T en reposo, de receptores de alta afinidad para IL2 y a secretar IL2. La unión de IL2 a sus receptores estimula, a su vez, la proliferación del linfocito y su diferenciación en un fenotipo efector. Las diferentes proteínas asociadas a los TCR (véase Figura 25–65) no se muestran.

Las acciones combinadas de diversas señales ya comentadas estimulan la proliferación de los linfocitos T e inducen su diferenciación en células efectoras a través de un curioso mecanismo indirecto. Estas señales ayudan a estimular la propia proliferación y diferenciación de los linfocitos T, al inducir la secreción por parte de estas células de una citoquina denominada **interleuquina-2** (**IL2**) y, simultáneamente, la síntesis de receptores de alta afinidad para ella. La unión de IL2 a su receptor estimula vías de señalización intracelular que activan genes inductores de la proliferación de los linfocitos T y de su diferenciación en células efectoras (**Figura 25–67**). Aunque no todos los linfocitos T secretan IL2 al ser activados por su antígeno, expresan receptores de IL2, por lo que pueden ser ayudados a proliferar y diferenciarse mediante la IL2 secretada por otros linfocitos T activados vecinos. Además, la IL2 es imprescindible para el desarrollo de los linfocitos T reguladores en el timo.

Las células dendríticas, además de activar linfocitos T, también tienen un papel importante en la inactivación o eliminación de los linfocitos T autorreactivos. Cuando los linfocitos T reconocen complejos MHC-péptido propio en la superficie de las células dendríticas no activadas por patógeno, son inactivados para que no respondan al mismo complejo MHC-péptido presente en células dendríticas o proliferan brevemente y mueren por apoptosis. Ambos mecanismos –la inactivación clonal y la eliminación clonal– están implicados en la autotolerancia periférica. Las células dendríticas también participan en la autotolerancia activando a los linfocitos T reguladores, que a su vez suprimen la actividad de los linfocitos T efectores autorreactivos. El mecanismo por el que las células dendríticas activan de forma selectiva los linfocitos T reguladores es poco conocido (véase Figura 25–13).

Tabla 25–3 Algunas de las proteínas accesorias de la membrana plasmática de los linfocitos T

PROTEÍNA*	SUPERFAMILIA	EXPRESADA EN	LIGANDO EN LA CÉLULA DIANA	FUNCIONES
complejo CD3	Ig (excepto para ζ)	todos los linfocitos T	—	ayuda a transducir la señal tras la unión de los complejos MHC-péptido a los TCR; ayuda a transportar los TCR a la membrana plasmática
CD4	Ig	linfocitos T colaboradores, linfocitos T reguladores	MHC de clase II	promueve la adhesión de las células dendríticas y células diana; comunica señales a los linfocitos T
CD8	Ig	linfocitos T citotóxicos	MHC de clase I	promueve la adhesión de las células dendríticas y células diana infectadas; comunica señales a los linfocitos T
CD28	Ig	la mayoría de los linfocitos T	proteínas B7 (CD80 y CD86)	colabora en la activación de los linfocitos T
CTLA4	Ig	linfocitos T activados	proteínas B7 (CD80 y CD86)	inhibe la activación de los linfocitos T
ligando de CD40	familia del ligando de Fas	linfocitos T colaboradores efectores	CD40	proteína coestimuladora que colabora en la activación de macrófagos, linfocitos B y células dendríticas

* CD se refiere al grupo de diferenciación (***c****luster of* ***d****ifferentiation*), ya que estas proteínas CD fueron descritas cuando se descubrieron como "antígenos de diferenciación" reconocidos por anticuerpos monoclonales en las células sanguíneas. Su identificación fue posible por colaboraciones a gran escala en las que se utilizaron cientos de dichos anticuerpos, generados en muchos laboratorios; al comparar los resultados, se determinó que podían agruparse en relativamente pocos grupos (o *clusters)* y cada uno de ellos reconocía una única proteína de membrana. Desde estos estudios iniciales se han identificado más de 240 proteínas CD.

La activación de los linfocitos B está controlada por retroalimentación negativa

Durante el proceso de activación, los linfocitos T inician la expresión de una proteína de membrana denominada *CTLA4*, la cual inhibe la señalización intracelular. Esta proteína se asemeja a CD28, y al igual que ésta, se une a las proteínas B7 de las células dendríticas (véase Figura 25–67). CTLA4 se une a B7 con una afinidad mayor que la mostrada por CD28 y, cuando ello sucede, bloquea la actividad de CD28 generando una retroalimentación negativa que paraliza el proceso de activación. Así, los ratones que presentan un gen *Ctla4* no funcional mueren a consecuencia de una acumulación masiva de linfocitos T activados.

En la **Tabla 25–3** se resumen las características de algunos de los correceptores y de las proteínas accesorias expresados en la membrana de los linfocitos T.

La mayoría de linfocitos T (y B) activados producidos durante una respuesta inmunitaria deben ser eliminados tras haber realizado su trabajo. La mayoría de los linfocitos mueren por apoptosis aunque los mecanismos responsables de esta eliminación son poco conocidos. Una posibilidad es que al decaer los niveles de antígeno y también la respuesta, los linfocitos efectores sean privados de la estimulación por citoquinas que necesitan para sobrevivir, de modo que sólo sobreviven las células de memoria y algunos linfocitos efectores. Sin embargo, la falta de señales de supervivencia no es la única causa de la eliminación de los linfocitos T activados. En el caso de los linfocitos T citotóxicos activados, por ejemplo, la citoquina *interferón-γ* (*IFNγ*) desempeña un papel destacado en la inducción de la muerte celular; puesto que los linfocitos T citotóxicos activados producen IFNγ (véase Figura 25–60), se trataría de otra forma de retroalimentación negativa.

Antes de entrar a considerar cómo los linfocitos T colaboradores inducen la activación de macrófagos y linfocitos B, es necesario caracterizar las dos subclases funcionales principales de linfocitos T colaboradores, T_H1 y T_H2, y el mecanismo por el que se generan.

La subclase de linfocito T colaborador activado determina la naturaleza de la respuesta inmunitaria adquirida

Cuando en un órgano linfoide periférico un linfocito T colaborador virgen ha sido activado por una célula dendrítica activada, normalmente se diferencia a un fenotipo efector T_H1 o T_H2. El resultado depende de la afinidad del TCR por el complejo MHC-péptido, de la densidad de dicho complejo en la membrana de la célula dendrítica y de la naturaleza de la célula dendrítica.

Las dos subclases funcionales principales de linfocitos colaboradores efectores pueden distinguirse por las citoquinas que secretan. Los **linfocitos T_H1** secretarán sobre todo *IFNγ* y *factor de necrosis tumoral α* (*TNFα*), que inducen a los macrófagos a la eliminación de los microorganismos que se encuentran en los fagosomas. También participan en la activación de los linfocitos T citotóxicos para que eliminen las células infectadas. Aunque de este modo los linfocitos T_H1 defienden fundamentalmente a un animal de microorganismos intracelulares, también pueden inducir a los linfocitos B a que secreten subclases específicas de anticuerpos IgG que recubran los microorganismos extracelulares y activen el sistema de complemento, colaborando así también en la eliminación de algunos microorganismos extracelulares.

Por el contrario, los **linfocitos T_H2**, defenderán al animal, fundamentalmente, de patógenos extracelulares como microorganismos y parásitos multicelulares. Secretan diversas citoquinas, incluidas las *interleuquinas 4 y 10* (*IL4* e *IL10*) y participan en la estimulación de los linfocitos B a producir la mayoría de las clases de anticuerpos, incluyendo IgM, IgA, IgE y algunas subclases de IgG. Algunos de estos anticuerpos se unirán a mastocitos, basófilos y eosinófilos; cuando se activan por el antígeno, estas células liberan mediadores locales que provocan estornudos, tos o diarrea, lo cual contribuye a liberar de las superficies epiteliales microorganismos extracelulares y grandes parásitos.

Así, la diferenciación de un linfocito T colaborador virgen en células efectoras T_H1 o T_H2 condiciona el tipo de respuesta inmunitaria adquirida que el animal organizará en contra del patógeno, es decir, si esta respuesta estará dominada por la activación de macrófagos o por la producción de anticuerpos. Las citoquinas específicas producidas durante el proceso de activación de un linfocito T colaborador influirán de forma determinante en el tipo de linfocito colaborador efector producido. Algunas bacterias intracelulares estimulan la producción de *IL12* por parte de las células dendríticas, lo cual induce el desarrollo del fenotipo

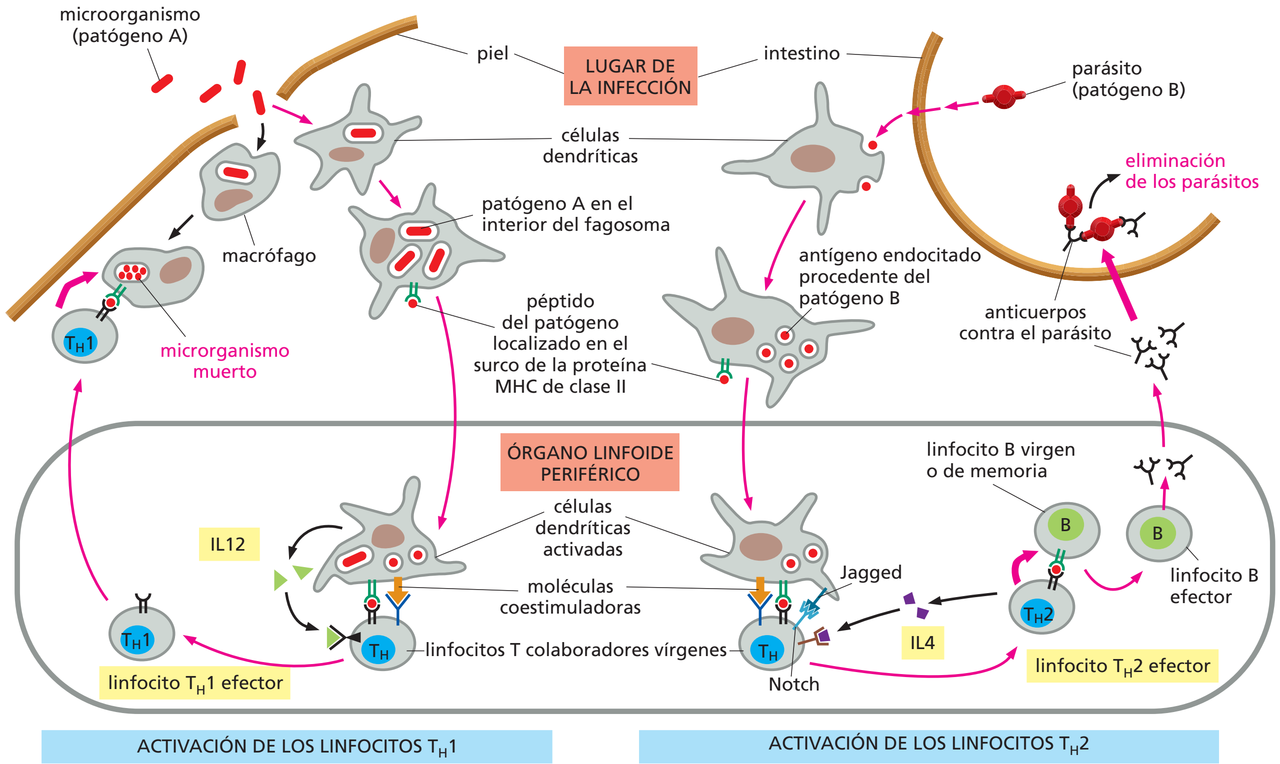


Figura 25–68 Activación de los linfocitos T_H1 y T_H2. La diferenciación de los linfocitos T colaboradores vírgenes en efectores T_H1 o en efectores T_H2, determinará la naturaleza de las respuestas inmunitarias posteriores. El que un linfocito T virgen se diferencie en un fenotipo T_H1 o T_H2 depende, sobre todo, de las proteínas de señalización presentes en el órgano linfoide periférico donde el linfocito T es activado por una célula dendrítica activada. El tipo de proteína señalizadora producida dependerá del ambiente local y del tipo del patógeno que haya activado a la célula dendrítica en el lugar de la infección. La IL12 secretada por las células dendríticas activadas estimula la maduración del fenotipo T_H1. Por el contrario, Jagged, el ligando transmembrana de Notch de la superficie de las células dendríticas activadas, y la IL4 producida por basófilos, mastocitos y linfocitos T_H2, son inductores de la maduración del fenotipo T_H2.

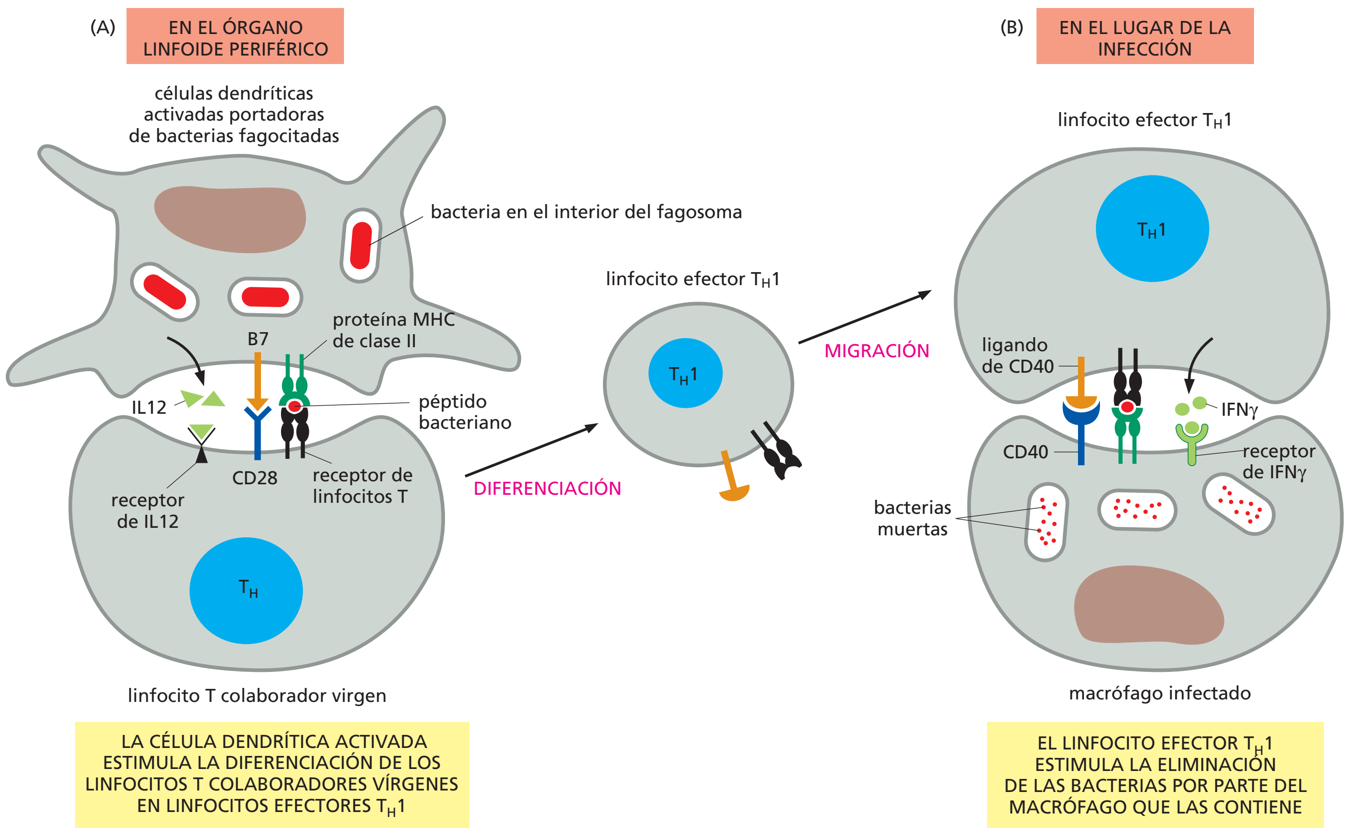
En la figura, el linfocito efector T_H1, que ha madurado en algún órgano linfoide periférico, migra al lugar de la infección y estimula la eliminación de los microorganismos que han sido fagocitados por los macrófagos. El linfocito efector T_H2 permanece en el órgano linfoide e induce la activación de los linfocitos B que expresan anticuerpos contra el parásito. Además de unirse a los parásitos, los anticuerpos se unen a los receptores Fc de los mastocitos, basófilos y eosinófilos (véase Figura 25–27), los cuales colaboran en la expulsión del parásito del intestino. Aunque no se muestra, los linfocitos T_H1 también facilitan la activación de los linfocitos B para producir anticuerpos.

T_H1 y, por tanto, la activación de macrófagos. Como era de esperar, los ratones deficientes en IL12 o su receptor son mucho más susceptibles a esas infecciones bacterianas que los ratones normales. Por el contrario, muchos protozoos y nematodos parásitos estimulan la expresión en la superficie de las células dendríticas de la *proteína Jagged*. Se trata de un ligando activador de los *receptores Notch* (descritos en los Capítulos 15 y 22) de la superficie de los linfocitos T y la señalización resultante induce el desarrollo de T_H2 y la producción de IL4. Los linfocitos T_H2 e IL4 participan en la estimulación de la producción de anticuerpos y la activación de eosinófilos, que facilitan la expulsión de los parásitos (**Figura 25–68**). IL4 genera además una retroalimentación positiva puesto que es un potente inductor del desarrollo de T_H2.

Cuando se ha desarrollado el fenotipo T_H1 o T_H2, se inhibe la diferenciación del otro tipo de linfocito T colaborador. El IFN-γ producido por los linfocitos T_H1, inhibe el desarrollo de los T_H2, mientras que IL4 e IL10 producidas por los linfocitos T_H2 inhiben el desarrollo del fenotipo T_H1. Así, a medida que se va produciendo la respuesta, se va reforzando la elección inicial a través de sus efectos sobre la respuesta de otras células T vecinas.

Los individuos infectados por *Mycobacterium leprae*, la bacteria causante de la lepra, ilustran la importancia de la elección T_H1/T_H2. Esta bacteria prolifera fundamentalmente dentro de los macrófagos, causando las dos formas de la enfermedad dependiendo, sobre todo, de las características genéticas de los individuos infectados. Algunos pacientes padecen la forma *tuberculoide* de la enfermedad. En éstos se desarrollan linfocitos T_H1 que inducen a los macrófagos infectados a eliminar las bacterias y producen una respuesta inflamatoria local que daña la piel y los nervios. El resultado es una enfermedad crónica que progresa lentamente pero que no mata al huésped. Por el contrario, otros pacientes presentan la forma *lepromatosa* de la enfermedad en la cual se desarrollan linfocitos T_H2 que estimulan la producción de anticuerpos. Los anticuerpos no pueden atravesar la membrana plasmática y atacar las bacterias intracelulares, por lo que estas bacterias proliferan de modo incontrolado y finalmente provocan la muerte del huésped. Por razones desconocidas también existe una disminución general de la inmunidad mediada por linfocitos T a la mayoría de antígenos en la forma lepromatosa de la enfermedad.

Los linfocitos T colaboradores vírgenes también pueden desarrollarse en un tercer tipo de linfocito efector recientemente descrito, los T_H17, llamados así porque secretan la interleuquina proinflamatoria *IL17*. Los T_H17 ayudan en la defensa contra patógenos extracelulares y también tienen un papel importante en muchas enfermedades autoinmunitarias. Se desarrollan cuando algunos linfocitos T colaboradores vírgenes son activados por su antígeno en presencia de TGFβ y de IL6.



Los linfocitos T_H1 activan a los macrófagos infectados e inducen una respuesta inflamatoria

En los lugares de infección, los macrófagos y las células dendríticas fagocitan patógenos y sus productos. Las células dendríticas se activan y transportan los antígenos de los microorganismos hasta un órgano linfoide periférico, donde inducirán preferentemente la producción de linfocitos T_H1, los cuales después son reclutados a los lugares de infección donde inducirán la activación de los macrófagos infectados (véase Figura 25–68).

Los linfocitos efectores T_H1 utilizan dos señales para activar a los macrófagos. Secretan IFNγ, el cual se une a los receptores de IFNγ expresados por los macrófagos y además expresan la proteína coestimuladora ligando CD40 que es reconocida por el receptor CD40 de macrófagos (**Figura 25–69**). (Más adelante describiremos que el ligando CD40 también es utilizado por los linfocitos T colaboradores para activar a los linfocitos B.) Una vez activados, los macrófagos pueden eliminar los microorganismos que contienen en sus fagosomas, ya que se favorece la fusión de los lisosomas con fagosomas dando lugar a un ataque hidrolítico, activando además la producción de radicales de oxígeno y óxido nítrico que son muy tóxicos para los microorganismos (descrito en el Capítulo 24). En los lugares de infección, los linfocitos T_H1 también activan células dendríticas, ya que éstas también expresan CD40. El resultado es que las células dendríticas incrementan su producción de proteínas MHC de clase II, proteínas coestimuladoras y diversas citoquinas, especialmente IL12. Este hecho las hace más efectivas en la estimulación de los linfocitos T colaboradores para diferenciarse en linfocitos efectores T_H1 en los órganos linfoides periféricos. De esta manera, se genera un circuito de retroalimentación positiva que incrementa la producción de linfocitos T_H1 y, por tanto, se favorece la activación de macrófagos.

Los linfocitos efectores T_H1 también estimulan la *respuesta inflamatoria* (descrita en el Capítulo 24) al reclutar un número creciente de células fagocitarias en el lugar de la infección. Este proceso se lleva a cabo a través de tres mecanismos:

1. La secreción de citoquinas que actúan en la médula ósea roja incrementando la producción de monocitos (precursores circulantes de macrófagos) y de neutrófilos.
2. La secreción de citoquinas que inducen la expresión de moléculas de adhesión intercelular en las células endoteliales locales y favorecen la adhesión de monocitos y de neutrófilos circulantes.

Figura 25–69 La diferenciación de los linfocitos T_H1 y activación de macrófagos. (A) Célula dendrítica activada que fagocita bacterias en el lugar de la infección y que, al migrar hasta un órgano linfoide periférico, induce la diferenciación de un linfocito T colaborador virgen en un linfocito efector T_H1. Para ello, la célula dendrítica utiliza tanto proteínas de membrana coestimuladoras, como las B7, como la IL12 secretada. (B) Entonces, el linfocito efector T_H1 activado migra desde el órgano linfoide periférico hasta el foco infeccioso, donde colabora en la activación de macrófagos que contienen bacterias en sus fagosomas para que las eliminen. Como se indica en el esquema, el linfocito efector realiza dicha función mediante el IFNγ secretado y el ligando de CD40 unido a la membrana, que se une al CD40 expresado por los macrófagos.

3. Secretan quimioquinas que dirigen la migración de los neutrófilos y de los monocitos adheridos hacia el lugar de la infección.

Los linfocitos T_H1 también colaboran en la activación de los linfocitos T citotóxicos en los órganos linfoides periféricos, produciendo quimioquinas que atraen a los linfocitos citotóxicos a los lugares de interacción célula dendrítica-linfocito T_H1 y, al mismo tiempo, estimulan la producción de más proteínas coestimuladoras en las células dendríticas. Además, los linfocitos T_H1 favorecen la eliminación de células infectadas por virus por parte de los linfocitos T citotóxicos, ya que al secretar IFNγ se incrementa la eficiencia con la que las células diana procesan los antígenos víricos para su presentación a los linfocitos T citotóxicos (véase Figura 25–60). Finalmente, un linfocito T_H1 puede eliminar de forma directa algunos tipos celulares, incluyendo linfocitos efectores, ya que al expresar el *ligando Fas* e inducir la expresión de *Fas* en los linfocitos efectores T o B, se favorece su entrada en apoptosis (véase Figura 25–47B).

Además, tanto los linfocitos T_H1 como los T_H2 pueden inducir la proliferación y diferenciación de los linfocitos B, así como el cambio de expresión de la clase de anticuerpos, pasando de la producción de IgM e IgD a una de las clases de anticuerpo secundarias. Antes de describir cómo lo consiguen, es preciso que describamos el papel de los receptores de antígenos de los linfocitos B en su activación.

La unión del antígeno al receptor de los linfocitos B (BCR) es sólo un paso en la activación de los linfocitos B

Al igual que sucede con los linfocitos T, la mayoría de los linfocitos B necesitan varias señales extracelulares para ser activados. Una señal la proporciona la interacción del antígeno con el **receptor del linfocito B** (**BCR**: ***B** cell receptor*), el cual, tal como se ha indicado, es una molécula de anticuerpo integral de membrana. El resto de señales necesarias es aportado por lo general por los linfocitos T colaboradores. Si un linfocito B sólo recibe la primera señal, puede ser eliminado o inactivado funcionalmente, lo cual constituye un mecanismo por el cual los linfocitos B se vuelven tolerantes a los antígenos propios.

La señalización generada por el BCR se asemeja, en gran manera, a la producida por los TCR (véase Figura 25–66). El receptor está asociado a dos cadenas proteicas invariables, Igα e Igβ, las cuales colaboran en la transducción de la señal intracelular. Cuando un antígeno interacciona de manera cruzada con sus BCR, provoca la formación de pequeños agregados de receptores y sus cadenas invariables asociadas. Esta agregación conduce al ensamblaje de un complejo señalizador intracelular en el lugar del reclutamiento de los receptores y el inicio de una cascada de fosforilaciones en residuos de tirosina (**Figura 25–70**).

Un complejo correceptor que reconozca las proteínas del complemento aumenta en gran medida la señal producida por el BCR y sus cadenas invariables asociadas. Si un microorganismo activa de manera directa el sistema del complemento (descrito en el Capítulo 24), habitualmente las proteínas de este sistema son depositadas en la superficie del microorganismo incrementando notablemente la respuesta del linfocito B frente a dicho microorganismo. Entonces, cuando el microorganismo recluta los BCR en la membrana de un linfocito B, también son reclutados los *complejos correceptor-proteínas del complemento*, in-

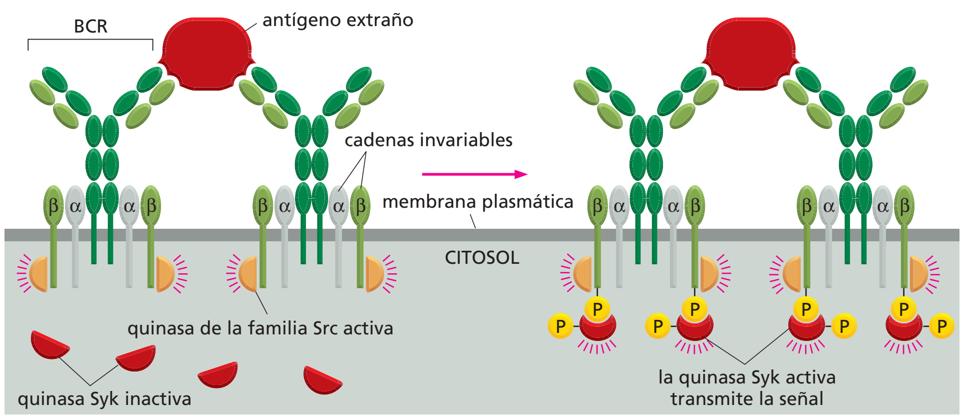


Figura 25–70 Etapas tempranas de señalización en los linfocitos B activados por la unión de antígenos a los BCR. Los antígenos entrecruzan los BCR adyacentes, que son moléculas transmembrana de anticuerpo, y provocan el reclutamiento de estos BCR y de sus cadenas invariables asociadas (heterodímeros de Igα e Igβ). Una tirosina quinasa citoplasmática de la familia Src, que puede ser *Fyn, Blk* o *Lyn*, se asocia con la región citoplasmática de las cadenas Igβ y se integra en el complejo, fosforilando tanto Igα como Igβ (para simplificar tan sólo se muestra la fosforilación de Igβ). Como en el caso de la activación TCR, la proteína tirosina fosfatasa CD45 también se requiere para activar estas quinasas de la familia Src (no mostrada). Las fosfotirosinas resultantes en Igα y Igβ actúan como lugares de acoplamiento para otra tirosina quinasa de la familia Src denominada *Syk*, la cual es homóloga a ZAP70 expresada en los linfocitos T (véase la Figura 25–66). De manera semejante a ZAP70, Syk, una vez fosforilada y, por tanto, activada, transmite la señal generada.

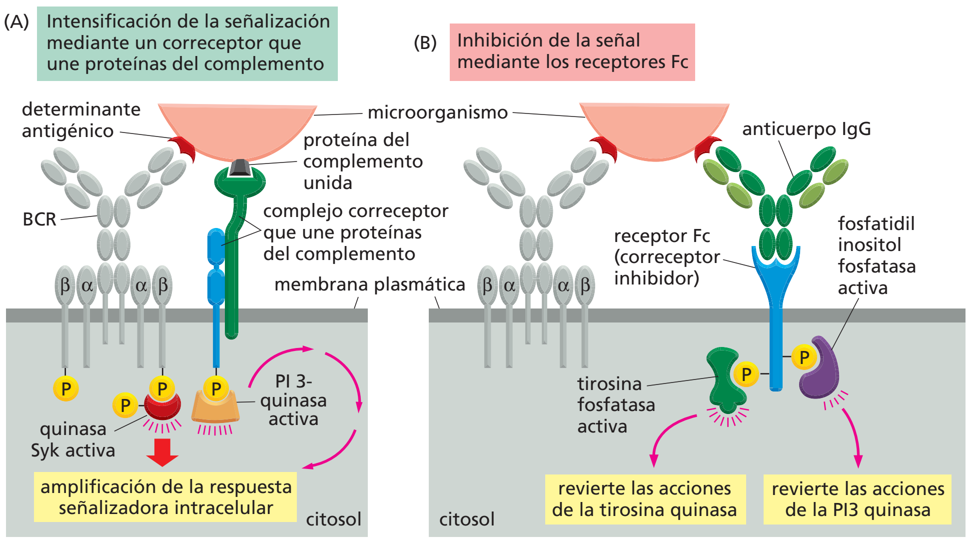


Figura 25–71 Influencia ejercida por los correceptores del linfocito B sobre la efectividad de la señal a través de los BCR. (A) La unión de los complejos microorganismo-complemento a los BCR, da lugar al entrecruzamiento de los BCR con los correceptores que unen el complemento. Finalmente se fosforilan residuos de tirosina de la cola citoplasmática de un componente del complejo correceptor, lo cual los convierte en lugares de acoplamiento para la PI 3-quinasa. Tal como se describió en el Capítulo 15, la PI 3-quinasa es activada para fosforilar fosfatidil inositoles concretos en la membrana plasmática, los cuales reclutan entonces proteínas de señalización intracelular (no se muestra en la figura). Estas proteínas actúan en conjunción con las señales generadas por la quinasa Syk amplificando así la respuesta. (B) Cuando los anticuerpos IgG se unen a los antígenos extraños, en general tardíamente, las regiones Fc se unen a los receptores Fc expresados en la membrana de los linfocitos B, reclutándolos para formar un complejo de señalización. Los receptores Fc resultan fosforilados en sus residuos tirosina y actúan como lugares de acoplamiento de dos tipos de enzimas fosfatasas: (1) una fosfatidil inositol fosfatasa, que desfosforila los lugares de acoplamiento de los fosfatidil inositoles de la membrana plasmática generados por la PI 3-quinasa, revirtiendo así los efectos activadores de esta última; (2) las tirosina fosfatasas, que inhiben la señalización mediada por las tirosinas quinasa activadas.

crementando la intensidad de la señal mediante la activación de la PI 3 quinasa (estudiada en el Capítulo 15) (**Figura 25–71**A). Tal como podría esperarse, los ratones carentes de algún componente del complemento, o de alguno de sus correceptores en los linfocitos B, presentan una producción de anticuerpos reducida.

Por el contrario, en las últimas etapas de la respuesta inmunitaria, cuando los anticuerpos IgG se expresan en la superficie del microorganismo, nuevos correceptores reducen la respuesta del linfocito B. Se trata de los *receptores Fc*, los cuales reconocen las colas de los anticuerpos IgG reclutando, en el complejo de señalización, enzimas con actividad fosfatasa que disminuyen la intensidad de la señal (Figura 25–71B). De esta manera, los receptores Fc en los linfocitos B actúan como correceptores inhibidores, exactamente como lo hacen las proteínas CTLA4 en los linfocitos T. Así, los correceptores expresados por los linfocitos B o T facilitan la consecución de información adicional respecto del antígeno que se ha unido a los receptores y permiten una toma de decisión más apropiada sobre la respuesta que hay que dar.

Los linfocitos T colaboradores específicos de antígeno son esenciales para la activación de la mayoría de los linfocitos B

Mientras que las células presentadoras de antígeno, tales como las dendríticas y los macrófagos, fagocitan y presentan con sus proteínas MHC antígenos de manera inespecífica, habitualmente los linfocitos B sólo presentan péptidos derivados de antígenos que han sido reconocidos de forma específica por los BCR. Por tanto, los BCR no sólo unen antígenos para iniciar la activación de los linfocitos B sino que también desempeñan un papel clave en el reclutamiento de los linfocitos T, ya que endocitan los antígenos proteicos y los degradan en el compartimiento endosomal hasta péptidos, muchos de los cuales regresan a la membrana plasmática de los linfocitos B unidos a proteínas MHC de clase II (véase Figura 25–61). Los complejos MHC clase II- péptido son reconocidos por los linfocitos T colaboradores específicos del antígeno que a su vez liberarán señales que harán que los linfocitos B proliferen y secreten anticuerpos (**Figura 25–72**).

¿De qué modo se forman los linfocitos T específicos de antígeno necesarios para la activación de los linfocitos B? Como se ha descrito, a lo largo de una respuesta primaria de anticuerpos los linfocitos T colaboradores vírgenes son activados al reconocer un péptido unido a una proteína MHC de clase II expresada por una célula dendrítica activada. Una vez activado, el linfocito T colaborador activará un linfocito B que exhiba en su membrana el mismo complejo proteína MHC de clase II-péptido ajeno. Así, los linfocitos T colaboradores sólo activan a los linfocitos B que tengan BCR que reconozcan específicamente al antígeno que inicialmente ha activado al linfocito T, aunque por lo general los TCR y los BCR reconocen distintos determinantes antigénicos presentes en el antígeno (véase Figura 25–72). Este *doble reconocimiento* necesario del antígeno por linfocitos T y B ayuda a evitar las respuestas autoinmunitarias de los linfocitos B, que requerirían la presencia simultánea de linfocitos T colaboradores y de linfocitos B reconociendo el mismo antígeno.

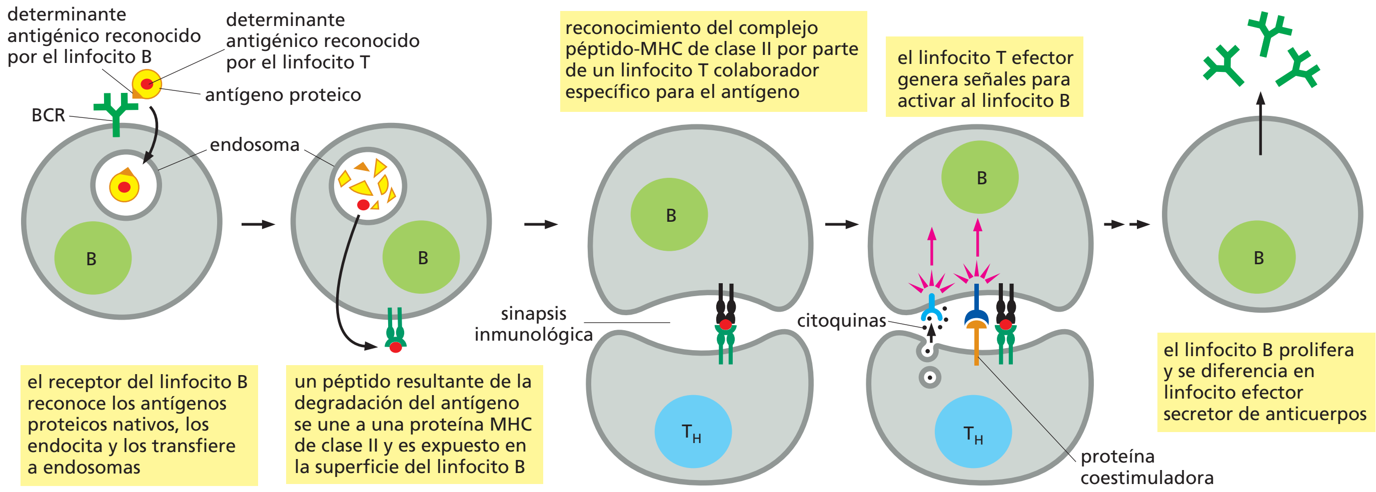


Figura 25–72 Activación de un linfocito B por un antígeno proteico y un linfocito T colaborador efector. Obsérvese que los linfocitos B y los T reconocen determinantes antigénicos diferentes del antígeno y que el linfocito T efector colaborador utiliza tanto moléculas coestimuladoras secretadas como unidas a la membrana para ayudar en la activación de los linfocitos B.

En las respuestas de anticuerpos secundarias, los propios linfocitos B de memoria pueden constituirse como células presentadoras de antígenos y activar linfocitos T colaboradores, así como ser sus dianas. Las actividades mutuamente reforzadoras de los linfocitos T y B conducen a una respuesta inmunitaria por anticuerpos que es, a la vez, intensa y específica en alto grado.

Cuando un linfocito T colaborador ha sido activado y entra en contacto con un linfocito B, se produce una reorganización citoplasmática del linfocito T colaborador. El linfocito T orienta su centríolo y su complejo de Golgi hacia el linfocito B, tal como se ha descrito para el contacto entre un linfocito T citotóxico y su célula diana (véase Figura 25–46). Sin embargo, en este caso parece que la reorientación capacita al linfocito T colaborador para dirigir las citoquinas, tanto las unidas a la membrana como las secretadas, hacia la superficie del linfocito B (véase Figura 25–72). Una molécula señal de membrana clave es el ligando CD40 (descrito anteriormente) de la membrana de los linfocitos T colaboradores activados, pero que no se expresa en los linfocitos T colaboradores vírgenes o de memoria. Es reconocida por el receptor CD40 expresado en la membrana de los linfocitos B. Esta interacción entre CD40 y su ligando es necesaria para que los linfocitos T colaboradores induzcan la proliferación de los linfocitos B así como su diferenciación en linfocitos de memoria o secretores de anticuerpos. Los individuos que carecen del ligando CD40 padecen una grave inmunodeficiencia y son susceptibles de padecer las mismas infecciones que los individuos afectados de sida, cuyos linfocitos T colaboradores han sido destruidos.

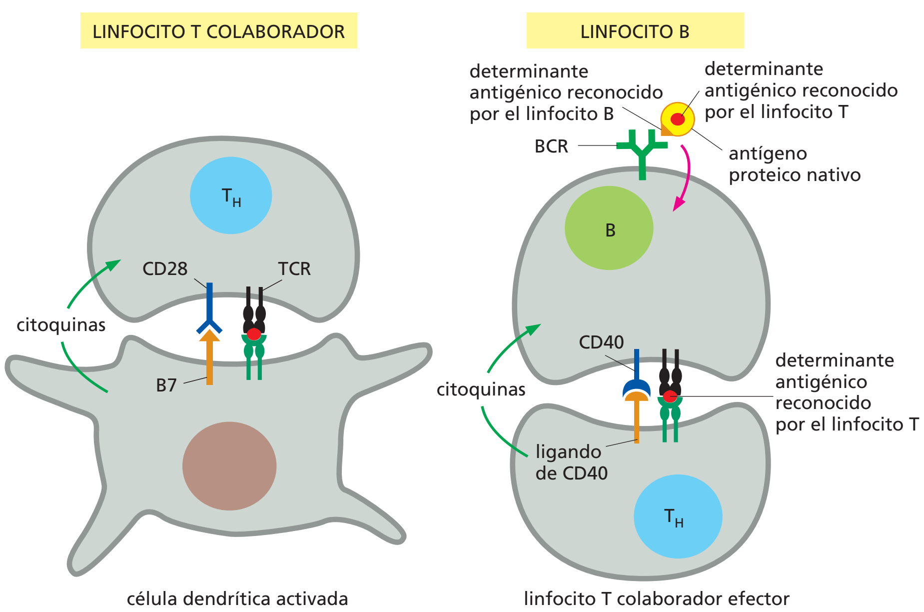


Figura 25–73 Comparación entre las señales necesarias para activar al linfocito B y al linfocito T colaborador con la misma proteína antigénica. Obsérvese que en ambos casos las moléculas secretadas y las integrales de membrana cooperan en el proceso de activación. La *flecha roja* representa la endocitosis del antígeno proteico. Aunque no se muestra, el ligando de CD40 también es usado por los linfocitos T colaboradores efectores para incrementar y mantener la activación de las células dendríticas, que expresan CD40, generando, así, un bucle de retroalimentación positiva.

El determinante antigénico reconocido por el linfocito T colaborador es presentado a modo de un fragmento peptídico unido a proteínas MHC de clase II en las membranas plasmáticas de la célula dendrítica y del linfocito B. En cambio el linfocito B reconoce un determinante antigénico diferente en la proteína nativa.

Tabla 25–4 **Propiedades de algunas citoquinas**

CITOQUINA	ALGUNAS FUENTES	ALGUNAS ACCIONES
IL2	todos los linfocitos T colaboradores; algunos linfocitos T citotóxicos	estimula la proliferación y la diferenciación de linfocitos T activados; requerida para regular el desarrollo de los linfocitos T en el timo
IL4	linfocitos T_H2, basófilos y mastocitos	estimula la proliferación y la diferenciación de los linfocitos B y el cambio de clase de IgE a IgG1; facilita el desarrollo de los linfocitos T_H2 e inhibe el de los T_H1
IL7	muchos linfocitos no T	facilita la supervivencia de los linfocitos T de memoria
IL10	linfocitos T_H2, macrófagos y células dendríticas	inhibe el desarrollo de los macrófagos y de los linfocitos T_H1
IL12	linfocitos B, macrófagos, células dendríticas y granulocitos	induce el desarrollo de los linfocitos T_H2 e inhibe el desarrollo de los linfocitos T_H1
IL15	muchos linfocitos no T	facilita la supervivencia de los linfocitos T de memoria
IL17	algunos linfocitos T colaboradores efectores	estimula respuestas inflamatorias
IFNγ	linfocitos T_H1 y linfocitos T citotóxicos	activa macrófagos; incrementa la expresión de MHC en muchos tipos celulares
TGFβ	linfocitos T reguladores	suprime la actividad de los linfocitos T efectores, de las células dendríticas y de macrófagos
TNFα	linfocitos T_H1 y macrófagos	activa las células endoteliales y los macrófagos

Los linfocitos T colaboradores también secretan citoquinas, incluidas las interleuquinas IL2 e IL4, que inducen la proliferación y diferenciación de los linfocitos B y, en algunos casos, el cambio de clase de anticuerpos que, en consecuencia, producen. Por ejemplo, IL-4 es producido por los linfocitos T_H2 y coopera con el ligando CD40 en la inducción de la proliferación y diferenciación de los linfocitos B así como en la promoción de la producción de anticuerpos IgE. Los ratones deficientes en la interleuquina IL-4 están severamente incapacitados para producir IgE.

En la **Figura 25–73** se comparan las señales necesarias para la activación de los linfocitos T y B, mientras que en la **Tabla 25–4** se describen algunas de las citoquinas aparecidas en este capítulo.

Un tipo especial de linfocitos B reconoce los antígenos independientes del linfocito T

Algunos antígenos pueden estimular la proliferación de los linfocitos B y su diferenciación en células secretoras de anticuerpos sin el concurso de los linfocitos T. La mayoría de estos *antígenos independientes de linfocitos T* son polisacáridos microbianos que no activan a los linfocitos T colaboradores. Algunos de estos antígenos activan de manera directa a los linfocitos B al proporcionar tanto la señal del antígeno como las señales accesorias proporcionadas por los linfocitos T colaboradores. Otros son grandes polímeros que presentan determinantes antigénicos idénticos y repetidos (véase Figura 25–29B); su unión a varios BCR puede generar una señal lo bastante fuerte como para activarlos directamente sin necesidad de señales adicionales.

Dado que los antígenos independientes de linfocitos T no activan a los linfocitos T colaboradores, tampoco pueden inducir la diferenciación de los linfocitos B en células de memoria, ni el incremento de la afinidad de los anticuerpos o el cambio de clase, actividades que requieren, todas ellas, de los linfocitos T colaboradores. Estos antígenos estimulan, fundamentalmente, la producción de anticuerpos IgM caracterizados por su baja afinidad pero que presentan una gran avidez. La mayoría de los linfocitos B que producen anticuerpos sin la colaboración de los linfocitos T pertenecen a un linaje diferente. Son los denominados *linfocitos B1*, para distinguirlos de los *B2* que sí requieren del concurso de los T colaboradores. Parece ser que los linfocitos B1 son en especial importantes en la defensa contra los patógenos intestinales.

Las moléculas de reconocimiento inmunitario pertenecen a la antigua superfamilia Ig

La mayoría de las proteínas que median el reconocimiento intercelular, o el de antígenos en el sistema inmunitario, contienen dominios Ig u homólogos, lo cual sugiere que tienen una

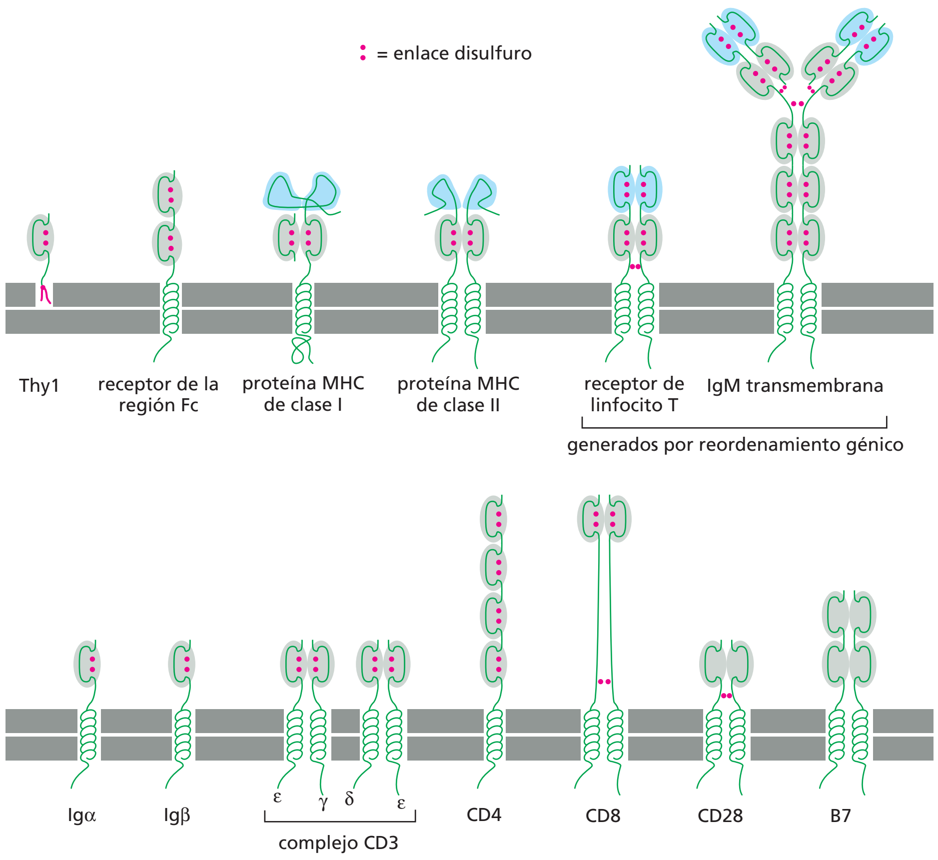


Figura 25–74 Algunas de las proteínas de membrana pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas descritas en este capítulo. Los dominios Ig y sus homólogos se muestran en color *gris* y los dominios de unión al antígeno (los cuales no siempre son dominios Ig) en *azul*. La función de Thy1 es desconocida, pero se halla fijada a la membrana plasmática mediante un anclaje glucosilfosfatidilinositol (GPI) y se utiliza ampliamente para la identificación de linfocitos T en ratones. La superfamilia de las inmunoglobulinas también incluye muchas proteínas de superficie celular implicadas en las interacciones intercelulares aparte del sistema inmune, tales como la molécula de adhesión celular neural (NCAM) descrita en el Capítulo 19 y los receptores de diferentes factores de crecimiento analizados en el Capítulo 15 (no se muestran). Existen más de 750 miembros pertenecientes a la superfamilia de las Ig en la especie humana.

historia evolutiva común. En esta **superfamilia Ig** se incluyen los anticuerpos, los TCR, las proteínas MHC, los correceptores CD4, CD8 y CD28, las proteínas coestimuladoras B7 y la mayoría de las cadenas polipeptídicas invariables asociadas a los TCR y a los BCR, así como diversos receptores Fc expresados por linfocitos y otros leucocitos. Todas estas proteínas contienen uno o más dominios Ig u homólogos. De hecho, alrededor de un 15% de las aproximadamente 250 proteínas que han sido caracterizadas en la membrana de los leucocitos pertenece a esta superfamilia. Muchas de estas moléculas son dímeros u oligómeros en los cuales los dominios Ig u homólogos que pertenecen a una cadena interaccionan con los de la otra (**Figura 25–74**).

Por lo general, cada dominio homólogo a Ig se halla codificado por un exón distinto. Parece ser que toda la superfamilia génica evolucionó a partir de un gen que codificaba un solo dominio homólogo a Ig –similar al que codifica la β_2-microglobulina (véase la Figura 25–50A y 25–52) o la proteína Thy-1 (véase Figura 25–74)– y cuyo producto génico participaría en la mediación de las interacciones intercelulares. Existen evidencias que demuestran que este gen primigenio surgió antes de que los vertebrados divergieran de sus antepasados invertebrados, hace unos 400 millones de años. Probablemente, nuevos miembros de la familia surgieron por duplicación de genes y de exones.

Los diferentes segmentos génicos que codifican los anticuerpos y los TCR se originaron cuando un elemento transponible, o transposón (descrito en el Capítulo 5), se insertó en un exón de un gen que codificaba un miembro de la familia Ig localizado en una célula ancestral semejante a los linfocitos. El transposón podría contener los ancestros de los genes *Rag*, los cuales, tal como se describió anteriormente, codifican las proteínas que inician la recombinación V(D)J; la demostración que las proteínas RAG pueden actuar como transposones *in vitro* refuerza esta hipótesis. Cuando el transposón quedó insertado en el exón, el gen se expresaría sólo si el transposón fuera cortado por las proteínas RAG y los dos extremos del exón se unieran de nuevo, tal como ocurre en el ensamblaje de los fragmentos génicos *V* y *J* de una cadena Ig ligera (véase Figura 25–38). Una segunda inserción del transposón en el mismo exón, dividiría el gen en tres segmentos equivalentes, los actuales *V*, *D* y *J*. La posterior duplicación de los segmentos génicos individuales o de todo el gen generarían las reorganizaciones génicas que caracterizan los sistemas inmunitarios adquiridos de los vertebrados actuales.

Resumen

Para ser activados, los linfocitos T colaboradores vírgenes necesitan diversas señales proporcionadas por células dendríticas activadas. Así, una señal se genera por los complejos MHC-péptido, expresados en la membrana plasmática de las células dendríticas, al unirse a los TCR y a los correceptores CD4 expresados por los linfocitos T. Otras señales proceden de proteínas coestimuladoras expresadas por las células dendríticas, como CD28, y de citoquinas secretadas. Tras su activación por una célula dendrítica, un linfocito T colaborador virgen se diferenciará en un linfocito efector T_H1 o bien T_H2, en función de las proteínas señales que se encuentren en el medio. Los linfocitos T_H1 activarán a macrófagos, a linfocitos T citotóxicos y a linfocitos B, mientras que los linfocitos T_H2 activarán, principalmente, a linfocitos B. En ambos casos, los linfocitos T colaboradores efectores reconocen en la célula diana el mismo complejo péptido extraño-proteína MHC de clase II que de manera previa habían reconocido en la célula dendrítica que los activó. Estos linfocitos efectores activan a sus células diana mediante una combinación de proteínas coestimuladoras tanto secretadas como integrantes de membrana; una de estas últimas es el ligando CD40, utilizado tanto por los linfocitos T_H1 como por los T_H2.

Los linfocitos B, de manera semejante a los linfocitos T, requieren de diversas señales simultáneas para su activación. La interacción del antígeno con su receptor (BCR) proporciona una señal, mientras que los linfocitos T colaboradores efectores específicos de antígeno generan el resto de señales. La necesidad de diversas señales para la activación tanto de los linfocitos T como B ayuda a evitar una inadecuada y peligrosa activación de linfocitos, incluidos los autorreactivos.

La mayoría de las proteínas que, en el sistema inmunitario, están involucradas en el reconocimiento intercelular y antigénico, incluyendo anticuerpos, TCR, proteínas MHC así como otros receptores que se han descrito en este capítulo, pertenecen a la antigua superfamilia de las inmunoglobulinas. Se cree que esta familia ha evolucionado a partir de un gen inicial que codificaba un solo dominio Ig. La diversificación de los anticuerpos y de los receptores de los linfocitos T mediante recombinación de segmentos génicos podría haberse originado mediante la inserción de un transposón en uno de los genes codificantes de la familia Ig.

BIBLIOGRAFÍA

General

Abbas AK, Lichtman AH & Pober JS (2005) Cellular and Molecular Immunology 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders.

Janeway CA Jr, Travers P, Walport M & Shlomchik M (2005) Immunobiology: The Immune System in Health and Disease 6.ª ed. London: Garland Science.

Linfocitos y bases celulares de la inmunidad adquirida

Ahmed R & Rousse BT (eds) (2006) Immunological memory. *Immunol Rev* 211:5–337.

Ebert LM, Schaerli P & Moser B (2005) Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Mol Immunol* 42:799–809.

Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B & Vinuesa CG (2005) Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 435:590–597.

Gourley TS, Wherry EJ, Masopust D & Ahmed R (2004) Generation and maintenance of immunological memory. *Semin Immunol* 16:323–333.

Janeway CA Jr & Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197–216.

Kyewski B & Klein L (2006) A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* 24:571–606.

Singh NJ & Schwartz RH (2006) Primer: mechanisms of immunologic tolerance. *Nature Clin Pract Rheumatol* J2:44–52.

Steinman RM & Hemmi H (2006) Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 311:17–58.

Wiedle G, Dunon D & Imhof BA (2001) Current concepts in lymphocyte homing and recirculation. *Crit Rev Clin Lab Sci* 38:1–31.

Linfocitos B y anticuerpos

Burton DR & Woof JM (1992) Human antibody effector function. *Adv Immunol* 51:1–84.

Davies DR & Cohen GH (1996) Interactions of protein antigens with antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7–12.

Davies DR, Padlan EA & Sheriff S (1990) Antibody-antigen complexes. *Annu Rev Biochem* 59:439–473.

Jimenez R, Salazar G, Baldridge KK & Romesberg FE (2003) Flexibility and molecular recognition in the immune system. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:92–97.

Padlan EA (1994) Anatomy of the antibody molecule. *Mol. Immunol.* 31:169–217.

Zhang M, Srivastava G & Lu L (2004) The pre-B cell receptor and its function during B cell development. *Cell Mol Immunol* 1:89–94.

Generación de la diversidad de los anticuerpos

Besmer E, Gourzi P & Papavasiliou FN (2004) The regulation of somatic hypermutation. *Curr Opin Immunol* 16:241–245.

Corcoran AE (2005) Immunoglobulin locus silencing and allelic exclusion. *Semin Immunol* 17:141–154.

Dudley DD, Chaudhuri J, Bassing CH & Alt FW (2005) Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv Immunol* 86:43–112.

Honjo T, Nagaoka H, Shinkura R & Muramatsu M (2005) AID to overcome the limitations of genomic information. *Nature Immunol* 6:655–61.

Jung D & Alt FW (2004) Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell* 116:299–311.

Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R & Alt FW (2006) Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol* 24:541–570.

Longerich S, Basu U, Alt F & Storb U (2006) AID in somatic hypermutation and class switch recombination. *Curr Opin Immunol* 18:164–174.

Maizels N (2005) Immunoglobulin gene diversification. *Annu Rev Genet* 39:23–46.

Neuberger M & Di Noia JM (2007) Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* 76: en prensa.

Neuberger MS, Harris RS, Di Noia JM & Petersen-Mahrt SK (2003) Immunity through DNA deamination. *Trends Biochem Sci* 28:305–312.

Selsing E (2006) Ig class switching: targeting the recombinational mechanism. *Curr Opin Immunol* 18:249–254.

Linfocitos T y proteínas MHC

Coutinho A, Caramalho I, Seixas E & Demengeot J (2005) Thymic commitment of regulatory T cells is a pathway of TCR-dependent selection that isolates repertoires undergoing positive or negative selection. *Curr Top Microbiol Immunol* 293:43–71.

Krogsgaard M & Davis MM (2005) How T cells 'see' antigen. *Nature Immunol* 6:239–245.

Loureiro J & Ploegh HL (2006) Antigen presentation and the ubiquitin-proteasome system in host-pathogen interactions. *Adv Immunol* 92:225–305.

McDevitt HO (2000) Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 18:1–17.

Mellman I & Steinman RM (2001) Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106:255–258.

Pulendran B (2004) Immune activation: death, danger and dendritic cells. *Curr Biol* 14:R30–32.

Reis e Sousa C (2006) Dendritic cells in a mature age. *Nature Rev Immunol* 6:476–483.

Rudolph MG, Stanfield RL & Wilson IA (2006) How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 24:419–466.

Russell JH & Ley TJ (2002) Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 20:323–370.

Sallusto F, Geginat J & Lanzavecchia A (2004) Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22:745–763.

Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R et al (2006) Foxp3$^+$ CD25$^+$ CD4$^+$ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 212:8–27.

Starr TK, Jameson SC & Hogquist KA (2003) Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21:139–176.

Steinman RM, Bonifaz L, Fujii S et al (2005) The innate functions of dendritic cells in peripheral lymphoid tissues. *Adv Exp Med Biol* 560:83–97.

Trombetta ES & Mellman I (2005) Cell biology of antigen processing *in vitro* and *in vivo*. *Annu Rev Immunol* 23:975–1028.

Villasenor J, Benoist C & Mathis D (2005) AIRE and APECED: molecular insights into an autoimmune disease. *Immunol Rev* 204:156–164.

von Boehmer H (2004) Selection of the T-cell repertoire: receptor-controlled checkpoints in T-cell development. *Adv Immunol* 84:201–238.

Watanabe N, Wang YH, Lee HK et al (2005) Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4$^+$CD25$^+$ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436:1181–1185.

Linfocitos T colaboradores y activación linfocitaria

Abbas AK (2003) The control of T cell activation vs. tolerance. *Autoimmun Rev* 2:115–118.

Alegre ML, Frauwirth KA & Thompson CB (2001) T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nature Rev Immunol* 1:220–228.

Barclay AN (2003) Membrane proteins with immunoglobulin-like domains–a master superfamily of interaction molecules. *Semin Immunol* 15:215–223.

Castellino F & Germain RN (2006) Cooperation between CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells: when, where, and how. *Annu Rev Immunol* 24:519–540.

Deane JA & Fruman DA (2004) Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annu Rev Immunol* 22:563–598.

Dustin ML, Tseng SY, Varma R & Campi G (2006) T cell-dendritic cell immunological synapses. *Curr Opin Immunol* 18:512–516.

Eason DD, Cannon JP, Haire RN et al (2004) Mechanisms of antigen receptor evolution. *Semin Immunol* 16:215–226.

Matthews SA & Cantrell DA (2006) The role of serine/threonine kinases in T-cell activation. *Curr Opin Immunol* 18:314–320.

McHeyzer-Williams LJ, Malherbe LP & McHeyzer-Williams MG (2006) Helper T cell-regulated B cell immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 311:59–83.

Mills DM & Cambier JC (2003) B lymphocyte activation during cognate interactions with CD4$^+$ T lymphocytes: molecular dynamics and immunologic consequences. *Semin Immunol* 15:325–329.

Murphy KM & Reiner SL (2002) The lineage decisions of helper T cells. *Nature Rev Immunol* 2:933–944.

Peggs KS & Allison JP (2005) Co-stimulatory pathways in lymphocyte regulation: the immunoglobulin superfamily. *B J Haematol* 130:809–824.

Reinhardt RL, Kang SJ, Liang HE & Locksley RM (2006) T helper cell effector fates—who, how and where? *Curr Opin Immunol* 18:271–277.

Reth M & Brummer T (2004) Feedback regulation of lymphocyte signalling. *Nature Rev Immunol* 4:269–277.

Samelson LE (2002) Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu Rev Immunol* 20:371–394.

Steinman RM, Hawiger D & Nussenzweig MC (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21:685–711.

Villiers MB, Perrin-Cocon L, Marche PN & Villiers C (2004) Complement receptors and B lymphocytes. *Crit Rev Immunol* 24:465–478.

Glosario

abrazadera deslizante
sliding clamp
Complejo proteico que une la DNA polimerasa sobre el DNA durante la replicación del DNA. (Figura 5–18)

aceptor de electrones
electron acceptor
Átomo o molécula que toma con facilidad electrones, ganando así electrones y, por tanto, reduciéndose.

acetil CoA
acetyl CoA
Pequeña molécula hidrosoluble que transporta grupos acetilo en las células. Está formada por un grupo acetilo unido al coenzima A (CoA) a través de un enlace tioéster fácilmente hidrolizable. (Figura 2–62)

acetilcolina
***acetylcholine* (ACh)**
Neurotransmisor que actúa en una clase de sinapsis química conocida como sinapsis colinérgica. Se encuentra tanto en el cerebro como en el sistema nervioso periférico. Es el neurotransmisor de las uniones neuromusculares de los vertebrados. (Figura 15–9)

acetilo ($-COCH_3$)
***acetyl* ($-COCH_3$)**
Grupo químico derivado del ácido acético (**CH_3COOH**). Los grupos acetilo son importantes en el metabolismo y también se agregan covalentemente a algunos tipos de proteínas como modificaciones en el proceso de postraducción.

ácido
acid
Dador de protones. Sustancia que libera protones (H^+) cuando se disuelve en agua, formando iones hidronio (H_3O^+) y disminuyendo el pH. (Panel 2–2, pp. 108-109)

ácido desoxirribonucleico – *véase* **DNA**
deoxyribonucleic acid

ácido graso
fatty acid
Ácido carboxílico unido a una cadena de carbohidrato. Una de las fuentes principales de energía del metabolismo y como punto de partida para la síntesis de fosfolípidos. (Panel 2–5, pp. 114-115)

ácido nucleico
nucleic acid
RNA o DNA: una macromolécula formada por una cadena de nucleótidos unidos entre sí mediante enlaces fosfodiéster.

ácido ribonucleico – *véase* **RNA**
ribonucleic acid

acoplamiento quimiosmótico (quimiosmosis)
chemiosmotic coupling (chemiosmosis)
Mecanismo a través del cual un gradiente de iones hidrógeno (un gradiente de pH) a través de una membrana es utilizado para impulsar un proceso que requiere energía, como la producción de ATP o la rotación del flagelo de una bacteria.

actina
actin
Abundante proteína que forma los filamentos de actina en todas las células eucariotas. La forma monomérica a veces se denomina globular o actina G, y la forma polimérica se denomina filamentosa o actina F. (Panel 16–1, p. 968, y Figura 16–12)

activador (proteína activadora de genes, activador transcripcional)
activator (gene activator protein, transcriptional activator)
Proteína reguladora de gen que, cuando se une a su secuencia reguladora del DNA, activa la transcripción.

acuoso
aqueous
Perteneciente al agua, como por ejemplo una solución acuosa.

adaptación
adaptation
(1) Adaptación (desensibilización): ajuste de la sensibilidad tras una estimulación repetida. Mecanismo que permite a una célula reaccionar frente a pequeños cambios en los estímulos incluso cuando los valores basales de estimulación son elevados. (2) Adaptación evolutiva: característica que ha evolucionado.

adenililo ciclasa (adenilato ciclasa)
adenylyl cyclase (adenylate cyclase)
Enzima unida a membrana que cataliza la formación de AMP cíclico a partir de ATP. Componente importante de algunos procesos de señalización intracelular.

adenosina trifosfato – *véase* **ATP**
adenosine triphosphate

adhesión focal (contacto focal, placa de adhesión)
focal adhesión (focal contact, adhesion plaque)
Unión de anclaje celular en el que una pequeña región de la superficie de un fibroblasto o de otra célula se halla anclada a la matriz extracelular. La unión se produce mediante proteínas transmembrana como las integrinas, que están unidas, a través de otras proteínas, a los filamentos de actina del citoplasma.

ADP (adenosina 5'-difosfato)
ADP (adenosine 5'-diphosphate)
Nucleótido producido por la hidrólisis del fosfato terminal del ATP. Regenera ATP cuando es fosforilado mediante un proceso generador de energía como la fosforilación oxidativa. (Figura 2–57.)

adrenalina (epinefrina)
adrenaline (epinephrine)
Hormona liberada por las células cromafines de la glándula adrenal sobre todo en respuesta al estrés, y que se une específicamente a GPCR. Puede iniciar y coordinar una respuesta de "lucha o huida", en la que se incluye un incremento de la frecuencia cardíaca y de los niveles sanguíneos de azúcar. También es un neurotransmisor de tipo catecolamina.

aeróbico
aerobic
Que ocurre o requiere la presencia de oxígeno molecular (O_2).

afinidad
affinity
Fuerza de unión de una molécula con su ligando en un solo lugar de unión.

Akt (proteína quinasa B, PKB)
Akt (protein kinase B, PKB)
Proteína serina treonina quinasa que actúa en la vía de señalización intracelular PI 3-quinasa y que participa especialmente en la señalización del crecimiento y el desarrollo de las células. También se denomina proteína quinasa B (PKB). (Figura 15–64)

alcalino – *véase* **básico**
alkaline

aldehído
aldehyde
Compuesto orgánico que contiene el grupo [$-C\lessgtr^{O}_{H}$]. Un ejemplo es el gliceraldehído. Puede oxidarse a ácido o reducirse a alcohol. (Panel 2–1, p. 107)

alelo
allele
Cada una de las diferentes formas alternativas de un gen. En una célula diploide cada gen por lo general tendrá dos alelos, cada uno de los cuales ocupa la misma posición (locus) en cromosomas homólogos.

alga
alga (plural ***algae***)
Término informal utilizado para describir una gran variedad de organismos fotosintéticos eucariotas, tanto unicelulares como pluricelulares. Como ejemplos pueden citarse *Nitella*, *Volvox* y *Fucus*.

almidón
starch
Polisacárido compuesto exclusivamente por unidades de glucosa; utilizado por las células vegetales como almacén de material. (Figura 2–75)

alostería (adjetivo alostérico)
allostery (adjective ***allosteric***)
Cambio de conformación de una proteína realizado por la unión de un ligando regulador (en un lugar de la proteína diferente del lugar catalítico) o por una modificación covalente. El cambio de conformación altera la actividad de la proteína y puede constituir la base de un movimiento dirigido. (Figuras 3–58 y 16–61)

alvéolo
alveoli (singular ***alveolus***)
Pequeñas cavidades de un epitelio, especialmente del epitelio pulmonar, donde forman millones de pequeños saquitos llenos de aire. Se encuentran estructuras similares a ésta en el epitelio glandular productor de leche de la glándula mamaria.

ameba
amoeba (plural ***amoebae***)
Protozoo unicelular carnívoro que avanza utilizando pseudópodus.

amida
amide
Molécula que contiene un grupo carbonilo unido a una amina. (Panel 2–1, p. 107)

amina
amina
Grupo químico que contiene nitrógeno e hidrógeno. En agua a pH = 7 pasa a estar cargado positivamente. (Panel 2–1, p. 107)

amino terminal – *véase* **N terminal**
amino terminus

aminoácido
amino acid
Molécula orgánica que contiene un grupo amino y un grupo carboxilo. Los que constituyen los bloques estructurales de las proteínas son aminoácidos alfa, ya que el grupo carboxilo y el grupo amino se hallan sobre el mismo átomo de carbono ($NH_2CHRCOOH$, Panel 3–1, pp. 128-129)

aminoacil tRNA sintetasa
aminoacyl tRNA synthetase
Enzima que une el aminoácido correcto a una molécula de tRNA y forma un aminoacil tRNA. (Figura 6–57)

amortiguador o tampón
buffer
Solución de ácido débil o de base débil que resiste cambios de pH cuando se añaden pequeñas cantidades de ácido o cuando la solución se diluye.

AMP (adenosina 5' monofosfato)
AMP (adenosine 5'-monophosphate)
Uno de los cuatro nucleótidos de una molécula de RNA. Al AMP se le pueden añadir dos fosfatos, obteniéndose ATP. (Panel 2–6, pp. 116-117)

AMP cíclico (cAMP)
cyclic AMP (cAMP)
Nucleótido que se genera a partir del ATP por la adenilato ciclasa en respuesta a varias señales extracelulares. El cAMP actúa como molécula señal intracelular, principalmente activando la quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA). Se hidroliza a AMP mediante una fosfodiesterasa. (Figura 15–34)

anabolismo (biosíntesis)
anabolism (biosynthesis)
Formación de moléculas complejas a partir de compuestos sencillos en las células vivas. (Figura 2–36)

anaeróbico
anaerobic
Que necesita, o que se produce, en *ausencia* de oxígeno molecular (O_2).

anafase
anaphase
(1) Fase de la mitosis durante la cual las cromátidas hermanas se separan una de la otra. Compuesta por la anafase A (los cromosomas se desplazan hacia los dos polos del huso) y la anafase B (los polos del huso se separan entre sí). (2) Anafase I y anafase II: estados de la meiosis durante los cuales se separan los cromosomas homólogos emparejados (I) y entonces se separan las cromátidas hermanas (II). (Panel 17–1, pp. 1072-1073)

análisis de retraso en gel
gel mobility shift assay
Técnica que permite detectar la presencia de proteínas unidas específicamente a secuencias de DNA, gracias al hecho de que la unión de estas proteínas retrasa ligeramente la migración del fragmento de DNA a través del gel durante una electroforesis. (Figura 7–27)

análisis de tipo Northern
Northern blotting
Técnica en la que fragmentos de RNA separados por electroforesis son inmovilizados sobre una lámina de papel. A continuación se detecta un RNA determinado mediante la hibridación con una sonda de ácido nucleico marcada.

análisis de tipo Southern
Southern blotting
Técnica mediante la cual diferentes fragmentos de DNA separados por electroforesis son inmovilizados sobre una lámina de papel. A continuación los fragmentos de interés se detectan específicamente utilizando una sonda de ácido nucleico marcada. (Se denomina así por E.M. Southern, inventor de la técnica.)

análisis de tipo Western (análisis inmunológico)
Western blotting (immunoblotting)
Técnica mediante la cual diversas proteínas son separadas por electroforesis, inmovilizadas sobre una lámina de papel y entonces analizadas, por lo general uniéndolas a un anticuerpo marcado.

anclaje GPI (anclaje de glucosil fosfatidilinositol)
GPI anchor (glycosylphosphatidylinositol anchor)
Unión lipídica mediante la cual algunas proteínas de membrana están unidas a la membrana. La proteína se une, a través de un oligosacárido, a un anclaje de fosfatidilinositol durante su viaje a través del retículo endoplasmático. (Figura 10–19(6))

anfipático
amphipathic
Que tiene regiones hidrofóbicas y regiones hidrofílicas, como una molécula de fosfolípido o de detergente.

angiogénesis
angiogenesis
Crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos ya existentes.

Ångstrom (Å)
Ångstrom (Å)
Unidad de longitud utilizada para medir átomos y moléculas. Equivale a 10^{-10} metros o 0,1 nanómetros (nm).

anillo contráctil
contractile ring
Haz anular que contiene actina y miosina, que se forma debajo de la superficie de las células animales en división. Se contrae separando las dos células hijas. (Figura 17–50)

anión
anion
Ion cargado negativamente.

antibiótico
antibiotic
Sustancia, como la penicilina o la estreptomicina, que es tóxica para los microorganismos. Habitualmente está producido por un microorganismo o por una planta determinados.

anticodón
anticodon
Secuencia de tres nucleótidos de una molécula de RNA de transferencia (tRNA), que es complementaria de la secuencia de tres nucleótidos del codón de una molécula de RNA mensajero (mRNA).

anticuerpo (inmunoglobulina, Ig)
antibody (immunoglobulin, Ig)
Proteína producida por los linfocitos B en respuesta a una molécula extraña o a un microorganismo invasor. Se une muy fuertemente a la molécula o célula extrañas inactivándolas o marcándolas para su destrucción mediante fagocitosis o lisis inducida por complemento.

anticuerpo monoclonal
monoclonal antibody
Anticuerpo segregado por una línea celular de hibridoma. Dado que un hibridoma está generado por la fusión de una solo linfocito B con una sola célula tumoral, cada hibridoma produce moléculas de anticuerpo que son idénticas entre sí. (Figura 8–8)

antígeno
antigen
Molécula capaz de provocar una respuesta inmune adquirida o que puede unirse a un anticuerpo o a un receptor de linfocitos T.

antiparalela
antiparallel
Describe la orientación relativa de las dos cadenas en una doble hélice de DNA o de dos regiones apareadas de una cadena polipeptídica; la polaridad que presenta una cadena está orientada en sentido opuesto a la de la otra cadena.

antiportador
antiporter
Proteína que transporta dos iones o pequeñas moléculas diferentes a través de una membrana en sentidos opuestos de forma simultánea o secuencial. (Figura 11–8)

apareamiento (apareamiento homólogo)
pairing (homolog pairing)
En la meiosis, alineamiento de dos cromosomas homólogos a lo largo de toda su longitud. (Figura 21–6)

APC – *véase* **proteína APC**

APC/C – *véase* **complejo promotor de la anafase**

apical
apical
Se refiere al extremo de una célula, una estructura o un órgano. La superficie apical de una célula epitelial es la superficie libre opuesta a la superficie basal. La superficie basal se halla sobre la lámina basal que separa el epitelio de otro tejido.

apoptosis
apoptosis
Forma de muerte celular programada, en la cual se activa un programa en una célula animal, que conduce a la muerte celular mediada por enzimas proteolíticas intracelulares denominadas caspasas.

Arabidopsis thaliana
Pequeña planta con flores relacionada con la mostaza. Organismo modelo para plantas con flores y el primer modelo de estudio de la genética molecular de plantas.

ARF (factor ribosilador del ADP, proteína ARF)
ARF (ADP-ribosilation factor, ARF protein)
GTPasa monomérica de la superfamilia Ras responsable de la regulación tanto del ensamblaje de la cubierta COPI como del ensamblaje de la cubierta de clatrina en las membranas del Golgi. (Tabla 15–5, p. 926)

aromático
aromatic
Molécula que contiene átomos de carbono dispuestos en un anillo y que habitualmente se dibuja como si estuvieran unidos entre sí mediante enlaces alternos sencillos y dobles. A menudo, molécula relacionada con el benceno.

arqueobacteria
archeon (plural ***arch(a)ea***) ***(archaebacterium)***
Organismo unicelular sin núcleo, superficialmente similar a una bacteria. A nivel molecular está más relacionado con la maquinaria metabólica de una bacteria pero su maquinaria genética se semeja más a la de los eucariotas. Las arqueas y las bacterias conforman los procariotas. (Figura 1–21)

ARS – *véase* **secuencia replicativa autónoma**

áster
aster
Sistema de microtúbulos dispuestos radialmente, como una estrella, que emanan de un centrosoma o de un polo del huso mitótico.

atenuación de la transcripción
transcription attenuation
Inhibición de la expresión de genes por una terminación prematura de la transcripción.

ATM (proteína mutada de ataxia telangiectasia)
ATM (ataxia telangiectasia muted protein)
Proteína quinasa activada por roturas del DNA de doble cadena. Si estas roturas no son reparadas, ATM inicia una cascada de señalización que culmina en la parada del ciclo celular. Está relacionada con ATR.

ATP (adenosina 5' trifosfato)
ATP (adenosine 5'-triphosphate)
Nucleósido trifosfato compuesto por adenina, ribosa y tres grupos fosfato. Es el principal transportador de energía química en las células. Los grupos fosfato terminales son altamente reactivos en el sentido de que su hidrólisis o transferencia a otra molécula se produce liberando una gran cantidad de energía libre. (Figura 2–26)

ATP sintasa (F_0F_1 ATPasa)
ATP synthase (F_0F_1 ATPase)
Complejo enzimático transmembrana situado en la membrana interna de la mitocondria y en la membrana tilacoidal del cloroplasto. Cataliza la formación de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico durante la fosforilación oxidativa y la fotosíntesis, respectivamente. También está presente en la membrana plasmática de las bacterias.

ATPasa
ATPase
Enzima que cataliza un proceso que implica la hidrólisis de ATP. Muchas proteínas tienen actividad ATPasa

ATR (proteína relacionada con la ataxia telangiectasia y Rad3)
ATR (ataxia telangiectasia and Rad3 related protein)
Proteína quinasa activada por roturas del DNA. Si estas roturas no son reparadas, ATR colabora en iniciar una cascada de señalización que culmina en la parada del ciclo celular. Está relacionada con ATM.

atracción de van der Waals
van der Waals attraction
Tipo de enlace no-covalente (individualmente débil) que se forma entre átomos no polares próximos. (Tabla 2–1, p. 53 y Panel 2–3, pp. 110-111)

autofagia
autophagy
Digestión por los lisosomas de la propia célula, de orgánulos agotados funcionalmente.

autorradiografía
autoradiography
Técnica por la cual un elemento radiactivo produce una imagen de sí mismo sobre una película fotográfica o una emulsión.

autosoma
autosome
Cualquier cromosoma que no sea un cromosoma sexual.

auxina
auxin
Hormona vegetal, habitualmente el ácido 3-indol acético, que ejerce numerosas funciones en el crecimiento y el desarrollo de las plantas.

avidez
avidity
Fuerza total de unión de un anticuerpo polivalente a un antígeno polivalente.

axón
axon
Larga prolongación de una neurona capaz de conducir con rapidez impulsos nerviosos a largas distancias, haciendo llegar señales a otras células.

axonema
axoneme
Haz de microtúbulos y proteínas asociadas que forman el eje interno de un cilio o de un flagelo en las células eucariotas y que es el responsable de sus movimientos.

ayuste (o maduración)
splicing
Eliminación de los intrones de un transcrito de pre-mRNA, uniendo entre sí los exones situados a cada lado de cada intrón. La palabra castellana "ayuste" corresponde a un tipo de nudo marinero mediante el cual se empalman dos cabos, en un proceso semejante al del "splicing". *Véase también* maduración alternativa del RNA *y* transmaduración.

azúcar
sugar
Pequeños carbohidratos formados por unidades de monómeros de fórmula general $(CH_2O)_n$. Como ejemplos pueden citarse los monosacáridos glucosa, fructosa y manosa y el disacárido sacarosa (formado por una molécula de glucosa y una de fructosa unidas entre sí). (Panel 2–4, pp. 112-113)

BAC – *véase* **cromosoma bacteriano artificial**

bacteria (eubacteria)
bacterium (plural ***bacteria***) ***(eubacterium)***
Miembro del dominio Bacteria, una de las tres ramas principales del árbol de la vida (Arquea, Bacteria o Eucariota). Las bacterias y las arqueas carecen de compartimiento nuclear diferenciado y juntas forman los Procariotas.

bacteriófago (fago)
bacteriophage (phage)
Cualquier virus que infecte bacterias. Los fagos fueron los primeros organismos utilizados para el estudio de las bases moleculares de la genética y en la actualidad son utilizados con frecuencia como vectores de clonación. *Véase también* bacteriófago lambda.

bacteriófago lambda (bacteriófago λ, lambda)
bacteriophage lambda (bacteriophage λ, lambda)
Virus que infecta *E. coli*. Ampliamente utilizado como vector de clonación de DNA.

bacteriorrodopsina
bacteriorhodopsin
Pigmento proteico que se encuentra en la membrana plasmática de una bacteria afín a la sal, *Halobacterium salinarium (Halobacterium halobium)*. Bombea protones hacia el exterior de la célula en respuesta a la luz. (Figura 10–33)

balsa lipídica
lipid raft
Pequeña región de la membrana plasmática enriquecida en esfingolípidos y colesterol. (Figura 10–14)

banda preprofásica
preprophase band
Banda circunferencial de microtúbulos y de filamentos de actina que se forma alrededor de una célula vegetal, debajo de la membrana plasmática, antes de la mitosis y la división celular. (Figura 17–57)

basal
basal
Situado cerca de la base. Opuesta a la superficie apical.

base
base
Sustancia que puede reducir el número de protones en solución, aceptando directamente iones H^+ o liberando iones OH^-, los cuales se combinarán con H^+ formando H_2O. Las purinas y las pirimidinas del DNA y del RNA son ba-

ses orgánicas nitrogenadas y a menudo se las denomina simplemente como bases. (Panel 2–2, pp. 108-109)

básico (alcalino)
basic (alkaline)
Que tiene las propiedades de una base.

benigno
benign
Tumor de crecimiento autolimitado y no invasivo.

beta-catenina (β-catenina)
beta-catenina (β-catenina)
Proteína citoplasmática multifuncional que participa en la adhesión célula-célula mediada por cadherinas, uniendo cadherinas al citoesqueleto de actina. También puede actuar independientemente como proteína reguladora de genes. Desempeña un papel importante en el desarrollo animal como parte del proceso de señalización Wnt.

biblioteca (no **librería**) **de DNA**
DNA library
Colección de moléculas de DNA clonadas, que representan un genoma completo (biblioteca genómica) o copias en DNA de las moléculas de RNA mensajero producidas por una célula (biblioteca de cDNA).

bicapa lipídica (bicapa fosfolipídica)
lipid bilayer (phospolipid bilayer)
Fina capa bimolecular formada sobre todo por moléculas de fosfolípido, que constituye el núcleo estructural de todas las membranas celulares. Las dos láminas de moléculas lipídicas están empaquetadas con sus colas hidrófobas hacia el interior y sus cabezas hidrófilas hacia el exterior, expuestas al agua. (Figura 2–22 y Panel 2–5, pp. 114-115)

biología química
chemical biology
Denominación de una estrategia que utiliza estudios a gran escala de centenares o de miles de pequeñas moléculas en ensayos biológicos para identificar productos químicos que modifican un proceso biológico particular, por lo que pueden ser utilizados para estudiarlo.

biorientación
bi-orientation
Unión de cromátidas hermanas a los polos opuestos del huso mitótico, de forma que cuando se separen en la anafase, cada una de ellas se desplazará a extremos opuestos de la célula.

biosfera
biosphere
El mundo de los organismos vivos sobre la Tierra.

biosíntesis – *véase* **anabolismo**
biosynthesis

biotina
biotin
Compuesto de bajo peso molecular que actúa de coenzima. Técnicamente es útil como marca covalente de proteínas y permite detectarlas mediante la proteína del huevo avidina, la cual se une muy fuertemente a la biotina. (Figura 2–63)

bivalente
bivalent
Estructura de cuatro cromátidas formadas durante la meiosis, que consisten en un cromosoma duplicado íntimamente apareado con su cromosoma homólogo duplicado.

blastómero
blastomere
Una de las muchas células formadas por la división de un huevo fecundado. (Figura 22–69)

blástula
blastula
Estadio temprano de un embrión animal, que por lo general está formado por una esfera hueca de células epiteliales que rodean una cavidad llena de líquido, antes de que empiece la gastrulación.

bloque haplotípico
haplotype block
Combinación de alelos y de marcadores de DNA que han sido heredados como un gran bloque en uno de los cromosomas de un par homólogo –no afectado por la recombinación genética– a través de muchas generaciones.

bomba
pump
Proteína transmembrana que dirige el transporte activo de iones o de pequeñas moléculas a través de la bicapa lipídica gracias a la hidrólisis de ATP.

bomba de Ca^{2+} (bomba de calcio, Ca^{2+} ATPasa)
Ca^{2+} pump (calcium pump, Ca^{2+} ATPase)
Proteína de transporte situada en la membrana del retículo sarcoplasmático de las células musculares (y también en otros lugares). Bombea Ca^{2+} desde el citoplasma hacia al retículo sarcoplasmático utilizando la energía de hidrólisis del ATP.

bomba de Na^+/K^+ (ATPasa Na^+/K^+)
Na^+/K^+ pump (Na^+/K^+ ATPase)
Proteína transportadora transmembrana que se encuentra en la membrana plasmática de la mayoría de las células animales y bombea Na^+ hacia el exterior de la célula y K^+ hacia el interior, utilizando la energía derivada de la hidrólisis del ATP. (Figura 11–14)

borde en cepillo
brush border
Densa cubierta de microvilli localizada en la superficie apical de las células epiteliales del intestino y del riñón.

C terminal (carboxilo terminal)
C terminus (carboxyl terminus)
Final de una cadena polipeptídica que contiene el grupo carboxilo libre (–COOH). (Figura 3–1)

cadena (o **hebra**) **conductora**
leading strand
Una de las dos cadenas de DNA recién sintetizadas que se encuentran en una horquilla de replicación. La cadena conductora se sintetiza de forma continua en sentido 5' a 3'. (Figura 5–7)

cadena (o **hebra**) **retrasada**
lagging strand
Una de las dos cadenas de DNA recién sintetizadas que se encuentran en una horquilla de replicación. La cadena retrasada se sintetiza en fragmentos discontinuos que se unen entre sí de forma covalente. (Figura 5–7)

cadena de transporte de electrones
electron transport chain
Serie de reacciones a través de las cuales diferentes moléculas transportadoras de electrones se transfieren electrones desde niveles altos de energía hasta niveles bajos de energía, hasta llegar a una molécula aceptora final. La energía liberada con el transporte de electrones puede ser utilizada para impulsar energéticamente varios procesos. Las cadenas de transporte de electrones presentes en la membrana mitocondrial interna (denominada cadena respiratoria) y en la membrana tilacoidal de los cloroplastos generan un gradiente de protones a través de la membrana que es utilizado para impulsar la síntesis de ATP. *Véase especialmente* las Figuras 14–3 y 14–10.

cadena H – *véase* **cadena pesada**
H chain

cadena L – *véase* **cadena ligera**
L chain

cadena lateral
side chain
Parte de un aminoácido que difiere entre los distintos aminoácidos. Las cadenas laterales confieren a cada aminoácido unas propiedades físico-químicas características. (Panel 3–2 pp. 132-133)

cadena ligera (cadena L)
light chain (L chain)
Uno de los polipéptidos pequeños de una proteína formada por varias subunidades, como la miosina (Figura 16–72) o una inmunoglobulina (Figura 25–21).

cadena pesada (cadena H)
heavy chain (H chain)
El más grande de los dos tipos de cadena polipeptídica de una molécula de inmunoglobulina.

cadena respiratoria – *véase* **cadena de transporte de electrones**
respiratory chain

cadherina
cadherin
Miembro de una gran superfamilia de proteínas de adhesión transmembrana. Median la adhesión homofílica célula-célula dependiente de Ca^{2+} en los tejidos animales. (Figura 19–4 y Tabla 19–2, p. 1135)

Caenorhabditis elegans
Pequeño (~1 mm) gusano nematodo muy utilizado en biología molecular y del desarrollo como organismo modelo.

caja TATA
TATA box
Secuencia consenso de la región promotora de muchos genes eucariotas a la cual se une un factor general de transcripción, especificando así la posición en la que se inicia la transcripción. (Figuras 6–16 y 6–17)

CAK – *véase* **quinasa activadora de Cdk**

calmodulina
calmodulin
Proteína ubicua intracelular de unión a Ca^{2+} que sufre un gran cambio de conformación cuando se une a iones Ca^{2+}, permitiendo regular la actividad de muchas proteínas diana. En su forma activa (unida a Ca^{2+}) se denomina Ca^{2+}/calmodulina. (Figura 15–43)

caloría
calorie
Unidad de energía calorífica igual a 4,2 joul. Una caloría ("c" minúscula) es la cantidad de calor necesaria para incrementar 1 ºC la temperatura de un gra-

mo de agua. La kilocaloría (1000 calorías) es la unidad utilizada para describir el contenido energético de los alimentos.

CAM (molécula de adhesión celular)
CAM (cell adhesion molecule)
Proteína de la superficie de una célula animal que media la unión célula-célula o la unión célula-matriz.

CaM-quinasa
CaM-kinase
Proteína serina/treonina quinasa que es activada por Ca^{2+}/calmodulina. Indirectamente media los efectos de un incremento de la concentración citosólica de Ca^{2+} fosforilando proteínas diana específicas. (Figura 15–43)

CaM-quinasa II
CaM-kinase II
Proteína quinasa multifuncional dependiente de Ca^{2+}/calmodulina, que cuando está activa se autofosforila y fosforila a varias proteínas diana. Se encuentra en la mayoría de células de los mamíferos pero es especialmente abundante en las sinapsis del cerebro, ya que participa en algunas formas de plasticidad sináptica en los vertebrados. (Figura 15–44)

cambio de clase
class switch
Es el paso de producir una determinada clase de inmunoglobulina (p. ej. IgM) a producir otra clase (p. ej. IgG) que sufren muchas linfocitos B en el transcurso de una respuesta inmunitaria. Supone un reordenamiento del DNA denominado recombinación de cambio de clase. (Figura 25–41)

cAMP – *véase* **AMP cíclico**

canal (canal de membrana)
channel (membrane channel)
Complejo proteico transmembrana que permite a los iones inorgánicos o a otras moléculas pequeñas difundir pasivamente a través de la bicapa lipídica. (Figuras 11–3 y 11–4)

canal catiónico regulado por voltaje
voltage-gated cation channel
Tipo de canal iónico que se encuentra en la membrana de las células excitables (como las células nerviosas y las musculares). Se abre en respuesta a un cambio en el potencial de membrana que supere el valor umbral.

canal de membrana – *véase* **canal**
membrane channel

canal de pérdida de K^+
K^+ leak channel
Canal de transporte de iones K^+ de la membrana plasmática de las células animales que se mantiene abierto incluso cuando la célula está en reposo. (Panel 11–3, p. 679)

canal iónico
ion channel
Complejo proteico transmembrana que forma un canal lleno de agua a través de la bicapa lipídica, a través del cual pueden difundir determinados iones inorgánicos a favor de su gradiente electroquímico. (Figura 11–21)

canal iónico regulado por transmisor (canal iónico acoplado a receptor, receptor ionotrópico)
transmitter-gated ion channel (ion-channel-coupled receptor, ionotropic receptor)
Canal iónico de la membrana plasmática postsináptica de las células musculares y nerviosas. Sólo se abre en respuesta a la unión de un neurotransmisor extracelular específico. La entrada de iones que se produce tiene como resultado la generación de una señal eléctrica local en la célula postsináptica. (Figuras 15–16 y 11–35)

cáncer
cancer
Enfermedad caracterizada por una división celular anormal y mal controlada que da lugar a crecimientos invasivos, o tumores, que pueden diseminarse por todo el cuerpo. (Figura 20–37)

capa germinal
germ layer
Una de las tres hojas blastodérmicas (endodermo, mesodermo y ectodermo) de un embrión animal. (Figura 22–70)

cápside
capsid
Cubierta proteica de un virus, formada por el autoensamblaje de uno o más tipos de subunidades proteicas formando una estructura geométrica regular. (Figura 3–30)

característica poligénica
polygenic trait
Característica heredable que es influenciada por varios genes, cada uno de los cuales aporta una pequeña contribución al fenotipo.

carbohidrato
carbohydrate
Término general utilizado para denominar a los azúcares y compuestos relacionados que contienen carbono, hidrógeno y oxígeno, habitualmente con la fórmula empírica $(CH_2O)_n$.

carboxilo terminal – *véase* **C terminal**
carboxyl terminus

carcinógeno
carcinogen
Cualquier agente, como un producto químico o una forma de radiación, que causa cáncer.

carcinoma
carcinoma
Cáncer de células epiteliales. Es la forma más común de cáncer en humanos.

cariotipo
karyotype
Juego completo de cromosomas de una célula ordenados en función de su tamaño, forma y número.

cartílago
cartilage
Tejido de la serie del conjuntivo compuesto por células (condrocitos) englobadas en una matriz rica en colágena de tipo II y proteoglucano del tipo condroitín sulfato.

cascada – *véase* **cascada de señalización**
cascade

cascada de fosforilaciones
phosphorylation cascade
Serie de fosforilaciones proteicas secuenciales mediadas por una serie de proteínas quinasa, cada una de las cuales fosforila y activa la quinasa siguiente de la cadena. Este tipo de cascadas son comunes en vías de señalización intracelular. (Figura 15–60)

cascada de señalización
signaling cascade
Secuencias de reacciones intracelulares relacionadas, que típicamente participan en varias etapas de amplificación en cadena que se inician en un receptor de superficie celular activado.

caspasa
caspase
Proteasa intracelular que participa en los procesos celulares de apoptosis.

catabolismo
catabolism
Término general utilizado para reacciones celulares catalizadas por enzimas mediante las cuales moléculas complejas son degradadas a moléculas más sencillas, con liberación de energía. (Figura 2–36)

catalizador
catalyst
Sustancia que puede reducir la energía de activación de una reacción (incrementando así su velocidad) sin ser consumido en dicha reacción.

β-catenina – *véase* **beta-catenina**
β-catenin

catión
cation
Ion cargado positivamente.

caveola
caveola (plural ***caveolae***)
Invaginación de la superficie celular que se proyecta hacia el interior formando vesículas pinocíticas. Se cree que se forman a partir de balsas lipídicas, regiones de la membrana ricas en ciertos lípidos.

CD4
CD4
Proteína correceptora que se halla en las células T colaboradoras, en las células T reguladoras y en los macrófagos. Se une a las proteínas MHC de clase II (de células presentadoras de antígeno), fuera del surco de unión al péptido.

CD8
CD8
Proteína correceptora que se encuentra en las células T citotóxicas. Se une a las proteínas MHC de clase I (de células presentadoras de antígeno), fuera del surco de unión al péptido.

CD28
CD28
Proteína correceptora de las células T que se une a la proteína coestimuladora B7 de las células dendríticas y proporciona una señal adicional necesaria para la activación de una célula T virgen.

Cdc6
Cdc6
Proteína esencial en la preparación del DNA para su replicación. Con Cdt1, se une a un complejo de reconocimiento de origen sobre el DNA cromosómico y colabora a cargar las proteínas Mcm sobre el complejo formando el complejo prerreplicativo.

Cdc20
Cdc20
Subunidad activadora del complejo promotor de la anafase (APC/C).

Cdc25
Cdc25
Proteína fosfatasa que desfusforila Cdk e incrementa su actividad.

Cdk – *véase* **quinasa dependiente de ciclina**

Cdk de la fase M – *véase* **M-Cdk**
M-phase Cdk

cDNA
cDNA
Molécula de DNA sintetizada como una copia de un mRNA y que, por lo tanto, carece de los intrones que se hallan presentes en el DNA genómico

Cdt
Cdt
Proteína esencial en la preparación del DNA para su replicación. Con Cdc6 se une a los complejos de reconocimiento de origen sobre el DNA cromosómico y colabora a cargar las proteínas Mcm sobre el complejo formando el complejo prerreplicativo.

cebador
primer
Oligonucleótido que se aparea con una cadena patrón de DNA o de RNA y estimula la síntesis de una cadena complementaria, una polimerasa.

cebador de RNA
RNA primer
Pequeño fragmento de RNA sintetizado sobre un patrón de DNA. Es necesario para que las DNA polimerasas puedan iniciar la síntesis de DNA.

célula amplificadora de transición
transit amplifying cell
Célula derivada de una célula madre que se divide un número limitado de ciclos antes de diferenciarse de forma terminal. (Figura 23–7)

célula blanca de la sangre (leucocito)
white blood cell (leucocyte)
Término general que designa a todas las células sanguíneas nucleadas que no tienen hemoglobina. Incluye linfocitos, granulocitos y monocitos.

célula ciliada del oído (célula ciliada sensorial)
auditory hair cell (sensory hair cell)
Células sensoriales del interior del oído, responsables de la detección de los sonidos al convertir los estímulos mecánicos (las vibraciones causadas por las ondas del sonido) en liberaciones de un neurotransmisor. (Figuras 23–13 a 23–15)

célula citotóxica
killer cell
Una célula eucariota capaz de inducir la apoptosis en otra célula eucariota

célula citotóxica natural (célula NK)
natural killer cell (NK cell)
Célula citotóxica del sistema inmunitario innato que puede inducer la apoptosis en células infectadas por virus y en algunas células cancerosas. (Figura 24–57)

célula de Schwann
Schwann cell
Célula glial responsable de la formación de la vaina de mielina en el sistema nervioso periférico. *Compárese* con oligodendrocito. (Figura 11–32)

célula dendrítica
dendritic cell
El tipo de células presentadoras de antígenos más potente que capta un antígeno, lo procesa y lo presenta a los linfocitos T.

célula efectora
effector cell
Célula que lleva a cabo la respuesta final o la función final de un proceso determinado. Por ejemplo, las principales células efectoras del sistema inmunitario son los linfocitos activados y los fagocitos, que colaboran en la eliminación de los patógenos.

célula endocrina
endocrine cell
Célula animal especializada que segrega una hormona a la sangre. Habitualmente forma parte de una glándula, como la tiroides o la hipófisis.

célula endotelial
endothelial cell
Célula aplanada que forma una capa (el endotelio) que reviste el interior de todos los vasos sanguíneos y linfáticos.

célula ES – *véase* **célula madre embrionaria**
ES cell

célula folicular
follicle cell
Uno de los tipos celulares que rodean un oocito en desarrollo o un huevo. (Figura 21–24)

célula germinal
germ cell
Célula de la línea germinal de un organismo, que incluye los gametos haploides y sus células precursoras diploides específicas. Las células germinales que contribuyen a la formación de una nueva generación de organismos son diferentes de las células somáticas, las cuales forman el cuerpo y no tienen descendientes.

célula germinal primordial
primordial germ cell
Célula de un embrión que es precursora de las células germinales, las cuales dan lugar a los gametos. (Figuras 21–17, 21–23 y 21–30)

célula glial
glial cell
Células no neuronales de soporte del sistema nervioso. Incluye los oligodendrocitos y los astrocitos del sistema nervioso central de los vertebrados, y las células de Schwann del sistema nervioso periférico.

célula madre
stem cell
Célula indiferenciada que puede continuar dividiéndose indefinidamente, produciendo células hijas que pueden sufrir una diferenciación terminal y dar lugar a tipos celulares determinados o mantenerse como célula madre (en el proceso de autorrenovación). (Figura 23–5)

célula madre embrionaria (célula ES)
embryonic stem cell (ES cell)
Célula derivada de la masa celular interna de un embrión temprano de mamífero. Es capaz de dar lugar a todas las células del cuerpo. Puede ser cultivada, modificada genéticamente e insertada en un blastocisto, desarrollando un animal transgénico.

célula madre hematopoyética
hemopoietic stem cells
Célula autorrenovante de la médula ósea roja que genera todos los tipos de células sanguíneas y otros tipos de células.

célula mieloide
myeloid cell
Cualquier célula sanguínea que forma parte de la serie blanca excepto los linfocitos. (Figura 23–42)

célula mioepitelial
myoepithelial cell
Tipo de célula con capacidad contráctil que se encuentra en los epitelios, p.ej. en el iris del ojo y en tejidos glandulares. (Figura 23–47)

célula muscular
muscle cell
Tipo celular especializado en la contracción. Los tres principales tipos son las esqueléticas, las cardíacas y las lisas. (Figura 23–47)

célula muscular cardíaca –*véase* **célula muscular**
heart muscle cell

célula muscular esquelética – *véase* **célula muscular**
skeletal muscle cell

célula muscular lisa – *véase* **célula muscular**
smooth muscle cell

célula nerviosa – *véase* **neurona**
nerve cell

célula NK – *véase* **célula citotóxica natural**
NK cell

célula nodriza
nurse cell
Célula de los ovarios de muchas especies de invertebrados, que está conectada a un oocito en desarrollo mediante puentes citoplasmáticos, proporcionándole ribosomas, mRNA y proteínas necesarios para el desarrollo del embrión temprano. (Figura 21–24)

célula pre-B
pre-B cell
Precursor inmediato de un linfocito B. (Figura 25–22)

célula presentadora de antígeno
antigen-presenting cell
Célula que en su superficie presenta antígenos no propios acomplejados con proteínas MHC, para presentarlos a los linfocitos T.

célula roja de la sangre – *véase* **eritrocito**
red blood cell

célula somática
somatic cell
Cualquier célula de una planta o de un animal, que no sea una célula germinal o un precursor de una célula germinal. Del griego *soma*, cuerpo.

celularización
cellularization
Formación de células alrededor de cada núcleo en un citoplasma plurinucleado, transformándolo en una estructura pluricelular.

células HeLa
HeLa cells
Línea "inmortal" de células epiteliales humanas que crece vigorosamente en cultivo. Derivada en 1951 de un carcinoma cervical humano.

celulosa
cellulose
Polisacárido estructural de la pared celular vegetal, formado por largas cadenas de unidades de glucosa unidas covalentemente entre sí. Proporciona fuerza tensora a las paredes de las células vegetales. (Figuras 19–78 y 19–79)

centríolo
centriole
Formación microtubular cilíndrica y corta, estructuralmente muy similar a un corpúsculo basal. Por lo general, las células animales tienen un par de centríolos en el área central del centrosoma. (Figura 16–31)

centro de hierro-azufre
iron-sulfur center
Grupo transportador de electrones formado por dos o cuatro átomos de hierro unidos al mismo número de átomos de azufre, que se encuentra en un tipo de proteínas transportadoras de electrones. (Figura 14–23)

centro de inactivación del cromosoma X (XIC)
X-inactivation center (XIC)
En un cromosoma X, lugar en el que se inicia la inactivación de este cromosoma y desde el cual se extiende.

centro de reacción fotoquímico
photochemical reaction center
Parte de un fotosistema que convierte la energía lumínica en energía química durante la fotosíntesis. (Figura 14–43)

centro organizador de microtúbulos (MTOC)
microtubule-organizing center (MTOC)
Región de la célula, como un centrosoma o un corpúsculo basal, a partir de la cual crecen los microtúbulos.

centrómero
centromere
Región constreñida de un cromosoma mitótico que mantiene unidas entre sí las cromátidas hermanas. También es el lugar del DNA en el que se forma el cinetocoro, que captura microtúbulos del huso mitótico. (Figura 4–50)

centrosoma
centrosome
Orgánulo localizado en el área central de las células animales que es el principal centro organizador de microtúbulos (MTOC) y que actúa como polo del huso mitótico durante la mitosis. En la mayoría de células animales contiene un par de centríolos. (Figuras 16–30 y 17–29)

cetona
ketone
Molécula orgánica que contiene un grupo carbonilo unido a dos grupos alquilo. (Panel 2–1, p. 107)

chaperona (chaperona molecular)
chaperone (molecular chaperone)
Proteína que ayuda a otras proteínas a plegarse de forma correcta o a evitar plegamientos incorrectos. Incluyen las proteínas de estrés térmico (Hsp).

chaperonas de histonas (factor ensamblador de la cromatina)
histone chaperone (chromatin assembly factor)
Proteína que se une a histonas libres, liberándolas después de que se hayan incorporado en cromatina acabada de replicar. (Figura 4–30)

ChIP – *véase* **inmunoprecipitación de la cromatina**

ciclina
cyclin
Proteína cuya concentración aumenta y disminuye periódicamente de forma coordinada con el ciclo de división celular eucariota. Las ciclinas activan proteínas quinasa cruciales (denominadas proteínas quinasa dependientes de ciclina o Cdk), colaborando así en el control de la progresión desde un estadio del ciclo celular al siguiente.

ciclina G_1
G_1-cyclin
Ciclina presente en la fase G_1 del ciclo celular eucariota. Forman complejos con Cdk que ayudan a gobernar la actividad de las ciclinas G_1/S, las cuales controlan la progresión a la fase S.

ciclina G_1/S
G_1/S-cyclin
Ciclina que activa Cdk en G_1 tardía del ciclo celular eucariota y, por tanto, ayuda a disparar la progresión a través de Start, comprometiendo a la célula a entrar en el ciclo celular. Sus niveles caen al inicio de la fase S. (Figura 17–16)

ciclina M
M-cyclin
Tipo de ciclina presente en todas las células eucariotas, que impulsa el desarrollo de la mitosis. (Figura 17–16)

ciclina S
S-cyclin
Miembro de una clase de ciclinas que se acumula durante el final de la fase G_1 y se une a Cdk inmediatamente después de iniciarse el ciclo; ayuda a estimular la replicación del DNA y la duplicación de los cromosomas. Los niveles se mantienen elevados hasta el final de la mitosis, tras lo cual son destruidas. (Figura 17–16)

ciclo celular (ciclo de división celular)
cell cycle (cell-division cycle)
Ciclo reproductor de una célula: secuencia ordenada de acontecimientos mediante los cuales una célula duplica sus cromosomas y, habitualmente, los demás componentes celulares, y se divide en dos. (Figura 17–4)

ciclo de Calvin – *véase* **ciclo de fijación del carbono**
Calvin cycle

ciclo de fijación del carbono (ciclo de Calvin)
carbon-fixation cycle (Calvin cycle)
Vía metabólica principal de los organismos fotosintéticos mediante la cual el CO_2 y el H_2O se transforman en carbohidratos. Requiere tanto ATP como NADPH. (Figura 14–40)

ciclo de Krebs – *véase* **ciclo del ácido cítrico**
Krebs cycle

ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) – *véase* **ciclo del ácido cítrico**
tricarboxylic acid (TCA) cycle

ciclo del ácido cítrico (ciclo de los ácidos tricarbuxílicos, ciclo de Krebs)
citric acid cycle (tricarboxylic acid cycle, Krebs cycle)
Ruta metabólica central que se encuentra en organismos aeróbicos. Oxida grupos acetilo derivados de moléculas alimenticias, generando los transportadores activados NADH y $FADH_2$, algo de GTP y grandes cantidades de CO_2. En las células eucariotas tiene lugar en las mitocondrias. (Panel 2–9, pp. 122-123)

ciclo TCA – *véase* **ciclo del ácido cítrico**
TCA (tricarboxylic acid) cycle

ciclosoma – *véase* **complejo estimulador de la anafase**
cyclosome

cigoto
zygote
Célula diploide originada por la fusión de un gameto masculino y un gameto femenino. Óvulo fecundado.

ciliado
ciliate
Organismo eucariota unicelular (protozoo) que se caracteriza por tener muchos cilios sobre su superficie.

cilio
cilium (*plural* ***cilia***)
Extensión filiforme de una célula eucariota que contiene un haz de microtúbulos en su parte central. Muchas células presentan un solo cilio que no es móvil, mientras que otras presentan grandes cantidades de cilios que realizan movimientos repetidos de batido. *Compárese* con flagelo.

cilio primario
primary cilium
Cilio corto, único e inmóvil, sin dineína, que aparece a partir de un corpúsculo basal y se proyecta desde la superficie de muchos tipos celulares animales. Algunas proteínas de señalización se concentran en el cilio primario. (Figura 15–48)

cinetocoro
kinetochore
Estructura compleja formada por proteínas en un cromosoma mitótico, a la que se unen los microtúbulos. Desempeña un papel activo en el desplazamiento de los cromosomas hacia los polos. Se forma sobre el centrómero del cromosoma. (Figura 17–36)

cis
cis
En el mismo lugar o cercano. Del mismo lado.

cisterna
cisterna (*plural* ***cisternae***)
Compartimiento aplanado, delimitado por una membrana, como los que forman el retículo endoplasmático o en el complejo de Golgi. (Figuras 13–3 y 13–25)

citocinesis
cytokinesis
División en dos del citoplasma de una célula animal o vegetal, lo cual es diferente del proceso de división de su núcleo (que es la mitosis). Parte de la fase M. (Panel 17–1, pp. 1072-1073)

citocromo
cytochrome
Proteína coloreada que contiene un grupo hemo que transfiere electrones durante la respiración celular y la fotosíntesis.

citocromo *c*
cytochrome c
Componente soluble de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Su liberación al citosol a partir del espacio intermembrana de la mitocondria también inicia la apoptosis. (Figura 14–26)

citoesqueleto
cytoskeleton
Sistema de filamentos proteicos del citoplasma de las células eucariotas que da forma a la célula y proporciona la capacidad de realizar movimientos di-

rígidos. Sus componentes más abundantes son los filamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios.

citoplasma
cytoplasm
Contenido de una célula que se halla delimitado por la membrana plasmática y en el caso de las células eucariotas, en el exterior del núcleo.

citoquina
cytokine
Proteína o péptido señal extracelular que actúa como mediador local en la comunicación célula-célula.

citosol
cytosol
Contenido del principal compartimiento del citoplasma, excluyendo los orgánulos rodeados de membrana como el retículo endoplasmático y las mitocondrias, y el citoesqueleto.

CKI – *véase* **proteína inhibidora de Cdk**

clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS)
fluorescence-activated cell sorter (FACS)
Aparato que clasifica células de acuerdo con su fluorescencia. (Figura 8–2)

clatrina
clathrin
Proteína que se ensambla formando una red poliédrica en la cara citosólica de una membrana, dando lugar a una depresión revestida de clatrina que, por endocitosis, forma una vesícula revestida de clatrina intracelular. (Figura 13–6)

clon
clone
Población de individuos idénticos (células u organismos) formada por divisiones (asexuales) repetidas a partir de un ancestro común. También se utiliza como verbo: "clonar un gen" significa producir muchas copias de un gen haciendo crecer un clon de células transportadoras (como *E. coli*) en las que se ha introducido el gen y a partir de las cuales se puede recuperar mediante técnicas de DNA recombinante.

clorofila
chlorophyll
Pigmento verde que absorbe luz y que desempeña un papel central en la fotosíntesis en bacterias, plantas y algas.

cloroplasto
chloroplast
Orgánulo de las algas verdes y de las plantas, que contiene clorofila y que lleva a cabo la fotosíntesis. Se trata de una forma especializada de plastidio.

coactivador
coactivator
Proteína que por sí sola no se une al DNA pero que se ensambla sobre otras proteínas reguladoras de genes unidas al DNA activando la transcripción de un gen. (Figura 7–51)

código de histonas
histone code
Combinaciones de modificaciones químicas de las histonas (como acetilaciones o metilaciones) que parece que determinan cuándo y cómo es accesible el DNA que está empaquetado en los nucleosomas (p.ej., para su replicación o transcripción). (Figura 4–44)

código genético
genetic code
Conjunto de reglas que especifican la correspondencia entre tripletes de nucleótidos (codones) del DNA o del RNA y aminoácidos de las proteínas. (Figura 6–50)

codón
codon
Secuencia de tres nucleótidos de una molécula de DNA o de mRNA, que representa la instrucción de incorporar un determinado aminoácido en una cadena polipeptídica en crecimiento.

coenzima
coenzyme
Pequeña molécula estrechamente asociada con una enzima y que participa en la reacción que cataliza dicha enzima, a menudo formando un enlace covalente con el sustrato. Como ejemplos, la biotina, el NAD^+ y el coenzima A.

coenzima A (CoA)
coenzyme A (CoA)
Pequeña molécula utilizada en la transferencia enzimática de grupos acilo en la célula. *Véase también* acetil CoA y la Figura 2–62.

cofactor
cofactor
Ion inorgánico o coenzima necesario para la actividad de una enzima.

cohesina, complejo de cohesinas
cohesin, cohesin complex
Complejo de proteínas que mantiene unidas las cromátidas hermanas en toda su longitud, antes de su separación. (Figura 17–24)

co-inmunoprecipitación (co-IP)
co-immunoprecipitation (co-IP)
Método utilizado para aislar proteínas que forman un complejo con otras utilizando un anticuerpo específico para una de estas proteínas.

cola poli A – *véase* **poliadenilación**
poly-A tail

colágena
collagen
Proteína fibrosa rica en glicina y en prolina, que es el componente mayoritario de la matriz extracelular en los animales confiriéndole resistencia tensora. Existe en muchas formas: el tipo I, el más común, se encuentra en la piel, los tendones y los huesos; el tipo II se encuentra en los cartílagos; el tipo IV está presente en la lámina basal. (Figuras 3–23 y 19–66)

colesterol
cholesterol
Abundante molécula lipídica de estructura esteroidal característica formada por cuatro anillos. Es un componente importante de la membrana plasmática de las células animales. (Figura 10–4)

complejo antena
antenna complex
Parte de un fotosistema que captura energía lumínica y la canaliza hacia el centro de reacción fotoquímico. Está formado por complejos proteicos que unen una gran cantidad de moléculas de clorofila y de otros pigmentos.

complejo anular de γ-tubulina (γTuRC)
gamma-tubulin ring complex (γTuRC)
Complejo proteico que contiene γ-tubulina y otras proteínas; es un eficiente nucleador de microtúbulos y recubre sus extremos menos.

complejo ARP (proteína relacionada con la actina) (complejo ARP2/3)
ARP (actin-related protein) complex (ARP2/3 complex)
Complejo de proteínas que nuclea el crecimiento y la ramificación de filamentos de actina a partir del extremo menos.

complejo ciclina-Cdk
cyclin-Cdk complex
Complejo proteico formado periódicamente durante el ciclo de división celular eucariota a medida que incrementa el nivel de una ciclina determinada. Entonces, una quinasa dependiente de ciclina (Cdk) pasa a estar parcialmente activada. (Figuras 17–15 y 17–16, y Tabla 17–1, pp. 1063)

complejo citocromo b-c_1
cytochrome* b-c_1 *complex
Segunda de las tres bombas de protones impulsadas por el transporte de electrones de la cadena respiratoria. Acepta electrones de la ubiquinona. (Figura 14–26)

complejo de Golgi
Golgi apparatus (Golgi complex)
Compartimiento de las células eucariotas, formado por un conjunto apilado de cisternas o sáculos planos rodeados por una membrana, en el que las proteínas y los lípidos transferidos desde el retículo endoplasmático son modificados y clasificados. Es el lugar de síntesis de muchos polisacáridos de la pared celular de las células vegetales y de muchos glucosaminoglucanos de la matriz extracelular de las células animales. (Figura 13–25)

complejo de la citocromo oxidasa
cytochrome oxidase complex
Tercera de las tres bombas de protones impulsadas por el transporte de electrones de la cadena respiratoria. Acepta electrones del citocromo *c* y genera agua utilizando oxígeno molecular como aceptor de electrones. (Figura 14–26)

complejo de poro nuclear (NPC)
nuclear pore complex (NPC)
Gran estructura multiproteica que forma un canal (el poro nuclear) a través de la envoltura nuclear, que permite el paso de determinadas moléculas entre el núcleo y el citoplasma. (Figura 12–9)

complejo de preiniciación
preinitiation complex
Complejo multiproteico que se forma sobre el origen de replicación al inicio de la fase S del ciclo celular eucariota. Inicia la síntesis de DNA mediante el desenrollamiento de la hélice de DNA y carga las DNA polimerasas y otras enzimas de replicación sobre las hebras de DNA. (Figura 17–23)

complejo de recombinación
recombination complex
En la meiosis, un complejo proteico que se ensambla en una rotura de la doble cadena de DNA y media en la recombinación homóloga.

complejo de reconocimiento del origen de replicación (ORC)
origin recognition complex (ORC)
Gran complejo proteico que está unido al DNA en los orígenes de replicación de los cromosomas eucariotas durante el desarrollo del ciclo celular. (Figura 5–36)

complejo del gen *Hox*
Hox gen complex
Grupo de genes de *Drosophila* que codifican factores reguladores de genes. Cada uno de ellos contiene un homeodominio y especifica una región cor-

poral diferente. Las mutaciones *Hox* típicamente causan transformaciones homeóticas.

complejo enzimático respiratorio
respiratory enzyme complex
Cualquiera de los principales complejos proteicos de la cadena respiratoria mitocondrial que actúa como bomba de protones, impulsada por el transporte de electrones, y que genera el gradiente de protones a través de la membrana interna. (Figuras 14–14 y 14–26)

complejo MHC (complejo principal de histocompatibilidad)
MHC complex (major histocompatibility complex)
En los vertebrados, complejo de genes que codifican una gran familia de glucoproteínas de superficie celular (moléculas MHC). (Figura 25–51)

complejo NADH deshidrogenasa
NADH dehydrogenase complex
Primera de las tres bombas de protones impulsadas por el transporte de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial. Acepta electrones del NADH. (Figura 14–26)

complejo prerreplicativo (pre-RC)
prereplicative complex (pre-RC)
Complejo multiproteico que se ensambla en el origen de replicación durante la fase final de la mitosis y el inicio de la fase G_1 del ciclo celular. Es un prerrequisito para que se inicie el ensamblaje del complejo de preiniciación y la posterior replicación del DNA. (Figuras 17–22 y 17–23)

complejo principal de histocompatibilidad– *véase* **complejo MHC**
major histocompatibility complex

complejo promotor de la anafase (APC/C) (ciclosoma)
anaphase-promoting complex (APC/C)(cyclosome)
Ubiquitina ligasa que cataliza la ubiquitinización y destrucción de la securina y de las ciclinas M y S, iniciando la separación de las cromátidas hermanas en la transición metafase anafase durante la mitosis.

complejo remodelador de la cromatina
chromatin remodeling complex
Complejo enzimático que altera la configuración histona-DNA de los cromosomas eucariotas y cambia la accesibilidad del DNA a otras proteínas, especialmente las que participan en la transcripción.

complejo sinaptonémico
synaptonemal complex
Estructura que mantiene unidos los cromosomas apareados durante el paquiteno de la profase I de la meiosis y facilita las etapas finales de la recombinación genética. (Figuras 21–8 y 21–9)

complejo TOM
TOM complex
Complejo proteico, formado por varias subunidades, que transporta proteínas a través de la membrana mitocondrial externa. (Figura 12–23)

complejos TIM
TIM complexes
Translocadores proteicos que se encuentran en la membrana mitocondrial interna. El complejo TIM23 media el transporte de proteínas hacia la matriz y la inserción de algunas proteínas en la membrana interna; el complejo TIM22 media la inserción de un subgrupo de proteínas en la membrana interna. (Figura 12–23)

complementación (complementación genética)
complementation (genetic complementation)
Fenómeno mediante el cual la unión de dos individuos, cada uno de los cuales presenta un fenotipo anormal, genera una descendencia en la que se ha recuperado el fenotipo normal (salvaje). Base de un test que permite determinar si dos mutaciones se hallan en el mismo o en cromosomas diferentes. (Panel 8–1, pp. 554-555)

complementario
complementary
(1) De secuencias de ácidos nucleicos: capaz de formar un dúplex por apareamiento perfecto de bases con otro. (Figura 4–4) (2) De otras moléculas que interactúan, como una enzima y su sustrato: que tienen unas características bioquímicas o estructurales que les permiten unirse entre sí de forma que es más fácil la formación de enlaces no-covalentes entre ellas. (Figura 2–16)

concentración crítica
critical concentration
Concentración de una proteína monomérica, como la actina o la tubulina, que está en equilibrio con la forma ensamblada de la proteína (p. ej. ensamblada en filamentos de actina o en microtúbulos, respectivamente). (Panel 16–2, pp. 978-979)

condensina (complejo de condensina)
condensin (condensin complex)
Complejo de proteínas que participa en la condensación de los cromosomas anterior a la mitosis. Diana de la M-Cdk. (Figura 17–27)

condiciones permisivas (no restrictivas)
permisive (nonrestrictive) conditions
Circunstancias (como la temperatura o la disponibilidad de nutrientes) en las que no se presentarán los efectos fenotípicos de los mutantes condicionales, y el fenotipo será normal. (Figura 8–55 y Panel 8–1, pp. 554-555)

condiciones restrictivas (no permisivas)
restrictive (nonpermissive) condition
Circunstancias (como p. ej., temperatura o la disponibilidad de nutrientes) en las que el efecto fenotípico de un mutante condicional será evidente. (Figura 8–55 y Panel 8–1, pp. 554-555)

condrocito (célula cartilaginosa)
chondrocyte (cartilage cell)
Célula del tejido cartilaginoso que secreta la matriz del cartílago.

conexina
connexin
Componente proteico de las uniones comunicantes (o de tipo gap), una proteína que atraviesa la membrana cuatro veces. Seis conexinas se ensamblan en la membrana plasmática formando un conexón u "hemicanal". (Figura 19–34)

conexón
connexon
Poro lleno de agua en la membrana plasmática formado por un anillo de seis subunidades proteicas conexinas. Mitad de una unión comunicante (o de tipo gap): los conexones de dos células adyacentes se unen formando un canal continuo entre ambas células a través del cual pueden pasar iones y moléculas pequeñas. (Figura 19–34)

cono de crecimiento
growth cone
Punta móvil en migración de un axón de una fibra nerviosa en crecimiento. (Figura 16–105)

constante de afinidad (constante de asociación) (K_a)
affinity constant (association constant) (K_a)
Medida de la fuerza de unión de los componentes de un complejo. Para los componentes A y B y un equilibrio de unión $A + B \rightleftharpoons AB$, la constante de asociación viene dada por el cociente $[AB]/[A][B]$, y es mayor, cuanto mayor sea la fuerza de asociación entre A y B. (Figura 3–43)

constante de disociación (K_d)
dissociation constant (K_d)
Medida de la tendencia de un complejo a disociarse. Para los componentes A y B y un equilibrio de unión $A + B \rightleftharpoons AB$, la constante de disociación viene dada por $[A][B]/[AB]$, y es menor, cuanto mayor sea la fuerza de unión entre A y B. La constante de disociación K_d es la recíproca de K_a. *Véase también* constante de afinidad y constante de equilibrio. (Figura 3–43)

constante de equilibrio (K)
equilibrium constant (K)
Relación entre las constantes en un sentido y en otro de una reacción; es igual a la constante de asociación o constante de afinidad (K_a) para una reacción sencilla de unión ($A + B \rightleftharpoons AB$). *Véase también* constante de afinidad, constante de disociación. (Figura 3–44)

constante de Michaelis-Menten – *véase* **K_M**
Michaelis-Menten constant

constitutivo
constitutive
Producido en cantidades constantes con independencia de las circunstancias; contrario a regulado.

control de la actividad proteica
protein activity control
Activación, inactivación, degradación o compartimentación selectivas de determinadas proteínas después de que hayan superado el proceso de síntesis. Uno de los sistemas a través de los cuales las células controlan qué proteínas están activas en un momento dado o en una localización de la célula.

control postranscripcional
post-transcriptional control
Cualquier control de la expresión génica que sea ejercido en una etapa posterior al inicio de la transcripción. (Figura 7–92)

conversión génica
gene conversion
Proceso por el cual la información de una secuencia de DNA puede ser transferida desde una hélice de DNA (que permanece inalterada) a otra hélice de DNA cuya secuencia se verá modificada. A menudo se produce con procesos de recombinación general.

cooperatividad
cooperativity
Fenómeno mediante el cual la unión de una molécula de ligando a una molécula diana favorece la unión de sucesivas moléculas del ligando. Se produce en el ensamblaje de grandes complejos, así como en enzimas y receptores formados por muchas subunidades alostéricas; en este caso la respuesta que se produce en reacción a los ligandos es más pronunciada. (Figura 15–25)

corpúsculo basal
basal body
Formación corta y cilíndrica de microtúbulos y sus proteínas asociadas, que se halla en la base de un cilio o de un flagelo de una célula eucariota. Actúa como centro organizador de microtúbulos. Estructuralmente muy similar a un centríolo.

corpúsculo polar
polar body
La menor de las dos células hijas producidas durante la meiosis mediante una división asimétrica de un oocito primario o secundario. La otra célula hija (la mayor) es el oocito o el óvulo. Los cuerpos polares finalmente degeneran. (Figura 21–13)

corrección de pruebas
proofreading
Proceso por el que los posibles errores producidos durante la replicación del DNA, la transcripción y la traducción son detectados y corregidos.

correceptor
co-receptor
En inmunología: receptor de un linfocito B o de un linfocito T que no se une al antígeno sino que se une a otras moléculas y colabora con el receptor que se une al antígeno en la activación del linfocito. (Figura 25–57) De forma más general: receptor que colabora con otro receptor convencional de superficie celular y facilita que la célula responda a proteínas señal secretadas. Son ejemplos de ello, LRP (en la vía de señalización Wnt/β-catenina) y los proteoglicanos de superficie celular. (Figura 15–77)

correpresor
co-repressor
Proteína que no se une por sí misma al DNA pero que se ensambla sobre otras proteínas reguladoras de genes que se unen al DNA, inhibiendo la expresión de un gen. (Figura 7–51)

córtex celular
cell cortex
Franja especializada de citoplasma adosada a la cara interna de la membrana plasmática. En las células animales es una capa rica en actina, responsable de los movimientos de la superficie celular.

cotraduccional
co-translational
Que ocurre a medida que se produce la traducción. Como ejemplos, la importación de una proteína en el retículo endoplasmático antes de que la cadena polipeptídica se haya acabado de sintetizar (translocación cotraduccional, Figura 12–35), o el plegamiento de una proteína naciente adquiriendo su estructura secundaria y terciaria a medida que va emergiendo del ribosoma. (Figura 6–84)

cotransporte (transporte acoplado)
co-transport (coupled transport)
Proceso de transporte a través de membrana en el cual la transferencia de una molécula depende de la transferencia simultánea o secuencial de otra molécula. (Figura 11–8)

Cre/lox
Cre/lox
Sistema de recombinación específico de lugar utilizado para producir mutantes condicionales en los que el gen diana puede ser eliminado de un tejido determinado o en un momento determinado. Se introduce una recombinasa específica de lugar (Cre) bajo el control de un promotor que la activará a voluntad del experimentador. El gen que se va a eliminar está flanqueado por secuencias lox introducidas experimentalmente, sobre las que Cre activada actúa; el resultado es la eliminación del gen. (Figura 5–79)

cremallera de leucina
leucine zipper
Motivo estructural encontrado en muchas proteínas que se unen a DNA, en el que dos hélices α de proteínas diferentes se unen entre sí como una hélice superenrollada (parecida a una cremallera) y dan lugar a un dímero proteico. (Figura 7–19)

cresta
crista (plural ***cristae***)
Invaginaciones de la membrana mitocondrial interna.

cresta neural
neural crest
Colección de células localizadas a lo largo de la línea donde el túbulo neural sobresale de la epidermis que le rodea en el embrión de los vertebrados. Las células de la cresta neural migran dando lugar a una gran variedad de tejidos, incluyendo las neuronas y la glia del sistema nervioso periférico, las células pigmenarias de la piel y los huesos de la cara y de la mandíbula. (Figuras 19–11, 22–84 y 22–97)

criba genética
genetic screen
Procedimiento utilizado para descubrir los genes que afectan aspectos específicos del fenotipo estudiando grandes cantidades de individuos mutantes.

criptocromo
cryptochrome
Flavoproteína que responde a la luz azul. Se encuentra tanto en plantas como en animales. En animales está implicada en los ritmos circadianos.

cristalografía de rayos X (difracción de rayos X)
x-ray crystalography (X-ray diffraction)
Técnica para determinar la distribución tridimensional de los átomos de una molécula en base al patrón de difracción de los rayos X que atraviesan un cristal de la molécula. (Figura 8–28)

cromátida
chromatid
Una de las dos copias de un cromosoma duplicado formada por la replicación del DNA durante la fase S. Las dos cromátidas, denominadas cromátidas hermanas, están unidas entre sí en el centrómero.

cromátidas hermanas
sister chromatids
Par de cromosomas estrechamente unidos entre sí que aparecen por duplicación de un cromosoma durante la fase S. Se separan durante la fase M y se segregan en las dos células hijas. (Figura 17–26)

cromatina
chromatin
Complejo de DNA, histonas y proteínas no histonas que se halla en el núcleo de las células eucariotas. Material del que están formados los cromosomas.

cromatografía
chromatography
Conjunto de técnicas bioquímicas que permiten separar una mezcla de sustancias en función de su carga, tamaño, hidrofobicidad, afinidad de unión no—covalente o alguna otra propiedad, al permitir que la mezcla se reparta entre una fase móvil y una fase estacionaria. *Véase también* cromatografía de afinidad, cromatografía de afinidad de DNA y cromatografía líquida de alta resolución. (Figuras 8–13 y 8–14)

cromatografía de afinidad
affinity chromatography
Tipo de cromatografía en la que la mezcla de proteínas a purificar se hace pasar a través de una matriz a la que se han unido ligandos específicos de la proteína de interés, de forma que dicha proteína es retenida en la matriz. (Figura 8–13)

cromatografía de afinidad de DNA
DNA affinity chromatography
Técnica para purificar proteínas que se unen de forma específica a secuencias de DNA. La purificación se consigue mediante la unión de estas proteínas a una matriz que tiene unidos los fragmentos de DNA adecuados. (Figura 7–28)

cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
high-performance liquid chromatography (HPLC)
Tipo de cromatografía que utiliza columnas empaquetadas con una matriz formada por diminutas esferas densamente empaquetadas. Para hacer pasar a través de esta columna la solución a separar, se aplican altas presiones.

cromosoma
chromosome
Estructura compuesta por una molécula muy larga de DNA y por proteínas asociadas, que contiene parte (o toda) la información hereditaria de un organismo. Son especialmente evidentes en las células animales y vegetales durante la mitosis o la meiosis, cuando cada cromosoma se condensa en una estructura cilíndrica compacta visible al microscopio óptico.

cromosoma bacteriano artificial (BAC)
bacterial artificial chromosome (BAC)
Vector de clonación que puede contener grandes fragmentos de DNA de hasta 1 millón de pares de bases.

cromosoma mitótico
mitotic chromosome
Cromosoma duplicado altamente condensado, en el que los dos nuevos cromosomas todavía se mantienen unidos por el centrómero como cromátidas hermanas.

cromosoma plumulado
lampbrush chromosome
Cromosoma apareado en la meiosis de los oocitos inmaduros de anfibio, en el que la cromatina forma grandes bucles rígidos que se extienden a ambos lados del eje lineal del cromosoma. (Figura 4–54)

cromosoma politénico
polytene chromosome
Cromosoma gigante en el que el DNA se ha replicado de forma repetida y las copias se mantienen juntas. (Figuras 4–58 y 4–59)

cromosoma sexual
sex chromosome
Cromosoma que puede estar presente o no, o presente en un número variable de copias de acuerdo con el sexo del individuo. En los mamíferos, los cromosomas X e Y.

cromosoma X
X chromosome
Uno de los dos cromosomas sexuales en las células de los mamíferos. Las células de las mujeres tienen dos cromosomas X mientras que las de los hombres únicamente tienen uno.

cromosoma Y
Y chromosome
Uno de los dos cromosomas sexuales en las células de los mamíferos. Las células de los hombres tienen un cromosoma Y y un cromosoma X.

cromosomas homólogos (homólogo)
homologous chromosome (homolog)
Las copias paterna y materna de un determinado cromosoma de una célula diploide.

cuerpo medio
midbody
En las células animales, estructura que se forma al final de la segmentación y que puede persistir durante algún tiempo como un puente entre las dos células hijas. (Figura 17–51)

dador de electrones
electron donor
Molécula que fácilmente libera un electrón y se oxida en el proceso.

DAG – *véase* **diacilglicerol**

dalton
dalton
Unidad de masa molecular. Es aproximadamente igual a la masa de un átomo de hidrógeno ($1{,}66 \times 10^{-24}$ g).

decaimiento de moléculas de mRNA sin sentido
nonsense-mediated mRNA decay
Mecanismo de eliminación de moléculas de mRNA aberrantes que contienen codones stop en localizaciones anómalas, antes de que puedan ser traducidas. (Figura 6–80)

dedo de zinc
zinc finger
Motivo estructural de unión al DNA que está presente en muchas proteínas reguladoras de genes. Todos los motivos de dedos de zinc incorporan uno o más átomos de zinc que colaboran en el mantenimiento de la conformación de la proteína.

degenerado
degenerate
No se trata de un juicio moral sino de un adjetivo que describe varios estados que realizan aproximadamente la misma función. Por ejemplo, diferentes combinaciones de tres bases nucleotídicas (codones) que codifican el mismo aminoácido.

dendrita
dendrite
Expansión de una célula nerviosa, a menudo delicadamente ramificada, que recibe impulsos procedentes de otras células nerviosas.

dependencia de anclaje
anchorage dependence
Crecimiento, proliferación y supervivencia de una célula, que resulta dependiente de la unión de la célula a un sustrato.

dermis
dermis
Capa de tejido conjuntivo de la piel, situada debajo de la epidermis. Es rica en colágeno.

desensibilización – *véase* **adaptación**
desensitization

deshidrogenasa
dehydrogenase
Enzima que elimina un ion hidruro (H^-), equivalente a un protón más dos electrones, de una molécula de sustrato.

desmosoma
desmosome
Tipo de unión de anclaje célula-célula, habitualmente formada entre dos células epiteliales adyacentes. Se caracteriza por presentar densas placas de proteína en las que se insertan filamentos intermedios de las células unidas. (Figura 19–3)

desnaturalización
denaturation
Cambio extraordinario de conformación de una proteína o de un ácido nucleico, causado por calentamiento o por exposición a agentes químicos. Por lo general conlleva la pérdida de la función biológica.

desoxirribosa
deoxyribose
El monosacárido de cinco carbonos componente del DNA. Se diferencia de la ribosa en poseer un H en el carbono 2 en lugar de un OH. $C_5H_{10}O_4$. *Compárese* con la ribosa.

despolarización
depolarization
Cambio del potencial de membrana de una célula hasta un valor más negativo en el interior.

destino celular
cell fate
En biología del desarrollo, describe a qué tipo celular dará lugar normalmente una célula determinada en una etapa concreta de desarrollo.

determinación
determination
En biología del desarrollo, se dice que una célula embrionaria está determinada si está comprometida a seguir alguna vía especializada del desarrollo. La determinación refleja algún cambio en las características internas de la célula y precede el proceso de diferenciación celular, detectable mucho más fácilmente.

determinante antigénico (epítopo)
antigenic determinant (epitope)
Región específica de una molécula de antígeno que se une a un anticuerpo o a un receptor de linfocitos T.

diacilglicerol (DAG)
diacylglycerol (DAG)
Lípido producido por la rotura de fosfolípidos de inositol en respuesta a señales extracelulares. Está compuesto por dos cadenas de ácido graso unidas a un glicerol y actúa como molécula señal pequeña colaborando en la activación de la proteína quinasa C (PKC). (Figura 15–38)

diferenciación
differentiation
Proceso por el cual una célula sufre un cambio hacia un tipo celular claramente especializado.

difusión
diffusion
Desplazamiento neto de las moléculas hacia zonas de menor concentración, debido a oscilaciones térmicas aleatorias.

difusión facilitada – *véase* **transporte pasivo**
facilitated diffusion

dinamina
dynamin
GTPasa citosólica que se une al cuello de una vesícula revestida de clatrina en el proceso de gemación de la membrana y que participa en la finalización de la formación de la vesícula.

dineína
dynein
Proteína motora de gran tamaño asociada a microtúbulos que se desplaza sobre ellos de manera dependiente de ATP.

diploide
diploid
Que contiene dos juegos de cromosomas homólogos y, por lo tanto, dos copias de cada gen o locus genético. (*Compárese* con haploide.)

disco imaginal
imaginal disc
Grupo de células que en el embrión de *Drosophila* se presentan juntas, aparentemente indiferenciadas, y que se desarrollarán dando lugar a una estructura adulta, como un ojo, una pata o un ala. En la metamorfosis se produce una diferenciación manifiesta. (Figura 22–51)

disco Z (línea Z)
Z disc (Z line)
Región aplanada de un sarcómero muscular a la que se unen los extremos más de los filamentos de actina. En las micrografías se observa como una línea negra transversal.

división celular
cell division
Partición de una célula en dos células hijas. En las células eucariotas comprende la división del núcleo (mitosis) estrechamente seguida de la división del citoplasma (citocinesis).

DNA (ácido desoxirribonucleico)
DNA (deoxyribonucleic acid)
Polinucleótido formado por unidades de desoxirribonucleótidos unidas covalentemente entre sí. Contiene la información hereditaria de una célula y actúa como transportador de esta información de generación en generación. (Figura 4–3 y Panel 2–6, pp. 116-117)

DNA complementario – *véase* **cDNA**
complementary DNA

DNA dúplex
duplex DNA
DNA de doble cadena

DNA genómico
genomic DNA
DNA que constituye el genoma de una célula o de un organismo. Se utiliza en contraposición al cDNA (DNA preparado por transcripción inversa a partir de mRNA). Los clones de DNA genómico representan DNA clonado directamente a partir del DNA cromosómico; una colección de tales clones de un genoma determinado se denomina biblioteca de DNA genómico.

DNA helicasa
DNA helicase
Enzima implicada en la abertura de la hélice de DNA en cadenas sencillas, para que se produzca la replicación del DNA.

DNA ligasa
DNA ligase
Enzima que une los extremos de dos cadenas de DNA mediante un enlace covalente formando una cadena continua de DNA.

DNA polimerasa
DNA polymerase
Enzima que sintetiza DNA mediante la unión de nucleótidos entre sí y utilizan un patrón de DNA como guía.

DNA primasa
DNA primase
Enzima que sintetiza una corta cadena de RNA sobre un patrón de DNA, produciendo un cebador para la síntesis de DNA. (Figura 5–11)

DNA recombinante
recombinant DNA
Cualquier molécula de DNA formada por la unión de segmentos de DNA procedentes de orígenes distintos.

DNA satélite
satellite DNA
En un cromosoma eucariota, regiones de DNA de secuencia muy repetitiva, habitualmente identificables por su composición poco habitual de nucleótidos. Es característico en los centrómeros (además de otros lugares) de los eucariotas superiores y parece que participan en la función del centrómero. (Figura 4–49)

doble hélice
double helix
Estructura tridimensional del DNA, en la que dos cadenas antiparalelas de DNA que se mantienen unidas mediante enlaces de hidrógeno entre bases, se enrollan formando una hélice. (Figura 4–5)

dominante
dominant
En genética, se refiere al miembro de un par de alelos que es expresado en el fenotipo de un organismo, mientras que el otro alelo no se expresa, a pesar de que ambos alelos se hallan presentes. El opuesto a dominante es recesivo. (Panel 8–1, pp. 554–555)

dominio (dominio proteico)
domain (protein domain)
Porción de una proteína que tiene una estructura terciaria por sí misma. Las proteínas grandes por lo general están compuestas por varios dominios, cada uno de los cuales está conectado con el siguiente a través de regiones cortas y flexibles de cadena polipeptídica. En proteínas muy diferentes se reconocen dominios que son homólogos entre sí.

dominio de homología con la plecstrina (dominio PH)
pleckstrin homology domain (PH domain)
Dominio proteico que se encuentra en proteínas de señalización intracelular. Algunos dominios PH de proteínas señal intracelulares se unen a fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato producidos por la PI 3-quinasa, uniendo la proteína señalizadora la membrana plasmática cuando la PI 3-quinasa es activada.

dominio de la inmunoglobulina (dominio Ig)
immunoglobulin domain (Ig domain)
Dominio proteico característico, de unos 100 aminoácidos, que se encuentra en las cadenas ligeras y en las cadenas pesadas de una inmunoglobulina. Otros dominios similares a éstos, conocidos como dominios semejantes a una inmunoglobulina (*Ig-like*), están presentes en muchas otras proteínas implicadas en interacciones célula-célula y en el reconocimiento de antígeno, y definen la superfamilia de las Ig. (Figura 25–32)

dominio PDZ
PDZ domain
Dominio de unión a proteína presente en muchas proteínas de armazón y que a menudo se utiliza como lugar de unión de colas intracelulares de proteínas transmembrana. (Figura 19–21)

dominio PH – *véase* **dominio de homología con la plecstrina**
PH domain

dominio proteico – *véase* **dominio**
protein domain

dominio SH2
SH2 domain
Región 2 de homología con Src, un dominio proteico que está presente en muchas proteínas de señalización y que se une a una pequeña secuencia de aminoácidos que contiene una fosfotirosina.

Drosophila melanogaster
Especie de una pequeña mosca, habitualmente denominada mosca de la fruta o del vinagre. Es un organismo modelo en genética molecular.

E. coli – *véase* ***Escherichia coli***

ectodermo
ectoderm
Tejido epitelial embrionario (primera hoja blastodérmica) precursor de la epidermis y del sistema nervioso.

ecuación de Nernst
Nernst equation
Expresión cuantitativa que relaciona la relación de concentraciones en el equilibrio de un ion a ambos lados de una membrana permeable con la diferencia de voltaje a través de dicha membrana. (Panel 11–2, p. 670.)

edición del RNA
RNA editing
Tipo de procesamiento del RNA que altera la secuencia de nucleótidos de un transcrito de pre-mRNA después de que haya sido sintetizado, mediante la inserción, deleción o alteración de nucleótidos individuales.

efecto de posición
position effect
Diferencias en la expresión génica que dependen de la posición del gen en el cromosoma y que probablemente reflejan diferencias en el estado de la cromatina a lo largo del cromosoma. Cuando un gen activo se coloca cerca de la heterocromatina, la influencia inactivante de la heterocromatina puede llegar a afectar al gen con un grado variable, dando lugar al *efecto de variegación posicional*. (Figura 4–36)

efrina
ephrin
Una de las familias de proteínas unidas a membrana que se unen al receptor tirosina quinasa (RTK) Eph el cual, entre otras funciones, estimula respuestas de atracción repulsión que guía la migración de las células y de los axones de las células nerviosas en el desarrollo de los animales.

eIF – *véase* **factor de iniciación eucariota**

elastina
elastin
Proteína extracelular que forma fibras extensibles (fibras elásticas) en los tejidos conjuntivos.

electroforesis
electrophoresis
Técnica que permite separar moléculas (típicamente proteínas o ácidos nucleicos) en base a su velocidad de migración a través de un medio poroso cuando se someten a un campo eléctrico intenso.

electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)
SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)
Tipo de electroforesis utilizado para separar proteínas en función de su tamaño. La mezcla de proteínas que se pretenden separar, se trata inicialmente con un detergente fuerte cargado negativamente (SDS) y con un agente reductor (β-mercaptoetanol) y después se hace desplazar través de un gel de poliacrilamida sometido a un campo eléctrico. El detergente y el agente reductor despliegan las proteínas, las liberan de su asociación con otras moléculas y separan las subunidades polipeptídicas. *Véase también* electroforesis.

electrón
electron
Partícula subatómica cargada negativamente que por lo general ocupa orbitales que rodean el núcleo de un átomo. (Figura 2–1)

electroporación
electroporation
Método que permite introducir moléculas de DNA en las células, especialmente en las bacterias. Un breve shock eléctrico hace que temporalmente la membrana celular sea permeable al DNA que no es propio de la célula.

elemento aislante
insulator element
Secuencia de DNA que evita que una proteína reguladora de genes, unida al DNA en la región de control de un gen, influya en la transcripción de los genes adyacentes. (Figura 7–52)

elemento genético móvil
mobile genetic element
Elemento genético (segmento de DNA) que puede desplazarse o autocopiarse a otra posición del genoma.

elemento transponible (transposón)
transposable element (transposon)
Segmento de DNA que puede desplazarse desde una posición a otra del genoma por transposición. (Tabla 5–3, p. 318)

endocitosis
endocytosis
Captación de material al interior de una célula mediante la invaginación de la membrana plasmática y su internalización en forma de vesícula rodeada de membrana. *Véase también* pinocitosis y fagocitosis.

endocitosis mediada por receptor
receptor-mediated endocytosis
Proceso de internalización por endocitosis, de los complejos ligando-receptor desde la membrana plasmática. (Figura 13–53)

endocrino
endocrine
Relativo a las hormonas o a las glándulas que las secretan.

endodermo
endoderm
Tejido embrionario (hoja blastodérmica) precursor del intestino y de los órganos asociados.

endonucleasa
endonuclease
Enzima que rompe la cadena de polinucleótidos de los ácidos nucleicos. *Compárese* con las exonucleasas

endosoma
endosome
Orgánulo de las células animales delimitado por una membrana, que transporta material que se acaba de incorporar por endocitosis. La mayor parte

del material endocitado se transfiere a los lisosomas para su posterior degradación.

endosomas de reciclaje
recycling endosomes
Gran vesícula intracelular, delimitada por una membrana, que está formada a partir de un fragmento de un endosoma; constituye una etapa intermedia en el proceso de retorno de los receptores reciclados hacia la membrana celular. (Figura 13–60)

energía de activación
activation energy
Energía extra que tienen que adquirir los átomos o moléculas, además de su propia energía basal, para poder sufrir una reacción química particular. (Figura 2–44)

energía de enlace
bond energy
Fuerza de la unión química entre dos átomos, medida por la energía en kilocalorías o kilojulios necesaria para romperla.

energía libre (*G*) (energía libre de Gibbs)
free energy (G) (Gibbs free energy)
Energía que se puede extraer de un sistema para impulsar reacciones. Tiene en cuenta cambios en energía y en entropía. (Panel 2–7, pp. 118-119)

enfermedad autoinmune, respuesta autoinmune
autoimmune disease, autoinmune response
Estado patológico en el que el cuerpo desarrolla una respuesta inmune adaptativa contra una o más de sus propias moléculas.

enfermedad priónica
prion disease
Encefalopatías espongiformes transmisibles –como la enfermedad de Kuru y Creutzfeld-Jacob (CJD: *Creutzfeld-Jacob disease*) en humanos, el scrapie en ovejas y la encefalopatía espongiforme bovina (BSE: *bovine spongiform encelophathy* o enfermedad de las vacas locas) en el ganado vacuno– que son causadas y transmitidas por formas anormales e infecciosas de una proteína (priones). (Figura 24–18)

enlace covalente
covalent bond
Unión química estable entre dos átomos que se produce al compartir estos átomos uno o más pares de electrones. (Figura 2–5 y Panel 2–1, pp. 106-107)

enlace de alta energía
high-energy bond
Enlace covalente cuya hidrólisis en las condiciones existentes en la célula viva libera una cantidad de energía libre extraordinariamente elevada. Un grupo unido a una molécula por uno de estos enlaces es transferido con facilidad de una a otra molécula. Como ejemplos se pueden citar los enlaces fosfodiéster del ATP y el enlace tioéster del acetil CoA.

enlace de hidrógeno
hydrogen bond
Enlace no-covalente en el que un átomo de hidrógeno electropositivo es parcialmente compartido por dos átomos electronegativos. (Panel 2–3, pp. 110-111)

enlace disulfuro (–S–S–)
disulfide bond (–S–S–)
Unión covalente formada entre dos grupos sulfhidrilo de dos cisteínas. Para proteínas extracelulares es un sistema habitual de unir dos proteínas o diferentes zonas de una misma proteína. Se forma en el retículo endoplasmático de las células eucariotas. (Panel 2–1, p. 107 y Figura 3–28)

enlace fosfoanhidro
phosphoanhydride bond
Enlace de alta energía que une entre sí grupos fosfato, por ejemplo en el ATP y en el GTP. (Panel 2–6, pp. 116-117)

enlace fosfodiéster
phosphodiester bond
Enlace químico covalente formado cuando dos grupos hidroxilo se unen mediante enlaces éster al mismo grupo fosfato, como entre los nucleótidos adyacentes en el DNA o el RNA. (Figura 2–28)

enlace glucosídico
glycosidic bond
Enlace químico formado por una reacción de condensación entre un grupo hidroxilo del átomo de carbono del azúcar que contiene el grupo aldehído cetona y otra molécula, por lo general otro azúcar. Los enlaces glucosídicos se hallan en numerosas estructuras, incluyendo los polisacáridos, los ácidos nucleicos y las glucoproteínas. *Véase N*-oligosacárido y *O*-oligosacárido. (Panel 2–4, pp. 112-113)

enlace iónico (interacción iónica)
ionic bond (ionic interaction)
Cohesión debida a la atracción electrostática entre dos átomos, uno de ellos con carga positiva y el otro de carga negativa. Uno de los tipos de enlace no-covalente. (Figura 2–5 y Panel 2–3, pp. 110-111)

enlace no-covalente (atracción no-covalente, interacción no-covalente)
noncovalent bond (noncovalent attraction, noncovalent interaction)
Enlace químico en el cual, a diferencia del enlace covalente, no se comparten electrones. Los enlaces no-covalentes son relativamente débiles, pero cuando se producen varios de ellos entre dos moléculas, suman sus fuerzas dando lugar a fuertes interacciones altamente específicas. (Panel 2–3, pp. 110-111)

enlace peptídico
peptide bond
Enlace químico entre el grupo carbonilo de un aminoácido y el grupo amino de otro aminoácido –una forma especial de un enlace amida. En las proteínas, los aminoácidos están unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. (Panel 3–1, pp. 128-129)

enlace químico
chemical bond
Afinidad química entre dos átomos que se unen entre sí. En las células se encuentran de tipo covalente y de tipo no-covalente. (*Véase también* enlace iónico, enlace de hidrógeno.)

enlace tioéster
thioester bond
Enlace de alta energía formado por una reacción de condensación entre un grupo ácido (acilo) y un grupo tiol (-SH). El enlace tioéster se presenta, por ejemplo, en el acetil CoA y en muchos complejos enzima-sustrato. (Figura 2–62)

entrecruzamiento (quiasma)
crossover (chiasma)
En la recombinación meiótica, el entrecruzamiento es el lugar sobre los cromosomas apareados en el que un segmento de la cromátida materna está cambiado por el segmento homólogo correspondiente de una cromátida paterna. (Figuras 21–6 y 21–10)

entropía (S)
entropy (S)
Parámetro termodinámico que mide el grado de desorden de un sistema; cuanto mayor es el desorden mayor es la cantidad de entropía. (Panel 2–7, pp. 118-119)

envoltura nuclear (membrane nuclear)
nuclear envelope (nuclear membrane)
Doble membrana (dos bicapas) que delimita el núcleo celular. Está formada por una membrana interna y otra externa, con numerosas perforaciones o poros nucleares. La membrana externa forma un continuo con el retículo endoplasmático. (Figuras 4–9 y 12–8)

envoltura vírica
viral envelope
Bicapa de fosfolípidos derivada de la membrana plasmática de la célula huésped, que recubre y envuelve a un virus. Incluye también la nucleocápside. (Figura 24–15)

enzima
enzyme
Proteína que cataliza una reacción química determinada.

enzima proteolítica – *véase* **proteasa**
proteolytic enzyme

epidermis
epidermis
Capa epitelial que cubre la superficie externa del cuerpo. Tiene diferentes estructuras en los distintos grupos animales. La capa más externa del tejido vegetal también se denomina epidermis.

epinefrina – *véase* **adrenalina**
epinephrine

epistático
epistatic
Describe una mutación en un gen que enmascara el efecto de una mutación en otro gen cuando ambas mutaciones están presentes en el mismo organismo o en la misma célula.

epitelio
epithelium (plural ***epithelia***)
Capa celular continua que reviste una superficie exterior o que delimita una cavidad.

epítopo – *véase* **determinante antigénico**
epitope

ER – *véase* **retículo endoplasmático**

eritrocito (célula roja de la sangre)
erythrocyte (red blood cell)
Pequeña célula de la sangre de los vertebrados, que contiene hemoglobina y que transporta oxígeno a los tejidos y dióxido de carbono desde los tejidos a los pulmones. (Figura 11–40)

eritropoyetina
erythropoietin
Hormona producida por el riñón que estimula la producción de eritrocitos por las células de la médula ósea roja.

Escherichia coli (E. coli)
Bacteria semejante a una varilla, que por lo general se halla en el colon de los humanos y de otros mamíferos; es ampliamente utilizada en la investigación biomédica.

esfingolípido
sphingolipid
Fosfolípido derivado de la esfingosina. (Figura 10–3)

espectrina
spectrin
Proteína abundante asociada a la cara citosólica de la membrana plasmática de los eritrocitos, que forma un entramado rígido que sostiene la membrana. También se presenta en otras células. (Figura 10–41)

espectrometría de masas (MS)
mass spectrometry (MS)
Técnica que permite identificar compuestos sobre la base de la relación precisa entre su masa y su carga. Potente técnica que permite identificar proteínas y secuenciar polipéptidos (Figura 8–21)

espermatogénesis
spermatogenesis
Producción de espermatozoides en los testículos. (Figura 21–20)

espermatozoide (espermatozoo)
sperm **(*spermatozoon*, plural *spermatozoa*)**
En animales, gameto masculino maduro. Es una célula móvil y generalmente pequeña en comparación con el óvulo. (Figura 21–27)

espliceosoma
spliceosome
Gran complejo formado por moléculas de RNA y de proteínas, que lleva a cabo la maduración del pre-mRNA en las células eucariotas. (Figuras 6–29 y 6–30)

estado de transición
transition state
Estructura que se forma de manera transitoria en el transcurso de una reacción química y que es el intermediario que tiene la mayor energía libre de todos los de la reacción. Su formación es una etapa limitante de la reacción. (Figura 3–46)

éster
ester
Molécula formada por la reacción de condensación de un grupo alcohol y un grupo ácido. Los grupos fosfato generalmente forman ésteres cuando se unen a otra molécula. (Panel 2–1, pp.106-107)

estereocilio
stereocilium
Microvilli gigante que se encuentra en organizaciones en forma de "tubos de órgano", en la superficie apical de las células pilosas del oído. Un estereocilio no contiene microtúbulos sino un haz de filamentos de actina, por lo que no es en realidad un cilio. (Figuras 23–13 y 23–15)

esteroide
steroid
Molécula lipídica e hidrófoba, que tiene una estructura de cuatro anillos característica; derivada del colesterol. Muchas hormonas importantes, como el cortisol y la testosterona son esteroides que activan receptores intracelulares. (Panel 2–5, pp. 114-115)

estocástico
stochastic
Al azar o que implica variables aleatorias, probabilidades o azar.

estroma
stroma
(1) Tejido conjuntivo en el que se halla englobado un epitelio glandular o de otro tipo. Las células del estroma proporcionan el ambiente necesario para el desarrollo de otras células en el tejido. (Figura 20–19) (2) El gran espacio interior de un cloroplasto, que contiene enzimas que catalizan la incorporación de CO_2 a azúcares. (Figura 12–21)

estructura cuaternaria
quaternary structure
Relación tridimensional entre las diferentes cadenas polipeptídicas que constituyen una proteína formada por varias subunidades o un complejo proteico.

estructura primaria
primary structure
Secuencia lineal de unidades monoméricas de un polímero, como la secuencia de aminoácidos de una proteína. También se puede referir a la estructura histológica de una raíz o un tallo jóvenes.

estructura secundaria
secondary structure
Patrón de plegamiento local y regular de una molécula polimérica. En proteínas, las hélices α y las láminas β.

estructura terciaria
tertiary structure
Forma tridimensional compleja de una cadena polimérica plegada en especial de una proteína o de una molécula de RNA.

eubacteria
eubacteria
Bacteria verdadera, en contraposición con las arqueas (arqueobacterias). (Figura 1–21)

eucariota
eucaryote (eukaryote)
Organismo compuesto por una o más células que tienen el núcleo diferenciado. Son los miembros de una de las tres principales divisiones que constituyen el mundo vivo, siendo las otras dos las bacterias y las arqueobacterias. (Figura 1–21)

eucromatina
euchromatin
Región de un cromosoma en interfase que se tiñe de forma difusa; la cromatina "normal" es lo opuesto a la heterocromatina más condensada.

exclusión alélica
allelic exclusion
Expresión de una proteína exclusivamente a partir de uno de los dos alelos del gen que codifican la proteína en la célula, como ocurre por ejemplo en la expresión de una inmunoglobulina, de un receptor de una célula T o de un receptor olfativo.

exocitosis
exocytosis
Proceso mediante el cual son segregadas la mayoría de las moléculas en una célula eucariota. Estas moléculas están empaquetadas en el interior de vesículas que se fusionan con la membrana plasmática y liberan su contenido al exterior.

exón
exon
Segmento de un gen eucariota formado por una secuencia de nucleótidos que posteriormente estará representada en un mRNA, en la molécula final de RNA de transferencia, RNA ribosómico u otra molécula de RNA maduro. En los genes que codifican proteínas, los exones codifican los aminoácidos de la proteína. Por lo general un exón está situado adyacente a una secuencia de DNA no codificante, que se denomina intrón. (Figura 4–15)

exonucleasa
exonuclease
Enzima que elimina nucleótidos de uno en uno, de los extremos de los polinucleótidos.

expresión génica
gene expression
Producción de un producto molecular observable (RNA o proteína) por un gen.

extensión convergente
convergent extension
Reorganización de células en un tejido que hace que éste se extienda en una dimensión y se encoja en otra. (Figura 22–76)

extremo más
plus end
Extremo de un microtúbulo o de un filamento de actina en el que la adición de monómeros se produce con más rapidez que en otras zonas; el extremo de "crecimiento rápido" de un microtúbulo o de un filamento de actina. El extremo más de un filamento de actina también es conocido como extremo en cola. (Panel 16–2, pp. 978-979)

extremo menos
minus end
Extremo de un microtúbulo o de un filamento de actina en el que la adición de monómeros se produce más lentamente; el extremo de "crecimiento lento" de un microtúbulo o de un filamento de actina. El extremo menos de un filamento de actina también es conocido como extremo en punta. (Panel 16–2, pp. 978-979)

F_0F_1 ATPasa – *véase* **ATP sintasa**
F_0F_1 ATPase

factor catastrófico
catastrophe factor
Molécula que desestabiliza las asociaciones de microtúbulos al incrementar la frecuencia de desensamblaje rápida de las subunidades de tubulina de un extremo (catástrofe). (Figura 16–16)

factor de crecimiento
growth factor
Proteína señal extracelular que puede estimular una célula a proliferar. A menudo tienen también otras funciones, como el estímulo para la supervivencia. Como ejemplos, el factor de crecimiento epidérmico (EGF: *epidermal growth factor*) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF: *platelet-derived growth factor*).

factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)
vascular endotelial growth factor (VEGF)
Proteína secretada que estimula el cercimiento de los vasos sanguíneos. (Tabla 15–4, p. 923 y Figura 23–35)

factor de elongación (EF)
elongation factor (EF)
Nomenclatura utilizada tanto en la transcripción como en la traducción. En la transcripción, factores de elongación asociados con la RNA polimerasa que le permiten transcribir largas cadenas de DNA sin disociarse de él. En la traducción, factores unidos al ribosoma que, hibridándose con GTP, dirigen la adición de aminoácidos a la cadena polipeptídica en crecimiento.

factor de iniciación (IF y eIF)
initiation factor (IF and eIF)
Proteína que estimula la asociación adecuada de ribosomas con mRNA, necesaria para que se inicie la síntesis de proteínas. De forma abreviada, en procariotas se denomina IF y en eucariotas eIF. Los eIF colaboran en la carga del Met-tRNAi sobre el ribosoma e inician de este modo la traducción. (Figura 6–72)

factor de iniciación eucariota (eIF)
eucariotic initiation factor (eIF)
Proteína que ayuda a cargar el tRNA iniciador sobre el ribosoma, comenzando así la traducción.

factor de liberación
release factor
Proteína que permite que una proteína acabada de sintetizar se libere del ribosoma, uniéndose en el lugar tRNA del ribosoma (cuya estructura mimetiza). (Figura 16–74)

factor de necrosis tumoral (TNFα)
tumor necrosis factor (TNFα)
Citoquina que es especialmente importante en la inducción de las respuestas inflamatorias. (Figura 15–79)

factor de supervivencia
survival factor
Señal extracelular que estimula la supervivencia de una célula inhibiendo la apoptosis. (Figura 18–14)

factor de transcripción
transcription factor
Término aplicado de forma laxa a cualquier proteína necesaria para iniciar o regular la transcripción en eucariotas. Incluye tanto a proteínas reguladoras de genes, factores generales de transcripción, coactivadores, correpresores, enzimas modificadoras de histonas y complejos remodeladores de la cromatina. (Figuras 6–19 y 7–44)

factor estimulador de colonias (CSF)
colony-stimulating factor (CSF)
Nombre genérico utilizado para designar las numerosas moléculas señal que controlan la diferenciación de las células sanguíneas.

factor general de transcripción
general transcription factor
Cualquiera de las proteínas cuyo ensamblaje sobre un promotor es necesario para la unión y la activación de la RNA polimerasa y la iniciación de la transcripción. (Tabla 6–3, p. 341)

factor intercambiador del nucleótido de guanina (GEF)
guanine nucleotide exchange factor (GEF)
Proteína que se une a una GTPasa y la activa estimulando la liberación del GDP que tiene fuertemente unido, permitiendo que en su lugar se una un GTP. (Figura 3–73)

FAD/FADH$_2$ (flavina adenina dinucleótido/flavín adenín dinucleótido reducido)
FAD/FADH$_2$ (flavin adenine dinucleotide/reduced flavin adenine dinucleotide)
Sistema transportador de electrones que participa en el ciclo del ácido cítrico. Una molécula de FAD gana dos electrones y dos protones y se transforma en el transportador activado FADH$_2$. (Figura 2–83)

fago – *véase* **bacteriófago**
phage

fagocito
phagocyte
Término general que se aplica a una célula fagocítica profesional, es decir, una célula como un macrófago o un neutrófilo especializada en captar partículas y microorganismos mediante fagocitosis. (Figura 13–46 y 13–47)

fagocitosis
phagocytosis
Proceso mediante el cual células no deseadas, desechos y otro material particulado es endocitado por una célula. Es destacable en algunas células carnívoras, como *Amoeba proteus*, y en los macrófagos y neutrófilos de vertebrados. Del griego *phagein*, comer. (Figura 24–53)

fagosoma
phagosome
Gran vesícula intracelular delimitada por una membrana, que resulta de la fagocitosis. Contiene material extracelular ingerido. (Figura 24–30)

FAK – *véase* **quinasa de adhesión focal**

familia Bcl2
Bcl2 family
Familia de proteínas intracelulares que estimulan o inhiben la apoptosis regulando la liberación de citocromo c o de otras proteínas mitocondriales desde el espacio intermembrana hasta el citosol.

familia de inhibidores de la apoptosis – *véase* **familia IAP**
inhibitor of apoptosis family

familia de receptores semejantes a Toll (TLR)
Toll-like receptor family (TLR)
En mamíferos, importante familia de receptores que reconocen un patrón molecular que son expresados en células del sistema inmunitario innato. Reconocen moléculas inmunoestimulantes asociadas a patógeno, como los lipopolisacáridos y los peptidoglucanos. (Figura 24–51)

familia IAP (inhibidores de apoptosis)
IAP (inhibitor of apoptosis) family
Proteínas intracelulares inhibidoras de la apoptosis.

Fas (proteína Fas, receptor de muerte Fas)
Fas (Fas protein, Fas death receptor)
Receptor transmembrana de muerte que inicia la apoptosis cuando se une a su ligando extracelular (ligando de Fas). (Figura 18–6)

fase G$_0$
G$_0$ phase
Estado de descanso del ciclo de división celular eucariota, que se produce debido a un estado de quiescencia en la fase G$_1$. Estado habitual, a veces permanente, de las células diferenciadas.

fase G$_1$
G$_1$ phase
Fase 1 (G: Gap) del ciclo de división celular eucariota, que va desde el final de la mitosis hasta el inicio de la síntesis de DNA. (Figura 17–4)

fase G$_2$
G$_2$ phase
Fase 2 (G: Gap) del ciclo de división celular eucariota, que va desde el final de la síntesis del DNA hasta el principio de la mitosis. (Figura 17–4)

fase M
M phase
Periodo del ciclo celular eucariota durante el cual los cromosomas se condensan y el núcleo y el citoplasma se dividen. (Figura 17–4 y Panel 17–1, pp. 1072-1073)

fase S
S phase
Periodo del ciclo celular de una célula eucariota en el que se sintetiza DNA. (Figura 17–14)

fecundación *in vitro* (IVF)
in vitro *fertilization (IVF)*
Tratamiento de infertilidad en el que los oocitos maduros son fecundados con espermatozoides fuera del cuerpo de la madre; los oocitos fecundados con éxito son cultivados durante algunos días y los embriones tempranos son transferidos al interior del útero de la madre.

fecundación
fertilization
Fusión de un gameto masculino con un gameto femenino (ambos haploides) formando un cigoto diploide que se desarrollará formando un nuevo individuo.

fenotipo
phenotype
Carácter observable (tanto apariencia física como comportamiento) de una célula o de un organismo. (Panel 8–1, pp. 554-555)

fermentación
fermentation
Vía metabólica anaeróbica productora de energía. Por ejemplo, en la glucólisis anaeróbica el piruvato se transforma en lactato o en etanol, con la conversión de NADH a NAD$^+$. (Figura 2–71)

fibra elástica
elastic fiber
Fibra extensible formada por la proteína elastina, presente en muchos tejidos conjuntivos animales, como la piel, los vasos sanguíneos y los pulmones, que les confiere su elasticidad y flexibilidad.

fibroblasto
fibroblast
Tipo celular común que se encuentra en el tejido conjuntivo. Secreta una matriz extracelular rica en colágena y en otras macromoléculas de matriz extracelular. Migra y prolifera fácilmente en tejidos dañados y en cultivos de tejido. Da lugar al fibrosito

fibronectina
fibronectin
Proteína de la matriz extracelular que está implicada en la adhesión de las células a la matriz y en la orientación de las células que migran durante la embriogénesis. Las integrinas de la superficie celular son receptores para la fibronectina.

fijación del nitrógeno
nitrogen fixation
Proceso bioquímico llevado a cabo por ciertas bacterias, que reduce el nitrógeno atmosférico (N$_2$) a amoníaco, posibilitando la posterior síntesis de diversos metabolitos que contienen nitrógeno.

fijador
fixative
Reactivo químico como el formaldehído, el glutaraldehído o el tetróxido de osmio, utilizado para preservar las células para su estudio microscópico. Se dice que las muestras tratadas con estos reactivos están "fijadas"; el proceso se denomina "fijación".

filamento de actina (microfilamento)
actin filament (microfilament)
Filamento proteico helicoidal formado por la polimerización de moléculas globulares de actina. Constituyente principal del citoesqueleto de todas las células eucariotas y del aparato contráctil del músculo esquelético. (Panel 16–1, p. 968)

filamento intermedio
intermediate filament
Filamento proteico fibroso (de unos 10 nm de diámetro) que forma redes en las células eucariotas. Uno de los tres tipos más importantes de filamentos del citoesqueleto. (Panel 16–1, pp. 968-969)

filogenia
phylogeny
Historia evolutiva de un organismo o de un grupo de organismos, a menudo presentada en forma de diagrama como un árbol filogenético. (Figuras 4–75 y 14–72)

filopodio (microespina)
filopodium (plural ***filopodia***) ***(microspike)***
Protuberancia delgada y puntiaguda, con un núcleo de actina, que se genera en el frente de avance de una célula animal en desplazamiento. (Figura 16–47)

filtro de selectividad
selectivity filter
Parte de la estructura de un canal iónico que determina qué iones puede transportar el canal. (Figuras 11–23 y 11–24)

FISH – *véase* **hibridación fluorescente *in situ***

flagelo
flagellum (plural ***flagella***)
Protuberancia larga, semejante a un látigo, cuyas ondulaciones empujan la célula a través de un medio fluido. Los flagelos de las células eucariotas son versiones largas de los cilios. Los flagelos bacterianos son más pequeños y completamente diferentes en su constitución y en su mecanismo de acción. *Compárese* con cilio.

flavina adenina dinucleótido – *véase* **FAD/FADH$_2$**
flavin adenine dinucleotide

flujo de microtúbulos
microtubule flux
Desplazamiento de moléculas individuales de tubulina en los microtúbulos del huso hacia los polos por pérdida de moléculas de tubulina en sus extremos menos. Colabora en la generación de los desplazamientos hacia los polos de las cromátidas hermanas después de su separación en la anafase. (Figura 17–41)

fluorescencia
fluorescence
Emisión de luz que presentan algunas sustancias (fluorocromos) cuando sus electrones, que han sido excitados por la absorción de luz, retornan a sus niveles de energía normales. Las radiaciones emitidas siempre tienen menor energía (mayor longitud de onda) que la radiación absorbida.

fosfatasa
phosphatase
Enzima que cataliza la eliminación hidrolítica de grupos fosfato de una molécula.

fosfatidilcolina (lecitina)
phosphatidylcholine (lecithin)
Fosfolípido común presente en abundancia en la mayoría de las membranas biológicas. (Figura 10–3)

fosfatidilinositol
phosphatidylinositol
Un fosfolípido de inositol. (Figura 15–37)

fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PI(4,5)P$_2$, PIP$_2$)
phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P$_2$, PIP$_2$)
Fosfolípido de inositol de membrana (un fosfoinosítido) que es fragmentado por la fosfolipasa C en IP$_3$ y diacilglicerol al principio de la vía de señalización de fosfolípidos de inositol. También puede ser fosforilado por la PI 3-quinasa produciendo lugares de anclaje de PIP$_3$ para proteínas de señalización en la vía de señalización de la PI 3-quinasa/Akt. (Figuras 15–38 y 15–64)

fosfoglicérido
phosphoglyceride
Fosfolípido derivado del glicerol, abundante en las biomembranas. (Figuras 10–2 y 10–3)

fosfoinosítido – *véase* **fosfolípido de inositol**
phosphoinositide

fosfoinosítido 3-quinasa (PI 3-quinasa)
phosphoinositide 3-kinase (PI 3-kinase)
Enzima unida a membrana que es un componente de la vía de señalización intracelular PI 3-quinasa/Akt. Fosforila el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato en la posición 3 del anillo de inositol, produciendo lugares de unión al PIP$_3$ en la membrana para otras proteínas señal intracelulares. (Figura 15–64)

fosfolipasa C (PLC)
phospholipase C (PLC)
Enzima unida a membrana que rompe fosfolípidos de inositol produciendo IP$_3$ y diacilglicerol en la vía de señalización de los fosfolípidos de inositol. La PLCβ es activada por GPCR, vía proteínas G específicas, mientras que la PLCβ es activada por RTK. (Figuras 25–39 y 15–55)

fosfolípido
phospholipid
Categoría principal de moléculas lipídicas utilizadas para construir biomembranas. Por lo general están compuestos por dos ácidos grasos unidos a través de un glicerol (o esfingosina) fosfato a uno de entre varios grupos polares. (Figura 10–3 y Panel 2–5, pp. 114-115)

fosfolípido de inositol (fosfoinosítido)
inositol phospholipid (phosphoinositide)
Lípido que contiene un derivado fosforilado del inositol. Componente minoritario de la membrana plasmática pero importante en el marcaje de diferentes membranas y en la transducción intracelular de señales en las células eucariotas. (Figura 15–37)

fosforilación
phosphorylation
Reacción mediante la cual un grupo fosfato queda unido covalentemente a otra molécula.

fosforilación oxidativa
oxidative phosphorylation
Proceso que tiene lugar en bacterias y mitocondrias en el que la formación de ATP está impulsada por la transferencia de electrones a través de la cadena de transporte de electrones hasta el oxígeno molecular. Supone la generación intermedia de un gradiente de protones (gradiente de pH) a través de una membrana y el posterior acoplamiento quimiosmótico de este gradiente con la ATP sintetasa. (Figuras 14–10 y 14–14)

fotoactivación
photoactivation
Técnica para estudiar procesos intracelulares mediante la cual una forma inactiva de una molécula de interés se introduce en una célula y a continuación es activada por un haz de luz enfocado en una mancha precisa en la célula. (Figura 9–30)

fotofosforilación no cíclica
noncyclic photophosphorylation
Proceso fotosintético de plantas y cianobacterias que produce ATP y NADPH. (Figura 14–49)

fotorreceptor
photoreceptor
Célula o molécula sensible a la luz.

fotorreceptor en forma de bastón (bastón)
rod photoreceptor (rod)
Célula fotorreceptora de la retina característica de los vertebrados que es responsable de la visión en blanco y negro en presencia de luz tenue. (Figura 23–17)

fotorrespiración
photorespiration
Proceso metabólico poco eficiente que tiene lugar en los vegetales en condiciones de bajos niveles de CO_2 en el que se utiliza O_2 y se libera CO_2 sin producir carbohidratos para almacenamiento.

fotosíntesis
photosynthesis
Proceso mediante el cual las plantas, las algas y algunas bacterias utilizan la energía solar para impulsar la síntesis de moléculas orgánicas a partir de dióxido de carbono y agua. (Figuras 2–40 y 14–38)

fotosistema
photosystem
Complejo multiproteico que participa en el proceso de fotosíntesis. Capta la energía solar y la convierte en formas de energía útiles para el organismo. (Figura 14–43)

fragmento de restricción
restriction fragment
Fragmento de DNA generado por la acción de una o varias enzimas de restricción.

fragmentos de Okazaki
Okazaki fragments
Cortas secuencias de DNA producidas sobre la cadena retrasada durante la replicación del DNA. Estas secuencias son rápidamente unidas por una DNA ligasa formando una hebra continua de DNA. (Figura 5–7)

fragmoplasto
phragmoplast
Estructura constituida por microtúbulos y filamentos de actina que se forma en el futuro plano de división de una célula vegetal y que guía la formación de la placa celular. (Figura 17–57)

FRAP – *véase* **recuperación fluorescente tras fotoblanqueado**

FRET – *véase* **fluorescencia por transferencia de energía de fluorescencia por resonancia**

fuerza hidrofóbica
hydrophobic force
Fuerza ejercida por una red de moléculas de agua unidas entre sí mediante enlaces de hidrógeno que une dos superficies no polares excluyendo el agua que hay entre ellas. (Panel 2–3, pp. 110-111)

fuerza protón-motriz
proton-motive force
Fuerza ejercida por un gradiente electroquímico de protones que desplaza protones a través de una membrana. (Figura 14–13)

G – *véase* **energía libre**

ΔG – *véase* **variación de energía libre**

ΔG° – *véase* **variación de energía libre estándar**

G_i – *véase* **proteína G inhibidora**

G_q
G_q
Tipo de proteína G que acopla GPCR a la fosfolipasa C-β e inicia la vía de señalización de los fosfolípidos de inositol.

G_s – *véase* **proteína G estimuladora**

G_1-Cdk
G_1-Cdk
Complejo ciclina-Cdk que se forma en las células de vertebrado por una ciclina G_1/S y por la correspondiente quinasa dependiente de ciclina (Cdk). (Tabla 17–1, p. 1063)

G_1/S-Cdk
G_1/S-Cdk
Complejo ciclina-Cdk formado en las células de los vertebrados por una ciclina G_1/S y la correspondiente quinasa dependiente de ciclina (Cdk: ***cyclin-dependent kinase***). (Figura 17–16 y Tabla 17–1, p. 1063)

GAG – *véase* **glucosaminoglucano**

gameto
gamete
Célula haploide especializada en la reproducción sexual (un espermatozoide o un oocito) formada por meiosis a partir de una célula primordial. *Véase también* célula germinal.

ganglio
ganglion (plural ***ganglia***)
Agrupación que está formada principalmente por cuerpos (somas) de células nerviosas con células gliales asociadas, localizadas fuera del sistema nervioso central.

gangliósido
ganglioside
Cualquier glucolípido que tenga uno o más residuos de ácido siálico en su estructura. Se encuentra en la membrana plasmática de las células eucariotas y es especialmente abundante en las fibras nerviosas. (Figura 10–18)

GAP – *véase* **proteína activadora de GTPasa**

gastrulación
gastrulation
Etapa de la embriogénesis animal durante la cual el embrión pasa de ser una esfera de células a ser una estructura con una cavidad interna (gástrula). (Figura 22–3)

GEF – *véase* **factor intercambiador del nucleótido de guanina**

geminina
geminin
Proteína que previene la formación de nuevos complejos prerreplicativos durante la fase S y la mitosis, asegurando así que los cromosomas se hayan replicado una sola vez en cada ciclo celular.

gen
gene
Región del DNA que es transcrita como una unidad y que transporta la información de una característica hereditaria discreta, que habitualmente corresponde a (1) una sola proteína (o a un conjunto de proteínas relacionadas entre sí generadas por varios procesos postranscripcionales) o (2) un solo RNA (o un conjunto de RNA estrechamente relacionados entre sí)

gen *Cdc* (gen del ciclo de división celular)
Cdc *gene (cell-division-cycle gene)*
Gen cuyo producto (una proteína Cdc) controla una etapa específica o un conjunto de etapas del ciclo celular de los eucariotas. Inicialmente se identificó en levaduras.

gen constitutivo
housekeeping gene
Gen que proporciona una función necesaria en todos los tipos celulares de un organismo, independientemente de cuál sea su papel especializado.

gen de efecto materno
maternal-effect gene
Gen que actúa en la madre especificando en el oocito mRNA y proteínas maternos. Las mutaciones de efecto materno afectan el desarrollo del embrión incluso aunque el embrión no haya heredado el gen mutante.

gen de polaridad de segmento
segment-polarity gene
En el desarrollo de *Drosophila*, un gen que participa en la especificación de la organización anteroposterior de cada segmento corporal. (Figuras 22–37 y 22–41)

gen de regla par
pair-rule gene
En el desarrollo de *Drosophila*, gen que se expresa en series de bandas transversales a lo largo del cuerpo del embrión y que colaboran en la determinación de sus diferentes segmentos (Figura 22–37)

gen de virulencia
virulence gene
Gen que contribuye a la capacidad de un organismo a provocar enfermedades.

gen del ciclo de división celular – *véase* **gen Cdc**
cell-division-cycle gene

gen estructural
structural gene
Región de DNA que codifica una proteína o una molécula de RNA que forma parte de una estructura o que tiene una función enzimática. En contraposición a las regiones del DNA que regulan la expresión de genes.

gen gap
gap gene
En el desarrollo de *Drosophila*, un gen que se expresa en regiones específicas a lo largo del eje antero–posterior del embrión temprano y que ayuda a designar las divisiones principales del cuerpo del insecto. (Figura 22–37)

gen marcador (reportero o informador)
reporter gene
Construcción genética, generalmente artificial, en la que una copia del DNA regulador de un gen de interés se asocia a una secuencia que codifica un producto fácil de detectar. La presencia o ausencia de este producto (la "proteína marcadora" o "reportera") en una célula que contiene la construcción indica si el gen de interés es activo o inactivo. (Figura 8–70)

gen marcador seleccionable
selectable marker gene
Gen incluido en un constructo de DNA para poder detectar la presencia de este constructo en una célula, haciendo posible seleccionar las células que tienen este constructo.

gen proneural
proneural gene
Gen cuya expresión define células con el potencial de desarrollarse como tejido neural.

gen rRNA
rRNA gene
Gen que codifica un RNA ribosómico (rRNA).

gen selector homeótico
homeotic selector gene
En el desarrollo de *Drosophila*, un gen que define y preserva las diferencias entre segmentos corporales.

gen supresor de tumores
tumor supressor gene
Gen que aparentemente colabora evitando la formación de un cáncer. Cuando una mutación de pérdida de función afecta a este tipo de genes, la predisposición a sufrir un cáncer aumenta. (Figura 20–27)

genética
genetics
Estudio de los genes de un organismo sobre la base de la herencia y la variabilidad.

genética inversa (o reversa)
reverse genetics
Aproximación al descubrimiento de la función de un gen, que se inicia a partir del DNA (gen) y de su producto proteico y en la que posteriormente se generan mutantes para analizar la función del gen.

genoma
genome
La totalidad de la información genética perteneciente a una célula o un organismo; concretamente, el DNA que contiene esta información.

genómica
genomics
Estudio de las secuencias de DNA y las propiedades de los genomas.

genotipo
genotype
Constitución genética de una célula individual o de un organismo. Combinación particular de alelos encontrada en un individuo determinado. (Panel 8–1, pp. 554-555)

GFP – *véase* **proteína fluorescente verde**

giga
giga-
Prefijo que denota mil millones (10^9).

glicerol
glycerol
Pequeña molécula orgánica pariente de muchas otras moléculas pequeñas de la célula, como los fosfolípidos. (Panel 2–5, pp. 114-115)

glucagón
glucagon
Hormona producida por el páncreas que estimula a las células del hígado a transformar en glucosa el glucógeno acumulado y que produce un incremento de los niveles de azúcar en sangre. Este efecto es opuesto al de la insulina.

glucógeno
glycogen
Polisacárido compuesto exclusivamente por unidades de glucosa. Se utiliza para almacenar energía en las células animales. Forma grandes gránulos que son sobre todo abundantes en las células del hígado y también del músculo. (Figura 2–75 y Panel 2–4, pp. 112-113)

glucolípido
glycolipid
Molécula lipídica que tiene unido un residuo de azúcar o un oligosacárido. (Panel 2–5, pp. 114-115)

glucólisis
glycolysis
Vía metabólica ubicua que se produce en el citosol, mediante la cual los azúcares son degradados de forma incompleta y se produce ATP. Literalmente, "rotura de los azúcares". (Figura 2–70 y Panel 2–8, pp. 120-121)

glucoproteína
glycoprotein
Cualquier proteína con una o más cadenas de oligosacárido unidas de forma covalente a las cadenas laterales de los aminoácidos. Lo son la mayoría de las proteínas secretadas y de las proteínas expuestas en la superficie externa de la membrana plasmática.

glucosa
glucose
Azúcar de seis carbonos que tiene un papel principal en el metabolismo de las células vivas. Se almacena como polímero en forma de glucógeno en las células animales y en forma de almidón en las células vegetales. (Panel 2–4, pp. 112-113)

glucosaminoglucano (GAG)
glycosaminoglycan (GAG)
Polisacárido largo, lineal y muy cargado eléctricamente, compuesto por pares de azúcares repetidos, uno de los cuales siempre es un amino azúcar. En proteoglucanos de la matriz extracelular se encuentra sobre todo unido de forma covalente a un núcleo proteico. Como ejemplos, el condroitín sulfato, el ácido hialurónico y la heparina. (Figura 19–55)

glucosilación
glycosilation
Adición de uno o más azúcares a una molécula proteica o lipídica.

GMP cíclico (cGMP)
cyclic GMP (cGMP)
Nucleótido que es generado a partir del GTP por la guanilato ciclasa en respuesta a varias señales extracelulares.

gradiente electroquímico
electrochemical gradient
Influencia combinada de la diferencia de concentración de un ion a un lado y a otro de la membrana y de la diferencia de carga eléctrica a través de esta membrana (potencial de membrana). Los iones o las moléculas cargadas eléctricamente sólo pueden desplazarse de forma pasiva a través de la membrana, a favor de su gradiente electroquímico.

grana (singular **granum**)
grana (singular ***granum***)
Discos membranosos apilados (tilacoides) presentes en los cloroplastos que contienen clorofila y que son los lugares en los que se producen las reacciones de la fotosíntesis que atrapan energía luminosa. (Figuras 14–35 y 14–36)

gránulo cortical
cortical granule
Vesícula de secreción especializada que se localiza debajo de la membrana plasmática de los oocitos no fecundados, incluidos los de mamífero. El contenido de los gránulos corticales se libera por exocitosis tras la fecundación y altera la cubierta del oocito de forma que se impide la entrada de más espermatozoides.

granulocito
granulocyte
Categoría de células sanguíneas de la serie blanca que se caracterizan por presentar gránulos citoplasmáticos aparentes. Incluyen los neutrófilos, los basófilos y los eosinófilos (acidófilos). Se generan a partir de una célula progenitora granulocito/macrófago (GM) (Figura 23–37)

grasa
fat
Almacenamiento energético lipídico de las células. Está compuesta de triacilgliceroles, es decir, ácidos grasos esterificados con glicerol.

grupo acilo (–CO–R)
acyl group (–CO–R)
Grupo funcional derivado de un ácido carboxílico ($R - C \lessgtr^{O}_{OH}$).

grupo alquilo (C_nH_{2n+1})
alkyl group (C_nH_{2n+1})
Término general para designar un grupo de átomos de carbono e hidrógeno, unidos covalentemente entre sí, como el grupo metilo ($-CH_3$) o el grupo etilo ($-CH_2-CH_3$). Por lo general forman parte de moléculas orgánicas más grandes. Forman radicales libres extremadamente reactivos.

grupo amino ($-NH_2$)
amino group ($-NH_2$)
Grupo funcional ligeramente básico derivado del amoníaco (NH_3) en el que uno o más átomos de hidrógeno se hallan reemplazados por otro átomo. En solución acuosa puede aceptar un protón, presentando entonces una carga positiva ($-NH_3^+$)

grupo carbonilo (C=O)
carbonyl group (C=O)
Átomo de carbono unido a un átomo de oxígeno mediante un doble enlace (C=O). (Panel 2–1, p. 107)

grupo carboxilo (–COOH)
carboxyl group (–COOH)
Átomo de carbono unido a un átomo de oxígeno mediante un doble enlace y a un grupo hidroxilo. Las moléculas que contienen un grupo carboxilo son ácidos débiles: los ácidos carboxílicos. (Panel 2–1, p. 107)

grupo metilo ($-CH_3$)
methyl group ($-CH_3$)
Grupo químico hidrofóbico derivado del metano (CH_4).

GTP (guanosina 5´-trifosfato)
GTP (guanosine 5´-triphosphate)
Nucleósido trifosfato producido mediante la fosforilación de GDP (guanosina difosfato). Como el ATP, cuando se hidroliza su grupo fosfato terminal libera una gran cantidad de energía libre. Desempeña un papel importante en el ensamblaje de los microtúbulos, en la síntesis de proteínas y en la señalización celular. (Figura 2–83)

GTPasa
GTPase
Enzima que transforma el GTP en GDP. Corresponden a dos grandes familias. Las **proteínas G triméricas** grandes están compuestas por tres subunidades diferentes y generalmente acoplan GPCR a enzimas o a canales iónicos de la membrana plasmática. Las **proteínas monoméricas de unión a GTP** (también denominadas **GTPasa monoméricas**) están formadas por una sola subunidad y participan en la transmisión de señales en muchos procesos de señalización intracelular, regulando el tráfico intracelular de vesículas dirigiéndolo hacia el citoesqueleto. Tanto las proteínas G triméricas como las GTPasa monoméricas alternan entre una forma activa unida a GTP y otra forma inactiva unida a GDP y, con frecuencia, actúan como interruptores moleculares en las vías de señalización intracelular. (Figura 15–19)

GTPasa monomérica – *véase* **GTPasa**
monomeric GTPase

guanosina trifosfato – *véase* **GTP**
guanosine triphosphate

H^- – *véase* **ion hidruro**

H^+ – *véase* **protón**

haploide
haploid
Que tiene una sola copia del genoma (un juego de cromosomas), como un espermatozoide, un oocito no fecundado o una bacteria. *Compárese* con diploide.

haplotipo
haplotype
Genotipo haploide

helicasa – *véase* **DNA helicasa**
helicase

hélice alfa (hélice α)
alpha helix (α helix)
Patrón estructural común de proteínas en el que una secuencia lineal de aminoácidos se pliega formando una hélice dextrógira estabilizada por enlaces de hidrógeno entre átomos del esqueleto de la propia cadena. (Figura 3–7)

hélice-bucle-hélice (HLH)
helix-loop-helix (HLH)
Motivo estructural de unión al DNA que está presente en muchas proteínas reguladoras de genes, que consiste en una pequeña hélice alfa conectada mediante un bucle flexible a otra hélice alfa, más larga. Esta estructura permite que dos proteínas que contengan HLH, dimericen formando un complejo que se une al DNA. No debe confundirse con el motivo hélice-giro-hélice. (Figura 7–23)

hélice-giro-hélice
helix-turn-helix
Motivo estructural de unión a DNA presente en muchas proteínas reguladoras de genes, que consiste en dos hélices alfa unidas entre sí a un ángulo fijo y conectadas por una corta cadena de aminoácidos, que constituyen el giro. Las proteínas que contienen este motivo frecuentemente forman dímeros simétricos y se unen a secuencias de DNA que son similares a sí mismas y que están dispuestas de forma simétrica. Hay que diferenciarlo del motivo hélice-bucle-hélice. (Figuras 7–10, 7–11 y 7–12)

hematopoyesis
hemopoiesis (hematopoiesis)
Generación de las células de la sangre, principalmente en la médula ósea roja. (Figura 23–42)

hemidesmosoma
hemidesmosome
Unión de anclaje celular especializada que se forma entre una célula epitelial y la lámina basal subyacente.

hemo
heme
Molécula orgánica cíclica que contiene un átomo de hierro, que en el caso de la hemoglobina transporta oxígeno y en el de los citocromos transporta un electrón. (Figura 14–22)

hepatocito
hepatocyte
Principal tipo celular del hígado.

herencia epigenética
epigenetic inheritance
Herencia de cambios fenotípicos en una célula o en un organismo que no resultan de cambios en la secuencia de nucleótidos del DNA. Pueden deberse a circuitos de retroalimentación positiva de proteínas reguladoras de genes o a la herencia de modificaciones de la cromatina, como metilaciones del DNA o modificaciones de las histonas, que provocan la formación de heterocromatina. (Figuras 4–35 y 7–86)

heterocarionte
heterocaryon
Célula con dos o más núcleos genéticamente distintos; producida por la fusión de dos o más células diferentes.

heterocigoto
heterozygote
Célula o individuo diploide que tiene dos alelos diferentes de uno o más genes determinados.

heterocromatina
heterochromatin
Región de un cromosoma que durante la interfase permanece con la cromatina extraordinariamente condensada e inactiva en términos transcripcional. *Compárese* con eucromatina.

heterodímero
heterodimer
Complejo proteico formado por dos cadenas polipeptídicas diferentes.

hialuronano (ácido hialurónico)
hyaluran (hyaluronic acid)
Tipo de glucosaminoglucano no sulfatado con una secuencia repetitiva regularmente de más de 25.000 unidades de disacárido idénticas, que no se halla unida a ningúna proteína. Se encuentran en los fluidos que lubrican las articulaciones y en muchos otros tejidos (Figuras 19–56 y 19–57)

hibridación
hybridization
En biología molecular, proceso mediante el cual dos cadenas complementarias de ácido nucleico forman una molécula dúplex DNA-DNA, DNA-RNA o RNA-RNA. Constituye la base de una poderosa técnica para detectar secuencias de nucleótidos determinadas. (Figuras 5–54 y 8–36)

hibridación de ácidos nucleicos –*véase* **hibridación**
nucleic acid hybridization

hibridación fluorescente *in situ* (FISH)
fluorescence* in situ *hybridation (FISH)
Técnica mediante la cual sondas de ácidos nucleicos marcados con fluorescencia se hibridan *in situ* con secuencias DNA o RNA de forma específica.

hibridación *in situ*
In situ *hybridization*
Técnica en la que se utiliza una sonda de DNA o RNA de cadena sencilla para localizar, mediante hibridación, un gen o una molécula de mRNA en una célula o en un tejido.

hibridación sobre transferencia de gel –*véase* **transferencia (análisis inmunológico)**
gel-transfer hybridation

hibridoma
hybridoma
Línea celular utilizada en la producción de anticuerpos monoclonales. Obtenida mediante la fusión de linfocitos B productores de anticuerpos con células de una línea tumoral de linfocitos. (Figura 8–8)

hidrocarburo
hydrocarbon
Compuesto formado únicamente por átomos de carbono y de hidrógeno. (Panel 2–1, pp. 106-107)

hidrofílico
hydrophilic
Que es fácil de disolver en agua. Literalmente "que le gusta el agua."

hidrofóbico (lipofílico)
hydrophobic (lipophilic)
Que no se disuelve fácilmente en agua. Literalmente "que detesta el agua."

hidrolasa
hydrolase
Término general para enzimas que catalizan una reacción de hidrólisis. Incluye las nucleasas y las proteasas.

hidrólisis (adjetivo **hidrolítico**)
hydrolysis (hydrolytic)
Rotura de un enlace covalente acompañada de una adición de agua. Fórmula general: $AB + H_2O \longrightarrow AOH + BH$.

hidroxilo (–OH)
hydroxyl (–OH)
Grupo químico formado por un átomo de hidrógeno unido a uno de oxígeno, como en un alcohol. (Panel 2–1, pp. 106-107)

hipermutación somática
somatic hypermutation
Acumulación de mutaciones puntuales en las secuencias que codifican las regiones variables de los genes de las inmunoglobulinas, que tienen lugar en las células B y son activadas constituyendo la memoria celular. El resultado de ello es la producción de anticuerpos con lugares de unión a antígeno alterados.

hipertónico
hypertonic
Que tiene una concentración de solutos lo bastante elevada como para hacer que salga agua de una célula debido a ósmosis.

hipotónico
hypotonic
Que tiene una concentración de solutos lo bastante baja como para hacer que entre agua en una célula debido a ósmosis.

histona
histone
Miembro de un grupo de proteínas pequeñas y abundantes, ricas en arginina y lisina. En los nucleosomas de los cromosomas eucariotas, las histonas se distribuyen alrededor del DNA. (Figura 4–25)

histona H
histone H
Proteína histona de unión (no de nucleación) que se une a DNA en el punto en el que sale de un nucleosoma y que ayuda a empaquetar los nucleosomas en la fibra de cromatina de 30 nm (Figura 4–34)

HIV
HIV
Virus de la inmunodeficiencia humana; es el retrovirus causante del sida (síndrome de inmunodeficiencia adquirida). (Figuras 13–19 y 24–16)

HLH – *véase* **hélice-bucle-hélice**

homeodominio
homeodomain
Dominio de unión a DNA que define una clase de proteínas reguladoras de genes importantes en el desarrollo animal. (Figuras 3–13 y 7–13)

homocigoto
homozygote
Célula u organismo diploide que tiene dos alelos idénticos de un determinado gen o grupo de genes.

homólogo
homolog
Uno de dos a más genes cuyas secuencias son similares debido a que derivan de un mismo gen ancestral. El término se refiere tanto a ortólogos como a parálogos. (Figura 1–25) *Véase* cromosomas homólogos.

homólogos
homologous
Genes, proteínas o estructuras corporales que son similares entre sí debido a que tienen un origen evolutivo común.

hongo
fungus (plural ***fungi***)
Reino de organismos eucariotas que incluye a las levaduras, los mohos y las setas. Muchas enfermedades de plantas y un número relativamente pequeño de enfermedades animales están ocasionadas por hongos.

hormona
hormone
Molécula señal secretada por una célula endocrina al flujo sanguíneo, desde donde puede ser transportada a células diana alejadas.

horquilla de replicación
replication fork
Región en forma de Y de una molécula de DNA en replicación, en la que las dos cadenas de DNA se separan y se sintetizan las dos moléculas hijas. (Figuras 5–7 y 5–19)

HPLC – *véase* **cromatografía líquida de alta resolución**

huella – *véase* **huella en el DNA**

huella en el DNA
DNA footprinting
Técnica para determinar a qué secuencia de DNA se une una proteína de unión al DNA. (Figura 7–29)

huso mitótico
mitotic spindle
Disposición de microtúbulos y moléculas asociadas que se forma entre los polos opuestos de una célula eucariota durante la mitosis y actúa desplazando los cromosomas duplicados, separándolos entre sí. (Figura 17–28 y Panel 17–1, pp. 1072-1073)

IF – *véase* **factor de iniciación**

Ig – *véase* **inmunoglobulina**

impronta genómica
genomic imprinting
Fenómeno mediante el cual un gen se expresa o no en el individuo en desarrollo, en función del progenitor del que procede. (Figura 7–82)

impulso nervioso – *véase* **potencial de acción**
nerve impulse

in vitro
Que tiene lugar en un extracto aislado y libre de células, en oposición a los fenómenos que ocurren en una célula viva. También utilizado para diferenciar estudios en cultivos celulares de estudios en organismos intactos. (Del latín "en vidrio".)

in vivo
En una célula o en un organismo intactos. (Del latín, "en vivo".)

inactivación del cromosoma X
X-inactivation
Inactivación de una de las copias del cromosoma X en las células somáticas de las hembras de mamífero.

inducción (interacción inductiva)
induction (inductive interaction)
En biología del desarrollo, cambio en el destino del desarrollo de un tejido debido a interacciones con otro tejido. Una interacción de este tipo se denomina interacción inductiva. (Figuras 22–10 y 22–16)

inestabilidad dinámica
dynamic instability
Propiedad de un filamento proteico, como un microtúbulo o un filamento de actina, de pasar repentinamente de crecimiento a acortamiento, y viceversa. (Panel 16–2, pp. 978-979)

inestabilidad genética
genetic instability
Tasa de mutación espontánea extraordinariamente incrementada, como ocurre en las células cancerosas.

información posicional
positional information
Información que se aporta o que poseen las células de acuerdo con su posición en un organismo pluricelular. El registro interno de una célula de su información posicional se denomina su valor posicional.

ingeniería genética (tecnología del DNA recombinante)
genetic enginnering (recombinant DNA technology)
Conjunto de técnicas mediante las cuales se pueden combinar segmentos de DNA procedentes de diferentes orígenes para generar un nuevo DNA, que es habitual denominar DNA recombinante. Los DNA recombinantes son ampliamente utilizados en la clonación de genes, en la modificación genética de organismos y en la biología molecular en general.

inicio (punto de control de inicio, punto de restricción)
start (start checkpoint, restriction point)
Importante punto de control al final de G_1 del ciclo celular eucariota. EL hecho de superar este punto de inicio supone que la célula entrará en la fase S. Originalmente este término sólo se utilizó para definir este punto en el ciclo celular de las levaduras; el punto equivalente en el ciclo celular de los mamíferos se denominó punto de restricción. En este libro utilizamos "inicio" para ambos casos. (Figura 17–14)

inmortalización
immortalization
Producción de una línea celular capaz de dividirse un número ilimitado de veces. Puede ser el resultado de una transformación química o vírica, o de una fusión de las células originales con células de una línea tumoral.

inmunoglobulina (Ig)
immunoglobulin (Ig)
Molécula de anticuerpo. Los vertebrados superiores tienen cinco clases de inmunoglobulinas –IgA, IgD, IgE, IgG e IgM– cada una de las cuales tiene funciones diferentes en la respuesta inmune adaptativa.

inmunoprecipitación
immunoprecipitation (IP)
Utilización de un anticuerpo específico para separar el correspondiente antígeno proteico de una solución. Esta técnica puede identificar complejos de proteínas que interactúan a partir de extractos celulares mediante el uso de un anticuerpo específico de una de las proteínas, para precipitar el complejo. *Véase también* inmunoprecipitación de la cromatina y coinmunoprecipitación.

inmunoprecipitación de la cromatina
chromatin immunoprecipitation (ChIP)
Técnica mediante la cual un fragmento de DNA cromosómico que se halla unido a una proteína particular puede ser aislado e identificado precipitándolo mediante un anticuerpo contra la proteína unida. (Figura 7–32)

inmunotransferencia – *véase* **transferencia (análisis inmunológico)**
immunoblotting

inositol
inositol
Molécula de azúcar en forma de anillo que forma parte de los fosfolípidos de inositol.

inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3)
inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3)
Pequeña molécula señal intracelular producida durante la activación de la vía de señalización de los fosfolípidos de inositol. Actúa liberando Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático. (Figuras 15–38 y 15–39)

insulina
insulin
Hormona polipeptídica segregada por las células α del páncreas que participa en la regulación del metabolismo de la glucosa en los animales. (Figura 3–35)

integrina
integrin
Proteína de adhesión transmembrana que participa en la adhesión de las células entre sí y a la matriz extracelular. (Figura 19–4 y Tabla 19–2, p. 1135)

intercambio por entrecruzamiento – *véase* **unión de Holliday**
cross-strand exchange

interfase
interphase
Largo periodo del ciclo celular comprendido entre una mitosis y la siguiente. Incluye las fases G_1, S y G_2. (Figura 7–14)

interferón (IFN)
interferon (IFN)
Miembro de una clase de citoquinas secretadas por células infectadas por virus y algunos tipos de células T activadas. Los interferones inducen respuestas antivíricas inhibiendo la replicación vírica y estimulando los macrófagos y los linfocitos T citotóxicos para matar a las células infectadas por virus. (Figura 25–60)

interleuquina (IL)
interleukin (IL)
Citoquina segregada que principalmente media interacciones locales entre células sanguíneas de la serie blanca (leucocitos), durante respuestas inflamatorias e inmunitarias. (Tabla 25–4, p. 1598)

intrón
intron
Región no codificadora de un gen eucariota que se transcribe a molécula de RNA pero que es eliminada durante la maduración del RNA, la producción del mRNA o de otra estructura funcional de RNA. (Figura 4–15)

inversión
inversion
Tipo de mutación en la que un segmento de un cromosoma está invertido. (Panel 8–1, pp. 554-555)

ion
ion
Átomo que ha ganado o perdido electrones, adquiriendo una carga eléctrica; por ejemplo Na^+ y Cl^-.

ion hidrógeno
hydrogen ion
Un protón (H^+) en solución acuosa. La base de la acidez. Dado que el protón realmente se combina con una molécula de agua formando H_3O^+, resulta más exacto denominarlo ion hidronio.

ion hidronio (H_3O^+)
hydronium ion (H_3O^+)
Molécula de agua asociada con un protón adicional. La fórmula general que adquieren los protones en solución acuosa.

ion hidruro (H^-)
hydride ion (H^-)
Un protón (H^+) más dos electrones ($2e^-$). Es equivalente a un átomo de hidrógeno con un electrón extra.

ionóforo
ionophore
Pequeña molécula hidrófoba que forma parte de la bicapa lipídica e incrementa su permeabilidad a determinados iones inorgánicos.

IP_3 – *véase* **inositol 1,4,5-trisfosfato**

IRES – *véase* **sitio interno de entrada de los ribosomas**

isla CG
CG island
Región de DNA con una densidad de secuencias CG superior a la media; por lo general estas regiones se mantienen no metiladas.

isoforma
isoform
Una variante de una proteína generada por maduración alternativa de un transcrito habitual o producto de genes diferentes homólogos.

isomerasa
isomerase
Enzima que cataliza la reordenación de enlaces en una molécula. *Véase también* topoisomerasa.

isómero
isomer
Molécula formada por los mismos átomos y uniones que otra pero que tiene una conformación tridimensional diferente. (Panel 2–4, pp. 114-115)

isoprenoide (poliisoprenoide)
isoprenoid (polyisoprenoid)
Molécula lipídica cuyo esqueleto carbonado está basado en varias unidades de isopreno, de cinco carbonos. Como ejemplos, el ácido retinoico y el dolicol. (Panel 2–5, pp. 114-115)

isótopo
isotope
Una de entre varias formas de un átomo, con diferente peso atómico pero con el mismo número de protones y electrones y, por lo tanto, con las mismas propiedades químicas. Puede ser estable o radiactivo.

julio
joule
Unidad estándar de energía del sistema métrico decimal. Un julio es la energía liberada en un segundo por una fuente de energía de un vatio de potencia. Aproximadamente equivale a 0,24 calorías.

K – *véase* **constante de equilibrio**

K_a – *véase* **constante de afinidad**

K_d – *véase* **constante de disociación**

K_M
Constante de Michaelis Menten. Es igual a la concentración de sustrato a la que la enzima trabaja a la mitad de su velocidad máxima. Valores elevados de K_M indican por lo general que la enzima se une a su sustrato con una afinidad relativamente baja. (Panel 3–3)

knockout
knockout
Deleción por manipulación o mutación inactivante de un gen.

lambda – *véase* **bacteriófago β *lambda***
lambda

lamelipodio
lamellipodium (plural ***lamellipodia***)
Evaginación aplanada, en forma de lámina, sostenida por una red de filamentos de actina, que se extiende en el frente de avance de una célula animal en desplazamiento. (Figuras 16–86 y 16–87)

lamina
nuclear lamin
Subunidad proteica de los filamentos intermedios que forma la lámina nuclear.

lámina basal
basal lamina (plural ***basal laminae***)
Fina capa de matriz extracelular que separa los epitelios y células como las fibras musculares o las células adiposas, del tejido conjuntivo. (Figura 19–40)

lámina beta (lámina β)
beta sheet (β sheet)
Motivo estructural común de proteínas en el que diferentes sectores de la cadena polipeptídica se hallan unos al lado de otros, unidos entre sí por enlaces de hidrógeno entre átomos del esqueleto polipeptídico. También se conoce como plegamiento en lámina β. (Figura 3–7)

lámina nuclear
nuclear lamina
Entramado fibroso de proteínas que se halla sobre la superficie interna de la membrana nuclear interna. Está constituida por una red de filamentos intermedios formados por laminas nucleares.

laminina
laminin
Proteína de la matriz extracelular que se encuentra en la lámina basal, donde forma una red en forma de lámina. (Figuras 19–42 y 19–43)

lecitina – *véase* **fosfatidilcolina**
lecithin

lectina
lectin
Proteína que se une fuertemente a un azúcar específico. Muchas lectinas de las semillas vegetales a menudo se utilizan como reactivos de afinidad para purificar diversas glucoproteínas o para detectarlas sobre la superficie de las células.

leptina
leptin
Hormona peptídica secretada por las célula adiposas. Colabora en la regulación del deseo de comer suprimiendo el apetito.

letalidad sintética
syntetic lethality
Interacción entre dos genes mutantes en la que la combinación de los dos genes mutados da lugar a la muerte celular, pero no cada una de las mutaciones por separado.

leucemia
leukemia
Cáncer de células sanguíneas de la serie blanca.

leucocito – *véase* **célula blanca de la sangre**
leucocyte

levadura
yeast
Término común utilizado para denominar diversas familias de hongos unicelulares. Incluye especies utilizadas para fermentar la cerveza y para hacer pan, así como especies patógenas. Unos de los eucariotas más sencillos.

levadura de fisión
fission yeast
Nombre común que a menudo se utiliza para designar a la levadura *Schizosaccharomyces pombe*. Se divide dando dos células de igual tamaño.

levadura de gemación
budding yeast
Nombre común dado a la levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae*, un organismo modelo experimental que se divide por gemación formando células más pequeñas.

ligando
ligand
Cualquier molécula que se une a un lugar específico de una proteína o de otra molécula. (Del latín *ligare*, ligar, unir.)

ligasa
ligase
Enzima que une (liga) entre sí dos moléculas a través de un proceso dependiente de energía. Por ejemplo, la DNA ligasa une entre sí los extremos de dos moléculas de DNA mediante un enlace fosfodiéster.

lignina
ligning
Red de compuestos fenólicos entrecruzados que forma una estructura de soporte a lo largo de las paredes celulares del xilema y del tejido leñoso de las plantas.

límite de resolución
limits of resolution
En microscopía, la menor distancia a la que dos objetos puntuales se pueden observar individualmente. En la microscopía de campo claro se sitúa en torno a los 0,2 mm, límite determinado por la longitud de onda de la luz.

línea celular
cell line
Población de células de origen animal o vegetal capaces de dividirse de forma indefinida en cultivo.

línea germinal
germ line
Linaje de células germinales que dará lugar a los gametos (haploides) y a sus células diploides precursoras específicas.

linfa
lymph
Fluido incoloro que contiene linfocitos y que se encuentra en los vasos linfáticos. (Figura 25–3)

linfocito
lymphocyte
Tipo de célula sanguínea de la serie blanca responsable de la especificidad de las respuestas inmunitarias adaptativas. Hay dos tipos principales: los linfocitos B, que producen anticuerpos, y los linfocitos T, que interactúan directamente con otras células efectoras del sistema inmunitario y con las células infectadas. Los linfocitos T se desarrollan en el timo y son los responsables de la inmunidad mediada por células. Los linfocitos B se desarrollan en la médula ósea de los mamíferos y son los responsables de la producción de los anticuerpos circulantes. (Figura 25–7)

linfocito B
B cell (B lymphocyte)
Tipo de linfocito que sintetiza anticuerpos.

linfocito T
T cell (T lymphocyte)
Tipo de linfocito responsable de las respuestas inmunitarias adaptativas mediadas por células T; la clase incluye las células T citotóxicas, las células T colaboradoras y las T reguladoras.

linfocito T citotóxico
cytotoxic T cell (killer T cell)
Tipo de célula T responsable de matar las células infectadas con un virus o con algún otro tipo de patógeno intracelular.

linfocito T colaborador
helper T cell
Tipo de linfocito T que colabora estimulando la producción de anticuerpos en los linfocitos B y activando la destrucción de los microorganismos ingeridos por los macrófagos. También colabora en la activación de las células dendríticas y de los linfocitos T citotóxicos.

linfoma
lymphoma
Cáncer de linfocitos, en el que las células cancerosas se encuentran principalmente en los órganos linfoides.

lipasa
lipase
Enzima que cataliza la separación de ácidos grasos de un triacilglicerol.

lípido
lipid
Molécula orgánica insoluble en agua, pero que tiende a disolverse en disolventes orgánicos no polares. Los fosfolípidos constituyen la base estructural de las membranas biológicas. (Panel 2–5, pp. 114-115)

lipófilo – *véase* **hidrófobo**
lipophilic

lipoproteína de baja densidad (LDL)
low-density lipoprotein (LDL)
Gran complejo formado por una sola molécula proteica y muchas moléculas de colesterol esterificado, además de otros lípidos. Es la forma en la que el colesterol es transportado por la sangre y captado por las células. (Figura 13–50)

liposoma
liposome
Vesícula formada por una bicapa artificial de fosfolípidos, generada a partir de una suspensión acuosa de moléculas de fosfolípido. (Figura 10–9)

lisis
lysis
Pérdida masiva de la continuidad de la membrana plasmática de una célula, que conduce a la liberación del citoplasma y a la muerte de la célula.

lisosoma
lysosome
Orgánulo de las células eucariotas, rodeado por una membrana, que contiene enzimas digestivas, las cuales normalmente son más activas al pH ácido al que se halla el lumen de los lisosomas. (Figuras 12–2 y 13–37)

lisozima
lysozyme
Enzima que cataliza la escisión de las cadenas de polisacárido de las paredes celulares de las bacterias.

locus
locus
En genética, la posición en un cromosoma. Por ejemplo, en una célula diploide, los diferentes alelos de un mismo gen ocupan el mismo locus.

locus del tipo de apareamiento (locus MAT)
mating-type locus (MAT locus)
En las levaduras de gemación, locus que determina el tipo de apareamiento (α o a) de una célula haploide de levadura. (Figura 7–65)

LTP – *véase* **potenciación a largo plazo**

lugar activo
active site
Región de la superficie de una enzima a la que se une una molécula de sustrato que sufre entonces la reacción catalizada por la enzima. (Figura 1–7)

lugar de unión
binding site
Región de la superficie de una molécula (por lo general una proteína o un ácido nucleico) que puede interaccionar con otra molécula a través de enlaces no-covalentes.

lumen del ER
ER lumen
Espacio interior de los sáculos del retículo endoplasmático (ER).

M – *véase* **fase M**

M6P – *véase* **manosa 6–fosfato**

macrófago
macrophage
Célula fagocítica derivada de los monocitos de la sangre, residente en la mayoría de tejidos pero que también está en circulación. En las respuestas inmunitarias tiene la función de presentar antígenos y de fagocitar restos de células y de matriz. (Figura 24–53)

maduración alternativa (o ayuste alternativo) del RNA
alternative RNA splicing
Producción de diferentes RNA a partir de un mismo gen mediante diferentes formas de maduración del mismo transcrito. (Figura 7–94)

maduración de la afinidad
affinity maturation
Aumento progresivo de la afinidad de los anticuerpos hacia el antígeno de inmunización, a medida que transcurre el tiempo tras la inmunización.

maduración del RNA por corte y empalme o ayuste del RNA
RNA splicing
Proceso en el que se eliminan los intrones de los transcritos de RNA en el núcleo, durante la formación de los RNA mensajeros o de otros tipos de RNA.

maligno
malignant
Describe tumores y células tumorales que son invasivos y/o capaces de producir metástasis. Un tumor maligno es un cáncer. (Figura 20–3)

manosa 6-fosfato (M6P)
mannose 6-phosphate (M6P)
Marcador específico unido a los oligosacáridos de algunas glucoproteínas destinadas a los lisosomas. (Figura 13–43)

MAP – *véase* **proteína asociada a microtúbulos**

MAP-quinasa (proteína quinasa activada por mitógeno)
MAP-kinase (mitogen-activated protein kinase)
Proteína quinasa situa al final de un módulo de señalización de tres componentes, que participa en la transmisión de señales desde la membrana plasmática hasta el núcleo.

mapa de restricción
restriction map
Representación en forma de diagrama de una molécula de DNA en la que se indican los lugares de rotura por varias enzimas de restricción.

mapa haplotípico
haplotype map (hapmap)
Mapa genómico humano basado en bloques haplotípicos. Ayudan a identificar y catalogar la variación genética humana.

masa celular interna
inner cell mass
Agrupación de células indiferenciadas de los embriones tempranos de los mamíferos a partir de la cual deriva el cuerpo adulto. (Figura 22–88)

matriz
matrix space
Espacio de medio circundante en el que se genera algo. (1) Gran compartimiento central delimitado de una mitocondria. (2) El compartimiento correspondiente de un cloroplasto, más conocido como estroma. (3) Matriz extracelular. Compuesto extracelular formado por proteínas y polisacáridos secretados, en el que están embebidas las células. (Figura 14–37)

matriz extracelular
extracellular matrix
Compleja red de polisacáridos (como glucosaminoglucanos o celulosa) y de proteínas (como colágena) secretada por las células y en la que las células quedan embebidas.

M-Cdk (Cdk de la fase M)
M-Cdk (M-phase Cdk)
Complejo Cdk-ciclina que en las células de los vertebrados está formado por una ciclina M y la proteína quinasa dependiente de ciclina (Cdk) correspondiente. (Figura 17–16 y Tabla 17–1, p. 1063)

mediador intracelular pequeño – *véase* **segundo mensajero**
small intracellular mediator

mediador local
local mediator
Molécula señal secretada, que actúa localmente sobre las células adyacentes. (Figura 15–4)

megacariocito
megakaryocyte
Célula mieloide grande con un núcleo multilobulado que permanece en la médula ósea roja después de madurar. Por gemación libera plaquetas mediante extensiones citoplasmáticas. (Figuras 23–40 y 23–42)

meiosis
meiosis
Tipo especial de división celular que ocurre en la reproducción sexual. Comprende dos divisiones nucleares sucesivas con una sola ronda de replicación del DNA, lo cual produce cuatro células hijas haploides a partir de una célula diploide inicial. (Figura 21–5)

melanocito
melanocyte
Célula que produce el pigmento negro melanina. Responsable de la pigmentación de la piel y del pelo. (Figura 23–1)

membrana
membrane
Bicapa lipídica y proteínas asociadas que delimita todas las células y, en las células eucariotas, también delimita muchos orgánulos y los compartimientos celulares. (Figura 10–1)

membrana plasmática
plasma membrane
Membrana que delimita una célula viva. (Figura 10–1)

memoria celular
cell memory
Retención por una célula y sus descendientes de patrones de expresión génica alterados permanentemente, sin ningún cambio de la secuencia de DNA. *Véase también* herencia epigenética.

memoria inmunológica
immunological memory
Propiedad de larga duración que sigue a una respuesta inmunitaria primaria a muchos antígenos, en el que un encuentro posterior con el mismo antígeno provocará una respuesta inmunitaria secundaria, más rápida y más potente. (Figura 25–10)

meristemo
meristem
Grupo organizado de células en división cuyos productos dan lugar a los tejidos y órganos de una planta en crecimiento. Por ejemplo los meristemos apicales de las puntas de la raíz y de las yemas. (Panel 22–2, pp. 1404–1405 y Figura 22-118)

meristemo apical
apical meristem
Punta de crecimiento de una rama o de una raíz de una planta, compuesta por células no diferenciadas que se dividen. (Panel 22–1, p. 1401)

mesénquima
mesenchyme
Forma inmadura, no especializada, de tejido conjuntivo de los animales, formado por células englobadas en una fina matriz extracelular.

mesodermo
mesoderm
Tejido embrionario (hoja blastodérmica) que es el precursor de los músculos, del tejido conjuntivo, del esqueleto y de muchos órganos internos. (Figuras 22–3 y 22–70)

metabolismo
metabolism
Suma total de los procesos químicos que tienen lugar en las células vivas. Todo el catabolismo más el anabolismo. (Figura 2–36)

metafase
metaphase
Estadio de la mitosis en el que los cromosomas se hallan fuertemente unidos al huso mitótico, situados en su ecuador, pero todavía no se han separado hacia los polos opuestos. (Panel 17–1, pp. 1072-1073)

metaloproteasa de la matriz
matrix metalloprotease
Enzima proteolítica dependiente de Ca^{2+} o de Zn^{2+} que está presente en la matriz extracelular y que degrada proteínas de la matriz. Incluye las colagenasas.

metástasis
metastasis
Difusión de las células cancerosas desde el lugar donde se han originado hasta otros lugares del organismo (Figuras 20–1 y 20–17)

metilación del DNA
DNA methylation
Adición de un grupo metilo al DNA. En vertebrados, una amplia metilación de nucleótidos citosina en secuencias CG mantiene los genes en estado inactivo.

método didesoxi
dideoxy method
Método enzimático estándar de secuenciación del DNA. (Figura 8–50)

micra (μm o micrómetro)
micron (μm or micrometer)
Unidad de medida que es igual a 10^{-6} metros o 10^{-3} milímetros.

micro RNA (miRNA)
micro RNA (miRNA)
RNA corto (21-26 nucleótidos) de los eucariotas, producido por el procesamiento de transcritos especializados de RNA codificados en el genoma, que regulan la expresión de genes mediante su complementariedad de bases con los mRNA. En función de la extensión de la complementariedad de bases, los miRNA pueden conducir a la destrucción de los mRNA o a bloquear su traducción. (Figura 7–112)

microchip de DNA
microarray
Gran conjunto de cortas moléculas de DNA (cada una de ellas de secuencia conocida) unidas a un portaobjetos de vidrio u otro soporte adecuado. Se utiliza para analizar la expresión simultánea de miles de genes en una célula: el mRNA aislado de las células control se transforma en cDNA que, a su vez, se hibrida en el microchip. (Figura 8–73)

microfilamento – *véase* **filamento de actina**
microfilament

microscopía electrónica de criofractura
freeze-fracture electron microscopy
Técnica para estudiar la estructura de las membranas, en la que la membrana de una célula congelada es fracturada a lo largo del interior de la bicapa, separándola en dos monocapas y exponiendo las caras interiores.

microscopio confocal
confocal microscope
Tipo de microscopio de fluorescencia que muestra una imagen nítida de un determinado plano de un objeto sólido. Utiliza un rayo láser como fuente precisa de iluminación y hace un rastreo de un lado al otro del plano para generar una "sección óptica" en dos dimensiones.

microscopio de campo claro
bright-field microscope
Microscopio óptico en el que la imagen se obtiene por transmisión simple de luz a través del objeto observado.

microscopio de contraste de fases
phase-contrast microscope
Tipo de microscopio óptico que aprovecha los efectos de interferencia que tienen lugar cuando la luz pasa a través de materiales que tienen índices de refracción distintos. Se utiliza para visualizar células vivas. (Figuras 9–7 y 22–101)

microscopio de contraste de fases interferencial
differential-interference-contrast microscope
Tipo de microscopio óptico que aprovecha los efectos de interferencia que se producen cuando la luz atraviesa partes de una célula de índices de refracción diferentes. Se utiliza para visualizar células vivas sin teñir.

microscopio de fluorescencia
fluorescence microscope
Microscopio que está diseñado para visualizar material teñido con colorantes fluorescentes. Tipo de microscopio óptico en el que la luz, antes de llegar a la muestra, pasa a través de un conjunto de filtros con el fin de seleccionar aquellas longitudes de onda que excitan el colorante, y antes de alcanzar el ojo, pasa a través de otro conjunto de filtros para seleccionar solamente aquellas longitudes de onda emitidas cuando el colorante emite fluorescencia.

microscopio electrónico
electron microscope
Tipo de microscopio que utiliza un haz de electrones para generar las imágenes.

microscopio electrónico de barrido
scanning electron microscope
Tipo de microscopio electrónico que genera una imagen de la superficie de un objeto.

microsoma
microsome
Pequeña vesícula derivada del retículo endoplasmático que se produce por fragmentación cuando se homogenizan las células. (Figura 12–37)

microtúbulo
microtubule
Estructura cilíndrica, alargada y hueca, compuesta por la proteína tubulina. Es uno de los tres principales tipos de filamentos que forman el citoesqueleto. (Panel 16–1, p. 968)

microtúbulo astral
astral microtubule
En el huso mitótico, cualquiera de los microtúbulos que irradian desde el áster que no esté unido al cinetocoro de ningún cromosoma.

microtúbulo cinetocórico
kinetochore microtubule
En un huso mitótico o meiótico, microtúbulo que conecta el polo del huso con el cinetocoro de un cromosoma.

microtúbulo interpolar
interpolar microtubule
En el huso mitótico o meiótico, un microtúbulo que se interdigita en el ecuador con los microtúbulos que emanan del otro polo. (Figura 16–85)

microvillus (plural **microvilli**)
mirovillus (plural ***microvilli***)
Finas proyecciones digitiformes que están recubiertas de membrana y que emergen de la superficie de una célula apical animal. Contienen un eje formado por un haz de filamentos de actina. Son particularmente abundantes en la superficie de absorción de las células epiteliales del intestino. (Figura 16–50)

mioblasto
myoblast
Célula mononucleada e indiferenciada precursora de una fibra muscular. Una célula del músculo esquelético está formada por la fusión de varios mioblastos. (Figura 23–48)

miofibrilla
myofibril
Haz largo y organizado de actina, miosina y otras proteínas, situado en el citoplasma de las fibras musculares y que se contrae mediante un mecanismo de deslizamiento de filamentos.

miosina
myosin
Cualquiera de las proteínas pertenecientes a una gran familia de proteínas motoras que se desplazan a lo largo de filamentos de actina. (Figura 16–57)

miRNA –*véase* **micro RNA**

mitocondria
mitochondrion (plural ***mitochondria***)
Orgánulo rodeado de una doble membrana, de tamaño aproximadamente igual al de una bacteria, que desarrolla la fosforilación oxidativa y produce la mayoría del ATP de las células eucariotas. (Figura 1–33)

mitógeno
mitogen
Molécula señal extracelular que estimula la proliferación celular.

mitosis
mitosis
División del núcleo de una célula eucariota, que conlleva la condensación del DNA en cromosomas visibles y la separación de los cromosomas duplicados formando dos juegos idénticos de cromosomas. Del griego *mitos*, hilo, filamento, que se refiere a la apariencia semejante a un filamento que tienen los cromosomas condensados. (Panel 17–1, pp. 1072-1073)

modificación postraduccional
post-translational modification
Cualquier cambio, catalizado por enzimas, que sufre una proteína tras ser sintetizada. Como ejemplos, la acetilación, la escisión, la glucosilación, la metilación, la fosforilación y la prenilación.

módulo MAP-quinasa (módulo proteína quinasa activada por mitógeno)
MAP-kinase module (mitogen-activated protein kinase module)
Módulo de señalización intracelular compuesto por tres proteínas quinasa que actúan en serie, de las que la MAP-quinasa es la tercera. Es característico que se active por una proteína Ras en respuesta a señales extracelulares. (Figura 17–78)

mol
mole
X gramos de una sustancia, siendo X su masa molecular relativa (peso molecular). Un mol son $6{,}02 \times 10^{23}$ moléculas de la sustancia.

molaridad (M)
molarity (M)
Número de moles de un soluto por litro de solución. Una solución "uno molar" (1M) contiene un mol de soluto disuelto en 1 litro de solución.

molécula de adhesión celular – *véase* **CAM**
cell adhesion molecule

molécula de adhesión de las células neuronales (NCAM)
neural cell adhesion molecule (NCAM)
Molécula de adhesión celular perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, expresada por muchos tipos celulares incluyendo la mayoría de las células nerviosas. En vertebrados, esta molécula media la unión célula-célula independiente de Ca^{2+}. (Figura 19–20)

molécula enjaulada
caged molecule
Molécula orgánica diseñada para cambiar a forma activa cuando es irradiada con luz de una determinada longitud de onda. Como ejemplo, el ATP enjaulado.

molécula señal
signal molecule
Molécula extracelular producida por una célula que señaliza a otras células del organismo a modificar su comportamiento celular. (Figura 15–1)

molécula señal extracelular
extracellular signal molecule
Cualquier señal química, secretada o de la superficie celular, que se une a un receptor y regula la actividad de la célula que expresa dicho receptor.

monocito
monocyte
Tipo de célula sanguínea de la serie blanca que abandona el flujo sanguíneo y, en los tejidos, madura transformándose en un macrófago. (Figura 23–37)

monómero
monomer
Pequeño componente molecular básico que puede funcionar como una subunidad cuando se une a otros del mismo tipo formando una gran molécula (un polímero).

monosacárido
monosaccharide
Azúcar sencillo de fórmula general $(CH_2O)_n$, siendo *n* entre 3 y 8. (Panel 2–4, pp. 112-113)

morfógeno
morphogen
Molécula señal que puede imponer un patrón en un campo de células, y provocar, en consecuencia, que células de diferentes puntos adopten destinos distintos. (Figura 22–13)

mosaico (mosaico genético)
mosaic (genetic mosaic)
En biología del desarrollo, organismo individual compuesto por una mezcla de células con genotipos diferentes pero que se desarrollan a partir de un mismo cigoto. Los mosaicos puede aparecer de forma natural, como resultado de una mutación en células que dan lugar a nuevos tejidos o pueden generarse de forma deliberada para colaborar en el análisis genético *Compárese* con quimera.

motivo
motif
Elemento estructural o patrón que se repite en muchos contextos. Concretamente, pequeño dominio estructural que se puede reconocer en una gran variedad de proteínas.

mRNA – *véase* **RNA mensajero**
mRNA

mRNA policistrónico
polycistronic mRNA
mRNA individual que codifica varias proteínas diferentes. Habitualmente se encuentran en bacterias pero no en eucariotas. (Figura 6–73)

MTOC – *véase* **centro organizador de microtúbulos**

mTOR (en mamíferos, diana de la ripamicina)
mTOR (mammalian target of ripamycin)
En mamíferos, proteína serina/treonina quinasa que es un componente del final de la vía de señalización PI3-quinasa/Akt. mTOR (la proteína homóloga de levaduras se denomina TOR) forma parte de dos complejos proteicos diferentes, uno de ellos es sensible al fármaco rifampicina y estimula el crecimiento celular, mientras que el otro colabora en la activación de la proteína quinasa Akt. (Figuras 15–64 y 15–65)

muerte celular programada
programmed cell death
Forma de muerte celular en la que una célula activa un programa intracelular de muerte.

multimérico
multimeric
Referente a proteínas: que tienen más de una subunidad.

músculo cardíaco o miocardio
cardiac muscle
Forma especializada de músculo estriado que se encuentra en el corazón; consiste en fibras musculares cardíacas individuales unidas entre sí mediante uniones celulares especializadas .

músculo estriado
striated muscle
Músculo formado por fibras musculares estriadas. Los ejemplos mejor conocidos de músculo estriado son los músculos esquelético y cardíaco de los vertebrados. (Figura 16–74)

mutación
mutation
Cambio heredable en la secuencia de nucleótidos que tiene un cromosoma. (Panel 8–1, pp. 554-555)

mutación con pérdida de función
loss of function mutation
Mutación que reduce o elimina la actividad de un gen. Por lo general son recesivas. (Panel 8–1, pp. 554-555)

mutación condicional
conditional mutation
Mutación que modifica una proteína o una molécula de RNA de modo que su función sólo se ve alterada en determinadas condiciones, como por ejemplo ante una temperatura excepcionalmente elevada o excepcionalmente baja. (Panel 8–1, pp. 554–555)

mutación de ganancia de función
gain-of-funtion mutation
Mutación que incrementa la actividad de un gen o lo transforma en activo en circunstancias no apropiadas. Habitualmente es dominante. (Panel 8-1, pp. 554-555)

mutación dominante negativa
dominant negative mutation
Una mutación dominante negativa es aquella que afecta de forma dominante el fenotipo, bloqueando la actividad génica y produciendo el fenotipo de "pérdida de función" incluso en presencia de la copia normal del gen. (Panel 8–1, pp. 554-555)

mutación homeótica
homeotic mutation
Mutación que hace que unas células localizadas en una región del cuerpo se comporten como si estuvieran situadas en otra región y generen una alteración grotesca del plan corporal. (Figuras 22–42 y 22–127)

mutación letal
lethal mutation
Mutación que provoca la muerte de la célula o el organismo que la contiene. (Panel 8–1, pp. 554-555)

mutación nula
null mutation
Mutación de pérdida de función, que elimina por completo la actividad de un gen. (Panel 8–1, pp. 554-555)

mutación puntual
point mutation
Cambio de un solo par de nucleótidos en el DNA de una parte muy pequeña de un gen. (Panel 8–1, pp. 554-555)

mutación supresora
suppressor mutation
Mutación que suprime el efecto fenotípico de otra mutación, de forma que el individuo doble mutante parece normal (Panel 8–1, pp. 554-555)

mutagénesis dirigida (de lugar)
site-directed mutagenesis
Técnica mediante la cual puede provocarse una mutación en un punto concreto del DNA. (Figura 8–63)

mutante sensible a la temperatura (ts)
temperature-sensitive (ts) mutant
Organismo o célula que contiene una mutación que muestra su efecto fenotípico a un determinado rango de temperaturas (por lo general elevadas) pero no a otro rango de temperaturas (habitualmente menores). (Panel 8–1, pp. 554–555 y Figura 8–55)

Myc
Proteína reguladora de genes que se activa si una célula es estimulada por señales extracelulares a crecer y dividirse. Activa la transcripción de muchos genes, incluyendo los que estimulan el crecimiento celular. (Figura 17–62)

N terminal (amino terminal)
N terminus (amino terminus)
Final de una cadena polipeptídica que se caracteriza por tener libre el grupo β amino. (Figura 3–1)

NAD⁺/NADH (nicotinamida adenina dinucleótido/ nicotinamida adenina dinucleótido reducido)
NAD⁺/NADH (nicotinamide adenine dinucleotide/reduced nicotinamide adenine dinucleotide)
Sistema transportador de electrones que participa en reacciones de oxidorreducción, como la oxidación de las moléculas de alimento. El NAD^+ acepta el equivalente a un ion hidruro (H^-, un protón y dos electrones) y se transforma en el transportador activado NADH. El NADH formado cede sus electrones de alta energía al proceso generador de ATP de la fosforilación oxidativa. (Figura 2–86)

NADP⁺/NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato/ nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido)
NADP⁺/NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate/reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
Sistema transportador de electrones estrechamente relacionado con el NAD^+/NADH, pero que se utiliza casi exclusivamente en procesos de biosíntesis y no en procesos catabólicos. (Figura 2–60)

nanómetro (nm)
nanometer (nm)
Unidad de longitud habitualmente utilizada para medir moléculas y orgánulos celulares. 1 nm = 10^{-3} micrómetros (μm) = 10^{-9} m.

neurita
neurite
Larga evaginación que crece de una célula nerviosa en cultivo. Término que no especifica si la evaginación es axón o dendrita. (Figura 16–105)

neuroblasto
neuroblast
Célula precursora nerviosa embrionaria. (Figura 22–66)

neurofilamento
neurofilament
Tipo de filamento intermedio que está presente en las células nerviosas. (Figura 16–22)

neurona (fibra nerviosa)
neuron (nerve cell)
Célula del sistema nervioso que conduce impulsos nerviosos, con largas prolongaciones especializada en recibir, conducir y transmitir señales. (Figuras 22–93 y 22–94)

neurona sensitiva olfativa
olfactory sensory neuron
La célula sensorial del epitelio nasal olfativo que detecta los olores.

neuropéptido
neuropeptide
Péptido secretado por las neuronas como molécula señal tanto en una sinapsis como en otro lugar.

neurotransmisor
neurotransmitter
Pequeña molécula señal secretada por la fibra nerviosa presináptica en una sinapsis química que transmite la señal a la fibra postsináptica. Como ejemplos pueden citarse la acetilcolina, el glutamato, el GABA, la glicina y muchos neuropéptidos.

neurotransmisor inhibidor
inhibitory neurotransmitter
Neurotransmisor que abre canales de Cl^- o de K^+ regulados por transmisor, en la membrana postsináptica de una célula nerviosa o muscular, de forma que tiende a inhibir la formación de un potencial de acción.

neutrófilo
neutrophil
Célula sanguínea de la serie blanca especializada en la captación por fagocitosis de material particulado. Penetra en los tejidos que han sido infectados o inflamados. (Figura 15–79)

neutrón
neutron
Partícula pesada subatómica sin carga eléctrica que forma parte de un núcleo atómico. (Figura 2–1)

nicho de las células madre
stem-cell niche
Microambiente especializado en un tejido en el que se pueden mantener células madre en condiciones de autorrenovación. (Figura 23–27)

nicotinamida adenina dinucleótido – *véase* **NAD⁺/NADH**
nicotinamide adenine dinucleotide

nicotinamida adenina dinucleótido fosfato –*véase* **NADP⁺/NADPH**
nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

nm – *véase* **nanómetro**

NMR (resonancia magnética nuclear, espectroscopia NMR)
NMR (nuclear magnetic resonance, NMR spectroscopy)
La NMR es la absorción resonante de radiación electromagnética a una frecuencia determinada por núcleos atómicos en un campo magnético, debida a cambios en la orientación de sus momentos de dipolo magnético. El espectro NMR proporciona información acerca del ambiente químico del núcleo atómico. La NMR es ampliamente utilizada para determinar la estructura tridimensional de proteínas pequeñas y de otras moléculas pequeñas. Los principios de la NMR también se utilizan en el diagnóstico médico en imágenes de resonancia magnética (MRI: *magnetic resonante imaging*). (Figura 8–29)

NO – *véase* **óxido nítrico**

no polar (apolar)
nonpolar (apolar)
Carente de cualquier acumulación asimétrica de cargas positivas o negativas. Las moléculas no polares por lo general son insolubles en agua. (Paneles 2–2 y 2–3, pp. 108-111)

no separación
nondisjunction
Suceso que ocasionalmente se produce durante la meiosis, consistente en que dos cromosomas homólogos no se separan de forma que las células germinales resultantes tienen un demasiados o pocos cromosomas.

NO sintasa (NOS)
NO synthase (NOS)
Enzima que sintetiza óxido nítrico (NO) por la desaminación de la arginina. (Figura 15–12B)

Notch
Notch
Receptor proteico transmembrana (y proteína reguladora de genes latentes) implicado en muchos casos de elección del destino celular en el desarrollo animal, por ejemplo en la especificación de las células nerviosas a partir del epitelio ectodérmico. Sus ligandos son proteínas de la superficie celular como la proteína Delta y la proteína Serrate. (Figura 15–76)

notocorda
notochord
Varilla rígida de células que definen el eje central de todos los embriones de cordado. En los vertebrados, la notocorda queda incorporada en la columna vertebral. (Figura 22–97)

NPC –*véase* **complejo de poro nuclear**

NSF (factor sensible a N-etilmaleimida)
NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor)
Proteína con actividad ATPasa que disocia un complejo formado por una v-SNARE y una t-SNARE. (Figuras 13–18 y 13–22)

nucleación
nucleation
Etapa crítica en el ensamblaje de una estructura polimérica, como un microtúbulo, en la cual un pequeño grupo de monómeros se agrega en una

disposición adecuada e inicia una rápida polimerización. (Panel 16–2, pp. 978-979) En general, etapa limitante de un proceso de ensamblaje.

nucleasa
nuclease
Enzima que rompe ácidos nucleicos hidrolizando enlaces entre nucleótidos. *Véase también* endonucleasa y exonucleasa.

nucleasa de restricción (enzima de restricción)
restriction nuclease (restriction enzyme)
Miembro de una gran familia de nucleasas que pueden romper una molécula de DNA en cualquier lugar en el que se presente una secuencia corta de nucleótidos determinada. Se utiliza ampliamente en tecnología del DNA recombinante. (Figuras 8–31 y 8–32)

núcleo
nucleus
Orgánulo prominente, delimitado por una doble membrana, propio de la célula eucariota. Contiene el DNA organizado en cromosomas.

nucleocápside
nucleocapsid
Ácido nucleico vírico más su cápside proteica circundante. Si existe una envuelta vírica, ésta envuelve la nucleocápside. (Figura 13–19)

nucleolo
nucleolus
Estructura del núcleo en la que se transcriben los rRNA y se ensamblan las subunidades ribosómicas. (Figura 4–9)

nucleoporina
nucleoporin
Cualquiera de las diferentes proteínas que constituyen los complejos de poro nuclear.

nucleósido
nucleoside
Base púrica o pirimidínica unida de forma covalente a un azúcar ribosa o desoxiribosa. (Panel 2–6, pp. 116-117)

nucleosoma
nucleosome
Estructura de la cromatina eucariota, semejante a una cuenta de collar. Está compuesto por una corta cadena de DNA enrollada alrededor de un núcleo octamérico de proteínas histonas. Es la unidad estructural fundamental de la cromatina. (Figuras 4–23 y 4–24)

nucleótido
nucleotide
Nucleósido con uno o más grupos fosfato unidos al azúcar mediante enlaces éster. El DNA y el RNA son polímeros de nucleótidos. (Panel 2–6, pp. 116-117)

oligodendrocito
oligodendrocite
Célula glial del sistema nervioso central de los vertebrados, que forma una vaina de mielina alrededor de los axones neuronales. *Compárese* con célula de Schwann.

oligómero
oligomer
Corto polímero.

oligosacárido
oligosaccharide
Cadena corta, lineal o ramificada, de azúcares unidos de manera covalente (Panel 2–4, pp. 112-113)

***N*-oligosacárido**
N-*linked oligosaccharide*
Cadena de azúcares unida a una proteína a través del grupo NH_2 de la cadena lateral de un residuo de asparagina. *Compárese* con *O*-oligosacárido. (Figura 12–50 y 12–51)

***O*-oligosacárido**
O-*linked oligosaccharide*
Cadena de azúcares unida a una proteína a través del grupo OH de un residuo de serina o de treonina. *Compárese* con *N*-oligosacárido. (Figura 13–32)

oncogén
oncogene
Gen alterado cuyo producto puede actuar de forma dominante colaborando a que una célula se transforme en cancerosa. Normalmente, un oncogén es una forma mutante de un gen normal (protooncogén) que participa en el control del crecimiento o de la división celular. (Figura 20–27)

oocito
oocyte
Óvulo cuando complete la meiosis. Será haploide. (Figuras 21–25 y 21–26)

oogénesis
oogenesis
Proceso de formación y maduración de los oocitos en el ovario. (Figura 21–23)

operador
operator
Corta región de DNA de un cromosoma bacteriano que controla la transcripción de un gen adyacente. (Figura 7–34)

operón
operon
En un cromosoma bacteriano, grupo de genes contiguos que se transcriben en una sola molécula de mRNA. (Figura 7–34)

ORC – *véase* **complejo de reconocimiento del origen de replicación**

ORF – *véase* **pauta abierta de lectura**

organismo modelo
model organism
Especie que ha sido estudiada intensamente durante un periodo de tiempo muy largo y que, por lo tanto, constituye un "modelo" a partir del cual derivar principios fundamentales de la biología.

organismo transgénico
transgenic organism
Planta o animal que ha incorporado de forma estable uno o más genes de otra célula u organismo (mediante inserción, deleción y/o reemplazamiento) y que puede transmitirlos a las generaciones sucesivas. El gen que se ha añadido se denomina transgén. (Figuras 8–64 y 8–65)

Organizador (organizador de Spemann)
Organizer (Spermann's Organizer)
Tejido especializado del labio dorsal del blastómero de un embrión de un anfibio; fuente de señales que ayudan a orquestar la formación del eje corporal del embrión. (Denominado así en honor de H. Spemann y H. Mangold, sus codescubridores). (Figura 22–74)

organizador nucleolar
nucleolar organizer
Región de un cromosoma que contiene un grupo de genes de rRNA que dan lugar a parte del nucleolo. (Figura 6–47)

órgano linfoide
lymphoid organ
Órgano implicado en la producción de los linfocitos. Los linfocitos se producen en los órganos linfoides primarios y responden a los antígenos en los órganos linfoides periféricos. (Figura 25–3)

órgano linfoide periférico (órgano linfoide secundario)
peripheral lymphoid organ (secondary lymphoid organ)
Órgano linfoide en el que tanto los linfocitos T como los linfocitos B interaccionan con los antígenos extraños. Como ejemplos pueden citarse el bazo, los nódulos linfáticos y el tejido linfoide que está asociado a mucosas. (Figura 25–3)

órgano linfoide primario
central lymphoid organ (primary lymphoid organ)
Órgano linfoide en el que se forman los linfocitos a partir de células precursoras. En mamíferos adultos estos órganos son el timo y la médula ósea.

orgánulo
organelle
Compartimiento celular o gran complejo macromolecular, a menudo rodeado por una membrana, que tiene una estructura, una composición macromolecular y una función distintas. Como ejemplos pueden citarse el núcleo, el nucleolo, las mitocondrias, el complejo de Golgi y el centrosoma. (Figura 1–30)

origen de replicación
origin of replication, replication origin
(1) Lugar de un cromosoma donde se inicia la replicación del DNA. (2) Región de una molécula de DNA en la que se inicia la duplicación del DNA. (Figuras 4–21 y 5–25)

ortólogos
orthologs
Genes o proteínas de diferentes especies cuya secuencia es similar debido a que son descendientes de un mismo gen de un ancestro común de ambas especies. *Compárese* con parálogos. (Figura 1–25)

ósmosis
osmosis
Desplazamiento neto de moléculas de agua a través de una membrana semipermeable, dirigido por la diferencia de concentración de un soluto a ambos lados de dicha membrana. La membrana debe ser permeable al agua pero no las moléculas de soluto. (Panel 11–1, p. 664)

osteoblasto
osteoblast
Célula que segrega la matriz del hueso y que dará lugar al osteocito. (Figura 23–55)

osteocito
osteocyte
Célula del hueso, que no se divide y que se desarrolla partir de un osteoblasto y está embebida en el interior de la matriz del hueso (osteína). (Figura 23–55)

osteoclasto
osteoclast
Célula plurinucleada semejante a un macrófago que desgasta el hueso, haciendo posible su remodelación durante el crecimiento y en la respuesta a lesiones durante toda la vida. (Figura 23–59)

ovulación
ovulation
Liberación de un óvulo del ovario. (Figura 21–26)

óvulo
ovum
Oocito maduro. Gameto femenino

oxidación (oxidar)
oxidation (oxidize)
Pérdida de electrones de un átomo, como ocurre cuando a una molécula se le añade un oxígeno o se le elimina un hidrógeno. Lo opuesto a la reducción. (Figura 2–43)

oxidasa
oxidase
Enzima que cataliza una reacción de oxidación, especialmente si el aceptor de electrones es el oxígeno molecular.

óxido nítrico (NO)
nitric oxide (NO)
Molécula señal gaseosa presente muy utilizada en la comunicación célula-célula tanto en animales como en plantas. (Figura 15–12)

p53
p53
Gen supresor de tumores que se encuentra mutado en cerca de la mitad de los cánceres humanos. Codifica una proteína reguladora de genes que se activa cuando se produce daño en el DNA y que participa en el bloqueo de la progresión de la célula a través del ciclo celular. (Figuras 20–37 y 20–40)

par de bases
base pair
Dos nucleótidos de una molécula de RNA o de DNA que se mantienen unidos entre sí mediante enlaces de hidrógeno, por ejemplo G con C y A con T o con U.

par redox
redox pair
Pareja de moléculas una de las cuales actúa como dadora de electrones y la otra como aceptora de electrones, en una reacción de oxidación-reducción: por ejemplo, NADH (dador de electrones) y NAD^+ (aceptor de electrones). (Panel 14–1, p. 830)

Par3, Par6
Par3, Par6
Proteínas de armazón que participan en la especificación de la polaridad en células animales individuales; Par3 y Par6 forman un complejo con una proteína quinasa C atípica (aPKC). (Figura 19–31)

parálogos
paralogs
Genes o proteínas cuya secuencia es similar debido a que son el resultado de un suceso de duplicación génica ocurrido en un organismo ancestral. *Compárese* con ortólogos. (Figura 1–25)

pared celular
cell wall
Matriz extracelular mecánicamente resistente depositada por una célula en el exterior de su membrana plasmática. Es prominente en la mayoría de plantas, bacterias, arqueas, algas y hongos. No está presente en la mayoría de células animales.

pared celular primaria
primary cell wall
Primera pared celular producida por una célula vegetal en crecimiento; normalmente es delgada y flexible, dando espacio para el crecimiento de la célula. (Figura 19–79)

pared celular secundaria
secondary cell wall
Pared celular rígida y permanente que se sintetiza debajo de la delgada pared celular primaria en algunas células vegetales que han completado su crecimiento. (Figura 19–77C)

partenogénesis
parthenogenesis
Producción de un nuevo individuo a partir de un óvulo sin que éste haya sido fecundado por ningún espermatozoide.

partícula de reconocimiento de la señal (SRP)
signal-recognition particle (SRP)
Partícula ribonucleoproteica que se une a la secuencia señal de secreción del ER de una cadena polipeptídica parcialmente sintetizada y dirige al polipéptido, junto con el ribosoma que tiene unido, hacia el retículo endoplasmático. (Figura 12–39)

patógeno (adjetivo **patogénico**)
pathogen *(adjective* ***pathogenic)***
Organismo, célula, virus o prión que causa una enfermedad.

patrón
template
Cadena sencilla de DNA o de RNA cuya secuencia de nucleótidos actúa como referencia para la síntesis de una cadena complementaria. (Figura 1–3)

pauta abierta de lectura (ORF)
open reading frame (ORF)
Secuencia continua de nucleótidos libre de codones de paro al menos en una de las tres pautas de lectura, y, por tanto, con el potencial de codificar una proteína.

pauta de lectura
reading frame
Fase en que son leídos los nucleótidos en grupos de tres para codificar una proteína. Una molécula de RNA mensajero puede ser leída siguiendo tres pautas de lectura diferentes, pero sólo una de ellas dará la proteína adecuada. (Figura 6–51)

PCR (reacción en cadena de la polimerasa)
PCR (polymerase chain reaction)
Técnica que permite amplificar de forma específica determinadas regiones de DNA, mediante la utilización de cebadores de secuencia específica y varios ciclos de síntesis de DNA, a cada uno de los cuales le sigue un breve tratamiento de incremento de calor para separar las cadenas complementarias. (Figura 8–45)

pectina
pectin
Mezcla de polisacáridos rica en ácido galacturónico, que forma una matriz muy hidratada en la que está embebida la celulosa de las paredes vegetales. (Figura 19–79)

pentosa
pentose
Azúcar de cinco carbonos.

peptidasa señal
signal peptidase
Enzima que escinde la secuencia señal terminal de una proteína cuando se ha completado el proceso de clasificación. (Figura 12–25)

péptido
peptide
Corto polímero de aminoácidos.

permeasa – *véase* **transportador**
permease

peroxisoma
peroxisome
Pequeño orgánulo celular delimitado por una única membrana, que utiliza oxígeno molecular para oxidar moléculas orgánicas. Contiene algunas enzimas que producen peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y otras que lo degradan. (Figura 12–30)

peso molecular (masa molecular relativa)
molecular weight (relative molecular mass)
Masa de una molécula relativa a la masa del átomo de hidrógeno, estrictamente, relativa a 1/12 de la masa de un átomo de ^{12}C, es decir, un dalton.

pH
pH
Medida común de la acidez de una solución: "p" se refiere a la potencia de 10, y "H" se refiere al hidrógeno. Se define como el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno en moles por litro (M). $pH = -\log [H^+]$. Así una solución de pH 3 contendrá 10^{-3} M de iones hidrógeno. Un pH inferior a 7 es ácido y un pH superior a 7 es alcalino.

pI – *véase* **punto isoeléctrico**

PI 3-quinasa – *véase* **fosfoinosítido 3-quinasa**
PI 3-kinase

pinocitosis
pinocytosis
Literalmente significa "bebida celular". Tipo de endocitosis en la que todo tipo de materiales solubles son captados continuamente del medio, incorporados en pequeñas vesículas y transportados en el interior de endosomas con las moléculas unidas a membrana. *Compárese* con fagocitosis. (Figura 13–48)

pirimidina
pyrimidine
Compuestos con anillos que contienen nitrógeno, que se encuentran en el DNA y en el RNA: la citosina, la timina y el uracilo. (Panel 2–6, pp. 116-117)

piruvato (CH_3COCOO^-)
pyruvate (CH_3COCOO^-)
Producto final de la vía glucolítica. Entra en la mitocondria y alimenta el ciclo del ácido cítrico y otras vías biosintéticas.

PKA – *véase* **proteína quinasa dependiente de AMP cíclico**

PKB – *véase* **Akt**

PKC – *véase* **proteína quinasa C**

placa celular
cell plate
Estructura aplanada limitada por la membrana que se forma por la fusión de vesículas en el citoplasma de una célula vegetal en división y que es la precursora de una nueva pared celular.

placa metafásica
metaphase plate
Plano imaginario perpendicular al huso mitótico equidistante de ambos polos en el que se sitúan los cromosomas en la metafase. (Panel 17–1, pp. 1072-1073)

plaqueta
platelet
Fragmento celular, sin núcleo, que se produce en la médula ósea roja por rotura de un megacariocito y que se halla en grandes cantidades en la sangre. Colabora en el inicio de la coagulación de la sangre cuando los vasos sanguíneos son dañados.

plásmido
plasmid
Pequeña molécula de DNA circular extracromosómica que se replica de forma independiente del genoma. Los plásmidos modificados son ampliamente utilizados como vectores en la clonación de DNA.

plasmodesmo
plasmodesma (plural ***plasmodesmata***)
Equivalente a una unión comunicante en vegetales. Unión comunicante célula-célula en plantas en la cual un canal de citoplasma limitado por membrana plasmática conecta dos células adyacentes a través de un pequeño poro presente en sus paredes celulares.

plastidio
plastid
Orgánulo citoplasmático propio de células vegetales, rodeado por una doble membrana, que contiene su propio DNA y que a menudo está pigmentado. Los cloroplastos son plastidios.

PLC – *véase* **fosfolipasa C**

ploidía
ploidy
Número de juegos homólogos completos de cromosomas que hay en un genoma. Los organismos diploides tienen dos juegos completos de cromosomas en sus células somáticas; los organismos haploides tienen un solo juego; los organismos poliploides tienen más de dos.

polar
polar
En sentido eléctrico, el término polar describe una estructura (por ejemplo, un enlace químico, un grupo químico o una molécula) con una concentración de cargas positivas hacia un extremo y de cargas negativas hacia el otro, como resultado de una distribución desigual de los electrones. Las moléculas polares normalmente son solubles en agua. (Figura 2–10 y Panel 2–2, pp. 108-109)

polaridad celular planar
planar cell polarity
Tipo de asimetría celular que puede observarse en algunos epitelios, tal que cada célula tiene un vector de polaridad orientado en el plano del epitelio. (Figura 19–32)

poliadenilación
polyadenilation
Adición de una larga secuencia de nucleótidos A (la cola poli A) al extremo 3' de una molécula naciente de mRNA. (Figuras 6–21 y 6–38)

polimerasa
polymerase
Enzima que cataliza reacciones de polimerización, como la síntesis de DNA o de RNA. *Véase también* DNA polimerasa, RNA polimerasa.

polímero
polymer
Molécula grande generada mediante la unión covalente de varias subunidades idénticas o similares (monómeros) entre sí.

polimórfico
polymorphic
Describe un gen con dos o más alelos distintos que coexisten con elevadas frecuencias en una publación.

polimorfismo de un único nucleótido (SNP)
single-nucleotide polymorphism (SNP)
Variación, entre individuos de una población, en un nucleótido de una determinada posición del DNA.

polipéptido
polypeptide
Polímero lineal de aminoácidos. Las proteínas son polipéptidos de gran tamaño y ambos términos pueden utilizarse de forma indiferente. (Panel 3–1, pp. 128-129)

poliploide
polyploid
Célula u organismo que contiene más de dos juegos de cromosomas homólogos.

polirribosoma (polisoma)
polyribosome (polysome)
Molécula de RNA mensajero a la que se han unido varios ribosomas que están realizando síntesis de proteínas. (Figura 6–76)

polisacárido
polyssacharide
Polímero lineal o ramificado de monosacáridos. Como ejemplos pueden citarse el glucógeno, el almidón, el ácido hialurónico y la celulosa. (Panel 2–4, p. 113)

polo animal
animal pole
En huevos con yema, el extremo opuesto a la yema. Las células derivadas de la región animal envolverán a las derivadas de la región de la yema (vegetal). (Figura 22–68)

polo vegetativo
vegetal pole
En un huevo de animal, extremo en el que se localiza la mayoría de la yema. El extremo opuesto al polo animal. (Figura 22–68)

porina
porin
Proteína formadora de canal de la membrana externa de las bacterias, de las mitocondrias y de los cloroplastos.

potenciación a largo plazo
long-term potentiation
Incremento de larga duración (días o semanas) de la sensibilidad de determinadas sinapsis del cerebro. Inducido por una corta ráfaga de descargas repetitivas de las neuronas presinápticas. (Figura 11–42)

potenciador
enhancer
Secuencia de DNA reguladora a la que se unen proteínas reguladoras de genes, incrementando la velocidad de transcripción de un gen estructural que puede estar a miles de pares de bases de distancia.

potencial de acción
action potential
Excitación eléctrica rápida, transitoria y autopropagativa, de la membrana plasmática de una célula como una neurona o una fibra muscular. Los potenciales de acción, o impulsos nerviosos, hacen posible la señalización a largas distancias en el sistema nervioso. (Figura 11–30)

potencial de membrana
membrane potential
Diferencia de voltaje a través de una membrana debida a un ligero exceso de iones positivos en un lado y de iones negativos en el otro lado. Un potencial de membrana típico de la membrana plasmática de una célula animal es de –60 mV (negativo en el interior respecto al fluido circundante). (Figura 11–22)

potencial de reposo de la membrana
resting membrane potential
Potencial de la membrana en condiciones de equilibrio, en las que no hay un flujo neto de iones a través de la membrana plasmática. *Véase también* potencial de membrana.

potencial redox
redox potential
Afinidad de un par redox por los electrones, por lo general se cuantifica como la diferencia de voltaje entre una mezcla equimolar de los miembros del par y una referencia estándar. El par $NADH/NAD^+$ tiene un potencial redox bajo y el par O_2/H_2 tiene un potencial redox alto (alta afinidad por los electrones). (Panel 14–1, p. 830)

pre-mRNA
pre-mRNA
Precursor del RNA mensajero. En los eucariotas incluye todos los estadios intermedios del procesamiento del RNA.

prenilación
prenylation
Unión covalente de un grupo lipídico isoprenoide a una proteína. (Figura 10–20)

presión de turgencia
turgor pressure
Gran presión hidrostática que se desarrolla en el interior de una célula vegetal como resultado de la entrada de agua por ósmosis; es la fuerza que dirige la expansión de las células en el crecimiento de los vegetales y que mantiene la rigidez de los tallos y de las hojas.

primasa – *véase* **DNA primasa**
primase

prión
prion
Un prión es un agente infeccioso constituido por una proteína plegada de forma anormal, que se replica en el huésped induciendo a que las proteínas normales del mismo tipo adopten su misma estructura aberrante. (Figuras 6–95 y 6–96)

procariota
procaryote (prokaryote)
Un procariota es un microorganismo unicelular que carece de un núcleo bien definido rodeado de membrana. Tanto una bacteria como una arquea. (Figura 1–21)

procaspasa
procaspase
Precursor inactivo de una caspasa, una enzima proteolítica que habitualmente participa en la apoptosis. (Figura 18–5)

procesamiento del RNA
RNA processing
Término general utilizado para describir las diferentes modificaciones que sufre un transcrito de RNA hasta que alcanza su forma madura. Puede incluir la formación de la caperuza en 5´, poliadenilación en 3´, fragmentación en 3´, ayuste y edición.

profase
prophase
Primera etapa de la mitosis durante la cual los cromosomas están condensados, pero todavía no se hallan unidos al huso mitótico. (Panel 17–1, pp. 1072-1073)

progresión tumoral
tumor progression
Proceso mediante el cual un desorden inicialmente benigno del comportamiento celular evoluciona de forma gradual hasta dar lugar a un verdadero cáncer. (Figuras 20–9 y 20–11)

prometafase
prometaphase
Fase de la mitosis, que precede a la metafase, en la que la envoltura nuclear se descompone y los cromosomas se unen por primera vez al huso mitótico. (Panel 17–1, pp. 1072-1073)

promotor
promoter
Secuencia de nucleótidos de un DNA a la que se une la RNA polimerasa para iniciar la transcripción. *Véase también* promotor inducible. (Figura 7–44)

promotor inducible
inducible promoter
Secuencia de DNA reguladora que permite que la expresión de un gen asociado se active mediante un estímulo molecular o físico particulares (p. ej., un estrés térmico). (Figura 22–49)

proteasa (proteinasa, enzima proteolítica)
protease (proteinase, proteolytic enzyme)
Enzima que degrada proteínas hidrolizando algunos de sus enlaces peptídicos.

proteína
protein
Principal constituyente macromolecular de las células. Polímero lineal de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos, siguiendo una secuencia determinada. (Figura 3–1)

proteína activadora de gen – *véase* **activador**
gene activator protein

proteína activadora de GTPasa (GAP)
GTPase-activating protein (GAP)
Proteína que se une a una GTPasa inactivándola por la estimulación de su actividad GTPasa, la cual hidroliza el GTP unido hasta GDP. (Figura 3–71)

proteína adaptadora
adaptor protein
Término general que se refiere a proteínas que sólo actúan uniendo dos o más proteínas diferentes en un proceso intracelular de señalización o complejo proteico. (Figura 15–22)

proteína APC: proteína del gen causante de la poliposis adenomatosa familiar
adenomatous polyposis coli (APC) protein
Proteína supresora de tumores que forma parte de un complejo proteico en la vía de señalización Wnt, que recluta α catenina citoplasmática libre y la degrada.

proteína asociada a microtúbulos (MAP)
microtubule-associated protein (MAP)
Cualquier proteína que se une a los microtúbulos y modifica las propiedades de éstos. Se han encontrado muchos tipos diferentes, incluyendo proteínas estructurales, como la MAP-2, y proteínas motoras, como la dineína. [No debe confundirse con la "MAP" (la proteína quinasa activada por mitógeno; *mitogen-activated protein kinase*) de la "MAP-quinasa".]

proteína con secuencias repetidas ricas en leucina (proteína LRR)
leucine-rich repeat protein (LRR protein)
Tipo de receptor con actividad serina/treonina quinasa, común en plantas. Se caracteriza por una formación en tándem de las secuencias repetidas ricas en leucina, en la parte extracelular.

proteína de armazón (o de agregación)
scaffold protein
Proteína que une grupos de proteínas de señalización intracelular formando un complejo proteico, a menudo anclando el complejo en una localización específica de la célula. (Figura 15–17)

proteína de canal
channel protein
Proteína de transporte de membrana que forma un poro acuoso en la membrana a través del cual puede pasar un soluto determinado, habitualmente un ion. *Compárese* con transportador.

proteína de estrés por calor (Hsp, proteína de respuesta al estrés)
heat shock protein (HPS, stress-response protein)
Proteína perteneciente a la gran familia de proteínas chaperonas moleculares, muy conservadas, denominadas así porque se sintetizan en cantidades crecientes en respuesta a un incremento de la temperatura o de otro tratamiento estresante. Las Hsp desempeñan papeles importantes colaborando al plegamiento correcto. Como ejemplos destacados pueden citarse la Hsp60 y la Hsp70.

proteína de fusión
fusión protein
Proteína modificada de forma artificial que combina dos o más polipéptidos que normalmente se encuentran separados entre sí. Producida a partir de un gen recombinante.

proteína de resistencia a múltiples drogas (proteína MDR)
multidrug resistance protein (MDR protein)
Tipo de proteína transportadora ABC capaz de bombear fármacos hidrofóbicos (como algunos fármacos anticancerígenos) hacia el exterior del citoplasma de las células eucariotas.

proteína de señalización intracelular
intracellular signaling protein
Proteína que participa en las vías de señalización intracelular. Habitualmente activa la siguiente proteína de la vía o genera un mediador intracelular pequeño. (Figura 15–1)

proteína de transporte de membrana
membrane transport protein
Proteína de membrana que media el paso de iones o de moléculas a través de una membrana. Las dos clases principales son los transportadores (también llamados permeasas) y los canales. (Figuras 11–3 y 11–4)

proteína de unión a la actina
actin-binding protein
Proteína que en las células se asocia tanto con monómeros de actina como con filamentos de actina, modificando sus propiedades. Como ejemplos, pueden citarse la miosina, la β actinina y la profilina. (Panel 16–3, pp. 994-995)

proteína de unión a DNA de cadena sencilla
single-strand DNA-binding protein
Proteína que se une a las cadenas sencillas de la doble hélice de DNA abierta y evita que vuelvan a formarse estructuras helicoidales durante la replicación del DNA. (Figura 5–16)

proteína de unión a GTP – *véase* **GTPasa**
GTP- binding protein

proteína E2F
E2F protein
Proteína reguladora de genes que activa muchos genes que codifican proteínas necesarias para que la célula entre en la fase S del ciclo celular.

proteína fluorescente verde (GFP)
green fluorescent protein (GFP)
Proteína fluorescente aislada a partir de una medusa. Ampliamente utilizada como marcador en biología celular.

proteína G (proteína trimérica de unión a GTP)
G protein (trimeric GTP-binding protein)
Proteína trimérica que se une a GTP, con una actividad GTPasa intrínseca, que acopla GPCR a enzimas o a canales iónicos en la membrana plasmática (Tabla 15–3, p. 919)

proteína G estimuladora (G_s)
stimulatory G protein (G_s)
Proteína G que, cuando está activada, activa la enzima adenilato ciclasa y por consiguiente estimula la producción de AMP cíclico. (*Véase también* proteína G y Tabla 15–3, p. 919)

proteína G inhibidora (G_i)
inhibitory G protein (G_i)
Proteína G trimérica que puede regular canales iónicos e inhibir a la enzima adenilato ciclasa de la membrana plasmática. (*Véase también* proteína G. (Tabla 15–3, p. 919)

proteína G trimérica (proteína trimérica de unión a GTP) – *véase* **proteína G**
trimeric G protein (trimeric GTP-binding protein)

proteína Hedgehog
Hedgehog protein
Molécula señal extracelular secretada que desempeña muchos papeles diferentes controlando la diferenciación celular y la expresión de genes en los embriones animales y en los tejidos adultos. Una señalización Hedgehog excesiva puede conducir al cáncer.

proteína hnRNP (proteína ribonuclear nuclear heterogénea)
hnRNP protein (heterogeneous nuclear ribonuclear protein)
Cualquiera de los miembros de un grupo de proteínas que se ensamblan sobre el RNA recién sintetizado y lo compactan. (Figura 6–33)

proteína inhibidora de Cdk (CKI)
Cdk inhibitor protein (CKI)
Proteína que se une a complejos ciclina-Cdk y los inhibe; implicada principalmente en el control de las fases G_1 y S.

proteína integral de membrana
integral membrane protein
Proteína que es retenida en una membrana a través de uno o más dominios que se extienden o están embebidos en la bicapa lipídica. (Figura 10–19)

proteína MDR – *véase* **proteína de resistencia a múltiples drogas**
MDR protein

proteína MHC
MHC protein
Elemento de una gran familia de glucoproteínas de superficie celular de los vertebrados que son miembro de la superfamilia de las Ig. Las proteínas MHC se unen a fragmentos de péptido de antígenos no propios y los presentan a las células T induciendo una respuesta inmunológica adaptativa. *Véase también* proteínas MHC de clase I, proteínas MHC de clase II. (Figuras 25–49 y 25–50)

proteína MHC de clase I
class I MHC protein
Una de las dos clases de proteínas MHC. Está presente en la superficie de casi todos los tipos celulares de los vertebrados, donde pueden presentar péptidos derivados de un microbio intracelular que las infecta (como p. ej., un virus) a las células T citotóxicas. (Figura 25–50)

proteína MHC de clase II
class II MHC protein
Una de las dos clases de proteínas MHC. Está presente en la superficie de varias células presentadoras de antígenos, donde presenta péptidos no propios a las células T colaboradoras. (Figura 25–50)

proteína motora
motor protein
Proteína que utiliza energía derivada de la hidrólisis de nucleósidos trifosfato para autopropulsarse a lo largo de una vía lineal (un filamento proteico o de otra molécula polimérica).

proteína NFκB
NFκB protein
Proteína reguladora de genes latentes que es activada por varias vías de señalización intracelular cuando las células son estimuladas durante respuestas inmunitarias, inflamatorias o de estrés. También desempeña importantes papeles durante el desarrollo animal. (Figura 15–79)

proteína periférica de membrana
peripheral membrane protein
Proteína que está unida a una cara de una membrana sólo a través de interacciones no-covalentes con otras proteínas de membrana y que puede separarse mediante tratamientos relativamente suaves que dejan intacta la bicapa lipídica. (Figura 10–19)

proteína quinasa
protein kinase
Enzima que transfiere el grupo fosfato terminal del ATP a uno o más aminoácidos determinados (serina, treonina o tirosina) de una proteína diana.

proteína quinasa A (PKA) – *véase* **proteína quinasa A dependiente de AMP cíclico**
protein kinase A (PKA)

proteína quinasa activada por mitógeno – *véase* **MAP-quinasa**
mitogen-activated protein kinase

proteína quinasa atípica (aPKC)
atypical protein kinase (aPKC)
Una forma atípica de la proteína quinasa C (PKC) que no requiere ni calcio ni fosfatidilserina para ser activa. Una de estas aPKC participa en la especificación de la polaridad de algunas células animales individuales.

proteína quinasa B (PKB) – *véase* **Akt**
protein kinase B (PKB)

proteína quinasa C (PKC)
protein kinase C (PKC)
Proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} que, cuando es activada por diacilglicerol y por un incremento de la concentración citosólica de Ca^{2+}, fosforila proteínas diana en determinados residuos de serina y treonina. (Figura 15–39)

proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (proteína quinasa A, PKA)
cyclic AMP-dependent protein kinase (protein kinase A, PKA)
Enzima que fosforila proteínas diana en respuesta a un incremento de los niveles intracelulares de AMP cíclico. (Figura 15–35)

proteína quinasa dependiente de Ca^{2+}/calmodulina – *véase* **CaM-quinasa**
Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase

proteína quinasa dependiente de cAMP – *véase* **proteína quinasa A**
cAMP-dependent protein kinase

proteína reguladora de genes
gene regulatory protein
Nombre genérico para cualquier proteína que se une a una secuencia determinada de DNA y altera la expresión de un gen.

proteína represora de genes – *véase* **represor**
gene repressor protein

proteína residente del ER
ER resident protein
Proteína que permanece en el retículo endoplasmático (ER) o en sus membranas y lleva a cabo su función; en contraposición a las proteínas que sólo se encuentran en el ER transitoriamente.

proteína retinoblastoma (Rb)
retinoblastoma protein (Rb)
Proteína supresora de tumores que participa en la regulación de la división celular. Se halla mutada en retinoblastomas cancerosos así como en muchos otros tumores. Su actividad normal consiste en regular el ciclo celular eucariota uniéndose (e inhibiendo) a las proteínas E2F, bloqueando así la progresión de la replicación del DNA y la división celular. (Figura 17–62)

proteína Smad
Smad protein
Proteína reguladora de genes latentes que es fosforilada y activada por un receptor serina/treonina quinasa y que transporta la señal desde la superficie celular hasta el núcleo. (Figura 15–69)

proteína tirosina fosfatasa
protein tyrosine phosphtase
Enzima que elimina grupos fosfato de residuos tirosina fosforilados de proteínas (Figura 25–71)

proteína transmembrana
transmembrane protein
Proteína de membrana que se extiende a través de la bicapa lipídica y que tiene parte de su masa a ambos lados de la membrana. (Figura 10–19)

proteína transmembrana de multipaso
multipass transmembrane protein
Proteína de membrana cuya cadena polipeptídica cruza la bicapa lipídica más de una vez. (Figura 10–19)

proteína transmembrana de paso único
single-pass transmembrane protein
Proteína de membrana cuya cadena polipeptídica cruza la bicapa lipídica una sola vez. (Figura 10–19)

proteína transportadora – *véase* **transportador**
carrier protein

proteínas Mcm
Mcm proteins
Proteínas de la célula eucariota necesarias para el inicio de la replicación del DNA: parece que forman la helicasa de la horquilla de replicación del DNA.

proteínas transportadoras ABC
ABC transporter proteins
Gran familia de proteínas transportadoras de membrana que utilizan la energía de hidrólisis del ATP para transferir péptidos y una gran variedad de pequeñas moléculas a través de las membranas. (Figura 11–7)

proteoglucano
proteoglycan
Molécula formada por una o más cadenas de glucosaminoglucano unidas a un núcleo proteico. (Figura 19–58)

proteolisis
proteolysis
Degradación de una proteína por la hidrólisis de sus enlaces peptídicos.

proteómica
proteomics
Estudio de todas las proteínas, incluyendo todas las formas modificadas covalentemente, producidas por una célula, un tejido o un organismo. A menudo la proteómica estudia los cambios en este gran conjunto de proteínas del "proteoma" causados por cambios en el ambiente o por señales extracelulares.

proteosoma
proteasome
Gran complejo proteico del citosol, con actividad proteolítica, que es responsable de la degradación de las proteínas que están marcadas para ser destruidas mediante ubiquitinación o mediante otros sistemas. (Figuras 6–89 y 6–90)

protista
protist
Eucariota unicelular. Incluye los protozoos, las algas y levaduras. (Figura 1–41)

proto-oncogén
proto-oncogen
Gen normal, por lo general relacionado con la regulación de la proliferación celular, que mediante mutación puede ser transformado en un oncogén promotor de cáncer. (Figura 20–34)

protón
proton
Partícula subatómica cargada positivamente del núcleo atómico. El hidrógeno tiene un núcleo compuesto por un solo protón (H^+). (Figura 2–1)

protozoo
protozoa
Organismo parásito o de vida libre, eucariota, unicelular, móvil y no fotosintético, como *Paramecium* y *Amoeba*. Los protozoos de vida libre se alimentan de bacterias o de otros microorganismos. (Figura 1–41)

pseudogén
pseudogene
Secuencia de nucleótidos de DNA que ha acumulado diversas mutaciones que lo han convertido en un gen inactivo y no funcional.

pseudópodo
pseudopodium (plural ***pseudopodia***)
Evaginación grande y fina de la superficie celular que forman las células ameboidales cuando se desplazan. De forma más general, cualquier evaginación dinámica rica en actina de la superficie de una célula animal. *Compárese* con filopodio y con lamelipodio. (Figura 16–94)

punto de control
checkpoint
Punto del ciclo de división de las células eucariotas en el cual la progresión a través del ciclo puede ser interrumpida hasta que se den las condiciones adecuadas para que la célula prosiga hasta la fase siguiente.

punto de control de la unión al huso (punto de control de la transición de la metafase a la anafase)
spindle assembly checkpoint (metaphase to anaphase transition checkpoint)
Punto de control que actúa durante la mitosis asegurando que todos los cromosomas están unidos adecuadamente al huso antes de que se inicie la separación de las cromátidas hermanas. (Figura 17–14 y Panel 17–1, pp. 1072-1073)

punto de control de G_2/M
G_2/M checkpoint
Punto del ciclo celular de las células eucariotas en el que la célula determina si la replicación del DNA se ha completado antes de disparar los sucesos tempranos de la mitosis que conducirán al alineamiento de los cromosomas sobre el huso. (Figura 17–14)

punto de restricción – *véase* **inicio**
restriction point

punto isoeléctrico (PI)
isoelectric point (IP)
El pH al que una molécula en solución no presenta carga eléctrica neta, y por lo tanto, no se desplaza en un campo eléctrico. (Figura 8–22)

purina
purine
Compuestos con anillos que contienen nitrógeno, que se encuentran en el DNA y en el RNA: la adenina y la guanina. (Panel 2–6, pp. 116-117)

quelante
chelate
Que se combina de forma reversible, normalmente con gran afinidad, con un ion metálico como el hierro, el calcio o el magnesio.

queratina
keratin
Proteína que forma filamentos intermedios de queratina, características de las células epiteliales. Las queratinas especializadas se encuentran en el pelo, en las uñas y en las plumas.

quiasma
chiasma (plural ***chiasmata***)
Conexión visible en forma de X entre cromosomas homólogos apareados durante la meiosis. Representa un punto de entrecruzamiento del cromosoma, una forma de recombinación genética.

quimera
chimera
Organismo completo formado a partir de un agregado de dos o más poblaciones de células genéticamente diferentes (dos o más genotipos), originadas a partir de cigotos diferentes. (*Compárese* con mosaico.)

quimioquina
chemokine
Citoquina quimiotáctica. Pequeña proteína secretada que atrae algunas células, como los leucocitos, hacia el lugar de origen de esta proteína. Es importante el papel que desempeña en el funcionamiento del sistema inmunitario.

quimiotaxis
chemotaxis
Desplazamiento dirigido de una célula u organismo hacia o en contra de una sustancia química difusiva.

quinasa
kinase
Enzima que cataliza la adición de grupos fosfato a moléculas. *Véase también* proteína quinasa.

quinasa activadora de Cdk (CAK)
Cdk-activating kinase (CAK)
Proteína quinasa que fosforila Cdk de los complejos ciclina-Cdk y activa Cdk.

quinasa de adhesión focal (FAK)
focal adhesion kinase (FAK)
Tirosina quinasa citoplasmática presente en la uniones célula-matriz (adhesiones focales) asociada a las colas citoplasmáticas de las integrinas.

quinasa dependiente de ciclina (Cdk)
cyclin-dependent kinase (Cdk)
Proteína quinasa que para ser activa tiene que formar un complejo con una ciclina. Diferentes complejos ciclina-Cdk ponen en funcionamiento diferentes etapas del ciclo de división celular y fosforilan proteínas diana específicas. (Figura 17–15)

quinesina
kinesin
Miembro de una de las dos clases principales de proteínas motoras que utilizan la energía de hidrólisis de ATP para desplazarse a lo largo de los microtúbulos. (Figura 16–58)

quinona (Q)
quinone (Q)
Pequeña molécula transportadora de electrones, móvil y liposoluble, que se encuentra en las cadenas transportadoras de electrones respiratoria y fotosintética. (Figura 14–24)

quitina
chitin
Abundante polisacárido polimérico orgánico de N-acetilglucosamina. Componente mayoritario del exoesqueleto de los insectos y de las paredes celulares de los hongos.

Rab (proteína Rab)
Rab (Rab protein)
GTPasa monomérica de la superfamilia Ras presente en la membrana plasmática y en las membranas de los orgánulos. Participa en conferir la especificidad en la unión de las vesículas. (Tabla 15–5, p. 926)

radical libre
free radical
Átomo o molécula que es extremadamente reactiva debido a que tiene por lo menos un electrón desapareado. Son responsables de una gran parte de las alteraciones del DNA.

Ran (proteína Ran)
Ran (Ran protein)
GTPasa monomérica de la superfamilia Ras que está presente tanto en el citosol como en el núcleo. Es necesaria para que se dé el transporte activo de macromoléculas hacia dentro y hacia fuera del núcleo a través de los complejos de poro nuclear. (Tabla 15–5, p. 926)

Ras (proteína Ras)
Ras (Ras protein)
GTPasa monomérica de la superfamilia Ras que colabora en la transmisión de señales desde receptores RTK de la superficie celular hasta el núcleo, frecuentemente en respuesta a señales que estimulan la división celular. Se denomina así por el gen *ras*, identificado por primera vez en virus que causan sarcomas en rata (***ra**t **s**arcomas*).

rasgo complejo
complex trait
Característica heredable cuya transmisión a la progenie no obedece a las reglas sencillas de las leyes de Mendel. Estos rasgos complejos son debidos a la interacción de varios o de muchos genes y/o a interacciones con el entorno.

Rb – *véase* **proteína retinoblastoma**

reacción acoplada
coupled reaction
Par de reacciones químicas relacionadas en las que la energía liberada por una de ellas impulsa la otra. (Figura 2–51)

reacción de condensación (reacción de deshidratación)
condensation reaction (dehydratation reaction)
Reacción química en la que dos moléculas se hallan unidas covalentemente a través de grupos –OH con la eliminación de una molécula de agua.

reacción de fijación del carbono
carbon fixation reaction
Proceso mediante el cual el carbono inorgánico (como CO_2 atmosférico) es incorporado a moléculas orgánicas. Es la segunda etapa de la fotosíntesis. (Figura 14–39)

reacción en cadena de la polimerasa – *véase* **PCR**
polymerase chain reaction

reacción redox
redox reaction
Reacción en la que uno de los componentes se oxida y el otro se reduce; una reacción de oxidación-reducción. (Panel 14–1, p. 830)

RecA (proteína RecA)
RecA (RecA protein)
Prototipo de una clase de proteínas de unión a DNA que catalizan la sinapsis de las cadenas de DNA durante la recombinación genética. (Figura 5–56)

recambio rotatorio
treadmilling
Proceso por el que un filamento proteico polimérico mantiene constante su longitud, mediante la adición de subunidades proteicas en un extremo y la pérdida de subunidades en el otro. (Panel 16–2, pp. 978-979)

receptor
receptor
Cualquier proteína que une de forma específica moléculas señal (ligandos) e inicia una respuesta en la célula. Algunos se hallan en la superficie celular mientras que otros se hallan dentro de la célula. (Figura 15–3)

receptor acoplado a canal iónico – *véase* **canal iónico regulado por transmisor**
ion-channel-coupled receptor

receptor acoplado a enzima
enzyme-coupled receptor
Principal tipo de receptor de la superficie celular en el que el dominio citoplasmático tiene actividad catalítica propia o está asociado a una enzima intracelular. En ambos casos, la actividad enzimática está estimulada por la unión del ligando al receptor. (Figura 15–16)

receptor acoplado a proteína G
G-protein-coupled receptor (GPCR)
Receptor de superficie celular, que atraviesa la membrana siete veces que, cuando es activado por su ligando extracelular, activa a una proteína G la cual, a su vez, activa una enzima o un canal iónico de la membrana plasmática. (Figuras 15–16 y 15–30)

receptor asociado a histidina quinasa
histidine-kinase-associated receptor
Tipo de receptor transmembrana que se encuentra en la membrana plasmática de bacterias, de levaduras y de células vegetales, y que está implicado, por ejemplo, en la percepción de los estímulos responsables de la quimiotaxis bacteriana. Está asociado a una proteína histidina quinasa por su cara citoplasmática.

receptor de acetilcolina
***acetylcholine receptor* (AChR)**
Canal iónico que se abre en respuesta a la unión de acetilcolina y transduce así una señal química en una eléctrica. Se trata del ejemplo mejor conocido de canal iónico regulado por ligando. A veces denominado receptor *nicotínico* de la acetilcolina, para diferenciarlo del receptor *muscarínico* de la acetilcolina, que es un receptor de la superficie celular asociado a proteína G.

receptor de citoquina
cytokine receptor
Receptor de la superficie celular que se une de forma específica a citoquinas u hormonas y que actúa a través de la vía de señalización Jak-STAT. (Figura 15–68)

receptor de IP_3 (canal liberador de Ca^{2+} regulado por IP_3)
IP_3 receptor (IP_3-gated Ca^{2+}-release channel)
Canal regulado por Ca^{2+} situado en la membrana del ER, que se abre cuando se une a él IP_3 del citosol, liberando al citosol Ca^{2+} almacenado en el ER. (Figura 15–39)

receptor de muerte
death receptor
Proteína receptora transmembrana que cuando se une a algún ligando extracelular puede señalizar a la célula a sufrir apoptosis. (Figura 18–6)

receptor de reconocimiento de patrón
pattern recognition receptor
Receptor presente sobre o en el interior de las células del sistema inmunitario innato que reconoce y responde a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP: *pathogen-associated molecular patterns*), como los carbohidratos de la superficie de las bacterias y de los virus y secuencias GC no metiladas del DNA bacteriano.

receptor de transporte nuclear (carioferina)
nuclear transport receptor (karyopherin)
Proteína que acompaña a otras proteínas tanto hacia dentro como hacia fuera del núcleo: los receptores de importación nuclear o de exportación nuclear. (Figura 12–15)

receptor Eph
Eph receptor
El receptor de tipo tirosina quinasa (RTK) más numeroso. Reconoce las efrinas. (Figura 15–52)

receptor Fc
Fc receptor
Miembro de una familia de receptores de superficie celular que se unen a la región Fc de un anticuerpo (inmunoglobulina). Diferentes receptores Fc son específicos de las diferentes clases de anticuerpos, como las IgG, las IgA o las IgE.

receptor serina/treonina quinasa
receptor serine/threonine kinase
Receptor de superficie celular con un dominio de unión extracelular y un dominio quinasa intracelular que fosforila proteínas de señalización en residuos serina o treonina, en respuestas a la unión de ligandos. Como por ejemplo, el receptor TGFβ. (Figura 15–69)

receptor tirosina quinasa (RTK)
receptor tyrosine kinase (RTK)
Receptor de superficie celular con un dominio de unión extracelular y un dominio quinasa intracelular que fosforila proteínas de señalización en residuos tirosina como respuesta a la unión de ligandos. (Figura 15–52 y Tabla 15–4, p. 923)

recesivo
recessive
En genética, se refiere al miembro de un par de alelos que no se expresa en el fenotipo de un organismo cuando está presente el alelo dominante. También se refiere al fenotipo de un individuo que únicamente tiene alelos recesivos. (Panel 8–1, pp. 554-555)

recombinación (recombinación genética)
recombination (genetic recombination)
Proceso en el que las moléculas de DNA se rompen y los fragmentos se vuelven a soldar siguiendo combinaciones nuevas. Puede ocurrir de forma natural en la célula viva, por ejemplo, por entrecruzamiento durante la meiosis, o *in vitro* utilizando DNA purificado y enzimas que rompen y unen cadenas de DNA. Existen tres amplias clases de recombinación: la homóloga (general), la conservadora de sitio específico y la transposicional.

recombinación específica de lugar
site-specific recombination
Tipo de recombinación que ocurre en secuencias específicas de DNA y que se lleva a cabo por proteínas específicas que reconocen estas secuencias. Puede tener lugar entre dos moléculas de DNA diferentes o dentro de una misma molécula de DNA.

recombinación general, recombinación genética general – *véase* **recombinación homóloga**
general recombination, general genetic recombination

recombinación genética – *véase* **recombinación**
genetic recombination

recombinación homóloga (recombinación general)
homologous recombination (general recombination)
Intercambio genético entre un par de secuencias de DNA idénticas o muy similares, típicamente las que se hallan en las dos copias del mismo cromosoma. (Figuras 5-51, 5–53, 5–59 y 5–64)

recombinación V(D)J
V(D)J recombination
Proceso de recombinación somática mediante el cual se unen segmentos de un gen formando un gen funcional de una cadena polipeptídica de una inmunoglobulina o de un receptor de célula T. (Figuras 25–35, 25–37 y 25–38)

recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueado (FRAP)
fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)
Técnica que permite seguir parámetros cinéticos de una proteína analizando de qué forma las moléculas fluorescentes de la proteína se desplazan hacia el interior de un área de la célula que ha sido blanqueada por un haz de luz láser.

reducción (reducir)
reduction (reduce)
Adición de electrones a un átomo, como ocurre cuando a una molécula biológica se le añade hidrógeno o se le elimina oxígeno. Lo opuesto a la oxidación. (Figura 2–43)

redundancia genética
genetic redundancy
Presencia de dos o más genes similares cuyas funciones están solapadas.

regeneración por intercalación
intercalary regeneration
Tipo de regeneración que rellena el tejido que se ha perdido cuando se injertan juntas las células de dos partes de una misma estructura que no se corresponden. (Figura 22–56)

región de control del gen
gene control region
Conjunto de secuencias de DNA que regulan la expresión de un gen determinado. Entre ellas se incluyen el promotor y las secuencias necesarias para iniciar la transcripción del gen y controlar la velocidad de iniciación. (Figuras 7–37 (procariotas) y 7–44 (eucariotas).)

región hipervariable
hypervariable region
Cualquiera de las tres pequeñas regiones contenidas en la región variable de una cadena ligera o de una cadena pesada de una inmunoglobulina o de un receptor de un linfocito T, que muestran la mayor variabilidad de una molécula a otra. Estas regiones determinan la especificidad del lugar de unión al antígeno. (Figura 25–31)

región señal
signal patch
Señal de clasificación de una proteína que consiste en una determinada disposición tridimensional de los átomos de la superficie de la proteína plegada. (Figura 13–45)

región variable
variable region
Región de la cadena ligera o pesada de una inmunoglobulina que es diferente de una molécula a otra, y que constituye el lugar de unión al antígeno. (Figuras 25–30 y 25–31)

registro de zona
patch-clamp recording
Técnica electrofisiológica en la cual la fina punta de un electrodo se sella sobre una zona de una membrana celular; de este modo es posible medir el

flujo de corriente a través de los canales iónicos individuales de la zona. (Figura 11–33)

regulador
regulative
De embriones o de partes de embriones: autoajuste, de forma que, aunque las condiciones iniciales se modifiquen, la estructura que resulta es normal.

regulador de la señalización de proteínas G (RGS)
regulator of G protein signaling (RGS)
Proteína GAP que se une a una proteína G trimérica y aumenta su actividad GTPasa, colaborando así a limitar la señalización mediada por la proteína G. (Figura 15–19)

regulador del crecimiento vegetal (hormona vegetal)
plant growth regulator (plant hormone)
Molécula señal que participa en la coordinación del crecimiento y el desarrollo. Como ejemplos pueden citarse el etileno, las auxinas, las giberelinas, las citoquininas, el ácido abscísico y los brasinoesteroides.

reloj circadiano (ritmo circadiano)
circadian clock (circadian rhythm)
Proceso cíclico interno que produce un determinado cambio en una célula u organismo con un periodo de unas 24 horas, por ejemplo el ciclo de sueño y vigilia en humanos.

reparación de apareamientos incorrectos
mismatch repair
Proceso de reparación del DNA que corrige los nucleótidos, introducidos durante la replicación del DNA, que se aparean erróneamente. Se elimina un pequeño fragmento del DNA recién sintetizado que incluye el nucleótido mal apareado y se reemplaza por la secuencia correcta que se sintetiza tomando como patrón la otra cadena. (Figura 5–20)

reparación de la escisión de bases
base excision repair
Vía de reparación del DNA mediante la cual una base individual es eliminada de una doble hélice de DNA y remplazada. *Compárese* con reparación por escisión de nucleótidos. (Figura 5–48)

reparación por escisión de nucleótidos
nucleotide excision repair
Tipo de reparación del DNA que corrige los daños producidos en la doble hélice del DNA, como los causados por alteraciones químicas o UV, cortando la región dañada de una cadena y resintetizándola utilizando como patrón la cadena no dañada. *Compárese* con reparación por escisión de bases. (Figura 5–48)

replicación de DNA
DNA replication
Proceso por el cual se genera una copia de una molécula de DNA.

represor (proteína represora de genes, represor transcripcional)
repressor (gene repressor protein, transcriptional repressor)
Proteína que se une específicamente a una región del DNA e impide la transcripción de un gen adyacente.

reproducción asexual
asexual reproduction
Cualquier tipo de reproducción (como la gemación en *Hydra*, la fisión binaria en bacterias o la división mitótica en microrganismos eucariotas) que no implique la mezcla de dos genomas diferentes. Da lugar a individuos genéticamente idénticos al progenitor.

resonancia de plasmón superficial
surface plasmon resonance (SPR)
Técnica utilizada para caracterizar interacciones moleculares, como la unión antígeno-anticuerpo, el acoplamiento entre un receptor y su ligando y la unión de proteínas al DNA. Las interacciones de unión se detectan siguiendo la reflexión de un haz de luz desde la interfase entre una solución acuosa de moléculas que potencialmente se pueden unir y una superficie de un biosensor que transporta la proteína "cebo" inmovilizada.

resonancia magnética nuclear – *véase* **NMR**
nuclear magnetic resonance

respiración
respiration
Término general que designa un proceso celular productor de energía, que conlleva la degradación oxidativa de azúcares o de otras moléculas orgánicas y que requiere la captación de O_2 mientras se producen CO_2 y H_2O como productos de degradación. (Figura 2–41)

respuesta a las proteínas mal plegadas
unfolded protein response
Respuesta celular que se pone en funcionamiento cuando se produce una acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático. Supone un incremento de la transcripción de las chaperonas del ER y de enzimas de degradación. (Figura 12–55)

respuesta inflamatoria
inflammatory response
Respuesta local de un tejido a una lesión o a una infección, caracterizada porque el tejido está enrojecido, hinchado, caliente y doloroso. Causada por la invasión de células sanguíneas de la serie blanca, que liberan varios mediadores locales como la histamina.

respuesta inmunitaria
immune response
Respuesta del sistema inmunitario que tiene lugar cuando una sustancia o un microorganismo extraños entran en el organismo; por lo general se refiere a la respuesta inmunitaria adquirida. *Véase también* respuesta inmunitaria innata, respuesta inmunitaria adquirida, respuesta inmunitaria primaria, respuesta inmunitaria secundaria.

respuesta inmunitaria adquirida
adaptive immune response
Respuesta del sistema inmunitario de los vertebrados a un antígeno determinado que de forma característica genera memoria inmunológica. (Figuras 25–1 y 25–2)

respuesta inmunitaria innata
innate immune response
Respuesta inmunitaria (tanto de animales como de plantas) a un patógeno en la que intervienen las defensas preexistentes en el organismo (el sistema inmunitario innato) que incluye las moléculas antimicrobianas y las células fagocíticas. Una respuesta de este tipo no es específica de patógeno, a diferencia de una respuesta inmunitaria adquirida.

respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T
T-cell mediated immune response
Respuesta inmunitaria adquirida mediada por linfocitos T específicos de antígeno.

respuesta inmunitaria primaria
primary immune response
Respuesta inmunitaria adquirida a un antígeno que tiene lugar en el primer encuentro con este antígeno. (Figura 25–10)

respuesta inmunitaria secundaria
secondary immune response
Respuesta inmunitaria adquirida a un antígeno que tiene lugar cuando se produce un segundo o posterior encuentro con un determinado antígeno. Esta respuesta es más fuerte, más específica y se inicia más rápidamente que la respuesta inmunitaria primaria. (Figura 25–10)

retículo endoplasmático (ER)
endoplasmic reticulum (ER)
Compartimiento laberíntico formado por sáculos, localizado en el citoplasma de las células eucariotas, donde se sintetizan lípidos, proteínas unidas a membrana y proteínas de secreción. (Figura 12–36)

retículo endoplasmático liso (ER liso)
smooth endoplasmic reticulum (smooth ER)
Región del retículo endoplasmático no asociada a ribosomas. Participa en la síntesis de lípidos. (Figura 12–36)

retículo endoplasmático rugoso (RER)
rough endoplasmic reticulum (rough ER)
Retículo endoplasmático con ribosomas en su superficie citosólica. Participa en la síntesis de proteínas de secreción y de proteínas asociadas a membrana.

retículo sarcoplasmático
sarcoplasmic reticulum
Tipo especializado de retículo endoplasmático liso localizado en el citoplasma de las fibras musculares, que contienen elevadas concentraciones de Ca^{2+} secuestrado, el cual es liberado al citosol durante la excitación del músculo. (Figura 16–77)

retroalimentación negativa
negative feedback
Mecanismo de control en el que el producto final de una reacción o de una vía inhibe una etapa inicial de esta misma vía.

retroalimentación positiva
positive feedback
Mecanismo de control en el que el producto final de una reacción o de una vía estimula su propia producción o activación.

retroinhibición
feedback inhibition
Tipo de proceso en el cual el producto de una reacción inhibe una reacción previa de la misma vía. (Figuras 3–56 y 3–57)

retrotransposón
retrotransposon
Tipo de elemento transponible cuyo desplazamiento consta de una primera etapa en la que se transcribe el elemento, produciéndose una copia de RNA que posteriormente es convertida de nuevo en DNA mediante la transcriptasa inversa e insertada (retrotranspuesta) en cualquier punto del genoma. Existen dos tipos: los retrotransposones retrovíricos y los retrotransposones no retrovíricos. (Tabla 5–3, p. 318)

retrotransposón no retrovírico – *véase* **retrotransposón**
nonretroviral retrotransposon

retrovirus
retrovirus
Virus con RNA que se replica en una célula sintetizando primero una doble cadena de DNA intermedia y después una molécula de DNA de doble cadena que se integra en el DNA celular. (Tabla 5–3, p. 318)

RGS - *véase* **regulador de la señalización de proteínas G**

Rho (familia de proteínas Rho)
Rho (Rho protein family)
Familia de GTPasas monoméricas perteneciente a la superfamilia de Ras, involucradas en la señalización de la reordenación del citoesqueleto. Incluye Rho, Rac y Cdc42. (Tabla 15–5, p. 926)

ribonucleasa
ribonuclease
Enzima que corta una molécula de RNA hidrolizando uno o más de sus enlaces fosfodiéster.

ribonucleoproteína nuclear pequeña (snRNP)
small nuclear ribonucleoprotein (snRNP)
Complejo de un snRNA y proteínas que forman parte de un espliceosoma. (Figura 6–29)

ribosa
ribose
El monosacárido de cinco carbonos, componente del RNA: $C_5H_{10}O_5$. *Compárese* con desoxirribosa.

ribosoma
ribosome
Partícula compuesta de moléculas de rRNA y de proteínas ribosómicas, que cataliza la síntesis de proteínas utilizando la información proporcionada por los mRNA.

ribosoma libre
free ribosome
Ribosoma que se encuentra libre en el citosol sin estar unido a ninguna membrana.

ribosoma unido a membrana
membrane-bound ribosome
Ribosoma unido a la cara citosólica del retículo endoplasmático rugoso. Es el lugar de síntesis de las proteínas que entran en el retículo endoplasmático. (Figura 12–41)

ribozima
ribozyme
RNA con actividad catalítica.

RNA (ácido ribonucleico)
RNA (ribonucleic acid)
Polímero formado a partir de monómeros de ribonucleótidos unidos covalentemente entre sí. *Véase también* RNA mensajero, RNA ribosómico, RNA de transferencia. (Tabla 6–1, p. 336 y Panel 2–6, pp. 116-117.)

RNA antisentido
antisense RNA
RNA complementario de un transcrito de RNA de un gen determinado. Puede hibridarse con el RNA determinado y bloquear su función.

RNA de interferencia (RNAi)
RNA interference (RNAi)
Como se describió originalmente, mecanismo por el cual un RNA de doble cadena, introducido de manera experimental, induce la destrucción específica de secuencias de mRNA complementarios. El mecanismo, que está conservado en gran medida en los eucariotas, se produce mediante la acción de cortas moléculas de RNA de interferencia (siRNA: *small interfering*) de doble cadena producidos por el fraccionamiento endonucleolítico. A menudo el término RNAi se utiliza de forma general incluyendo también la inhibición de la expresión génica por microRNA (miRNA), que están codificados en el propio genoma de las células. El RNA de interferencia se utiliza ampliamente en experimentación para estudiar los efectos de la inactivación de determinados genes. (Figura 7–115)

RNA de interferencia pequeño (siRNA)
small interfering RNA (siRNA)
Pequeño (de 21 a 26 nucleótidos) RNA de doble cadena que inhibe la expresión de genes destruyendo de forma directa los mRNA complementarios. La producción de siRNA se inicia por RNA de doble cadena exógenos introducidos en la célula. (Figura 7–115)

RNA de transferencia (tRNA)
transfer RNA (tRNA)
Conjunto de pequeñas moléculas de RNA utilizadas en la síntesis de proteínas como elementos de interacción (adaptadores) entre el mRNA y los aminoácidos. Cada tipo de molécula de tRNA está unida de forma covalente a un aminoácido determinado. (Figuras 1–9 y 6–52)

RNA mensajero (mRNA)
messenger RNA (mRNA)
Molécula de RNA que determina la secuencia de aminoácidos de una proteína. En los eucariotas se produce por el procesamiento de una molécula de RNA por la RNA polimerasa como una copia complementaria de un fragmento de DNA. Es traducida a proteína a través de un proceso catalizado por ribosomas. (Figuras 6–21 y 6–22)

RNA nuclear pequeño (snRNA)
small nuclear RNA (snRNA)
Moléculas pequeñas de RNA que forman complejos con proteínas, constituyendo las partículas ribonucleoproteicas (snRNP) que están implicadas en el ayuste del RNA. (Figuras 6–29 y 6–30)

RNA nucleolar pequeño (snoRNA)
small nucleolar RNA (snoRNA)
Pequeños RNA presentes en el nucléolo, que tienen varias funciones, como guiar las modificaciones de los precursores de los rRNA. (Tabla 6–1, p. 336 y Figura 6–43)

RNA polimerasa
RNA polymerase
Enzima que cataliza la síntesis de una molécula de RNA sobre un patrón de DNA, a partir de precursores nucleósido trifosfato. (Figura 6–8)

RNA ribosómico (rRNA)
ribosomal RNA (rRNA)
Cualquiera de las moléculas específicas de RNA que forman parte de la estructura de un ribosoma y que participan en la síntesis de proteínas. A menudo se diferencian por su coeficiente de sedimentación (como rRNA 28S o rRNA 5S).

rodopsina
rhodopsin
Proteína de la familia GPCR que atraviesa siete veces la membrana y que actúa como sensor de luz en las células fotorreceptoras en forma de bastón de la retina de los vertebrados. Contiene el grupo prostético retinol. Sensible a la luz. (Figura 15–49)

rRNA – *véase* **RNA ribosómico**

RTK – *véase* **receptor tirosina quinasa**

RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa)
RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)
Técnica mediante la cual una población de moléculas de mRNA se convierten en cDNA por transcripción inversa, y estos cDNA se amplifican por PCR.

S – *véase* **fase S**

S. cerevisiae – *véase* ***Saccharomyces***

S. pombe – *véase* ***Schizosaccharomyces***

sacárido
saccharide
Azúcar.

sacarosa
sucrose
Disacárido compuesto por una unidad de glucosa y una de fructosa. Es la principal forma de transporte de glucosa entre las células vegetales. (Panel 2–4, pp. 112-113)

Saccharomyces
Género de levaduras que se reproducen asexualmente por gemación o sexualmente por conjugación. Económicamente son importantes en cervecería y panadería. *Saccharomyces cerevisiae* se utiliza ampliamente y como organismo modelo sencillo en el estudio de la biología celular de los eucariotas. *Véase también Schizosaccharomyces.*

sarcoma
sarcoma
Cáncer del tejido conjuntivo.

sarcómero
sarcomere
Unidad repetitiva de una miofibrilla en una fibra muscular, compuesta de un conjunto de filamentos gruesos (miosina) y finos (actina) superpuestos entre dos discos Z adyacentes. (Figura 16–74)

S-Cdk
S-Cdk
Complejo ciclina-Cdk que se forma en las células de vertebrado y que está constituido por una ciclina S y por la correspondiente quinasa dependiente de ciclina (Cdk). (Figura 17–16 y Tabla 17–1, p. 1063)

SCF (proteína SCF)
SCF (SCF protein)
Familia de ubiquitina ligasas formadas como un complejo de varias proteínas. Una de ellas participa en la regulación del ciclo celular eucariota y dirige la destrucción de inhibidores de las S-Cdk al final de G_1, estimulando la activación de las Cdk y la replicación del DNA. (Figuras 3–79 y 17–20)

Schizosaccharomyces
Género de levadura en forma de bastón, que se reproduce por fisión binaria. *S. pombe*, junto con la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*, es un organismo modelo utilizado en muchos tipos de estudios diferentes.

secuencia consenso
consensus sequence
Forma más típica o promedio de una secuencia que se reproduce con pequeñas variaciones en un grupo de moléculas de DNA, de RNA o de proteínas, relacionadas entre sí. La secuencia consenso muestra el nucleótido o aminoácido encontrado con más frecuencia en cada posición. La conservación de una secuencia consenso implica que se trata de una secuencia funcionalmente importante. (Figura 6–12)

secuencia homeobox
homeobox
Corta secuencia de DNA (180 pares de bases de longitud), muy conservada, que codifica un motivo proteico de unión a DNA (homeodominio) famoso

por estar presente en los genes que participan en la orquestación del desarrollo de un amplio abanico de organismos.

secuencia palindrómica
palindromic sequence
Secuencia de nucleótidos que es idéntica a su cadena complementaria cuando cada una de ellas es leída en el mismo sentido químico, por ejemplo, GATC. (Figura 8–31)

secuencia reguladora
regulatory sequence
Secuencia de DNA a la cual se une una proteína reguladora de gen para controlar la frecuencia con la que el complejo transcripcional se ensambla sobre el promotor. (Figura 7–44)

secuencia replicativa autónoma (ARS)
autonomously replicating sequence (ARS)
Origen de replicación del DNA en levaduras.

secuencia RGD
RGD sequence
Secuencia de los tres péptidos arginina-glicina-ácido aspártico que forma un lugar de unión para las integrinas; está presente en la fibronectina y en otras proteínas extracelulares (Figura 19–72C)

secuencia señal
signal sequence
Pequeña secuencia continua de aminoácidos que determina la localización final de una proteína en la célula. Un ejemplo lo constituye la secuencia N-terminal de 20 aminoácidos que dirige las proteínas nacientes de secreción o transmembrana hacia el retículo endoplasmático. (Tabla 12–3, p. 702)

secuencia señal del ER
ER signal sequence
Secuencia señal N-terminal que conduce a las proteínas a entrar en el retículo endoplasmático (ER). Después de esta entrada, la secuencia es escindida mediante una peptidasa señal.

secuenciación
sequencing
Determinación del orden de los nucleótidos o de los aminoácidos de una molécula de ácido nucleico o de proteína. (Figura 8–50)

securina
securin
Proteína que se une a la proteasa separasa e impide la rotura de las uniones proteicas que unen las cromátidas hermanas al inicio de la mitosis. La securina es destruida en la transición de la metafase a la anafase. (Figura 17–44)

segmentación
cleavage
(1) División física de una célula en dos. (2) Tipo especializado de división celular observado en muchos embriones tempranos mediante la cual una célula de gran tamaño se divide en muchas células pequeñas sin que haya habido crecimiento.

segmento génico V
V gene segment
Segmento génico que codifica la mayor parte de la región variable de las cadenas polipeptídicas de las inmunoglobulinas y de los receptores de las células T.

segundo mensajero (mediador intracelular pequeño)
second messenger (small intracelular mediator)
Pequeña molécula señalizadora intracelular que se libera o se forma en el citosol en respuesta a una señal extracelular y que participa en la transmisión de la señal al interior de la célula. Como ejemplos, el AMP cíclico, el GMP cíclico, el IP_3, el Ca^{2+} y el diacilglicerol. (Figura 15–17)

selección purificadora
purifying selection
Selección natural que actúa retardando la divergencia de genes en una población durante el curso de la evolución, mediante la eliminación de los individuos que transportan mutaciones deletéreas.

selectina
selectin
Una de las proteínas de la superficie celular, que se unen a carbohidratos y que median las adhesiones célula-célula dependientes de Ca^{2+} que se dan transitoriamente en el torrente sanguíneo entre las células sanguíneas de la serie blanca y el endotelio de los vasos sanguíneos. (Figura 19–19)

semilla
seed
En vegetales, la estructura que contiene el embrión aletargado junto con una reserva de alimento dentro de una cubierta protectora. (Panel 22–1, p. 1401)

senescencia
senescence
Envejecimiento de un organismo.

senescencia celular replicativa
replicative cell senescence
Fenómeno que se observa en los cultivos celulares primarios en los que la proliferación disminuye y finalmente se para de forma irreversible. *Véase también* senescencia.

señal de clasificación
sorting signal
Secuencia de aminoácidos que dirige el destino de una proteína hacia una localización específica, como un compartimiento intracelular determinado.

señal de exportación nuclear
nuclear export signal
Señal de clasificación presente en la estructura de moléculas y complejos, como el RNA y las nuevas subunidades ribosómicas, que son transportadas desde el núcleo hasta el citosol a través de los complejos de poro nucleares. (Figuras 12–15)

señal de inicio de transferencia
start-transfer signal
Secuencia corta de aminoácidos que permite que una cadena polipeptídica empiece a ser translocada a través de la membrana del retículo endoplasmático mediante un translocador proteico. Las proteínas transmembrana de multipaso tienen tanto la secuencia N-terminal (secuencia señal) como señales de inicio de transferencia internas. (Figuras 12–45 y 12–48)

señal de localización nuclear (NLS)
nuclear localization signal (NLS)
Secuencias señal o regiones señal que se encuentran en las proteínas destinadas al núcleo y que permiten su transporte selectivo desde el citosol hasta el núcleo a través de los complejos de poro nuclear. (Figuras 12–11 y 12–15)

señal de paro de transferencia
stop-transfer signal
Secuencia hidrófoba de aminoácidos que detiene la translocación de una cadena polipeptídica a través de la membrana del retículo endoplasmático anclando así la cadena proteica a la membrana. (Figuras 12–48 y 12–49)

señal de retención en el ER
ER retention signal
Pequeña secuencia de aminoácidos de una proteína que evita que ésta salga del retículo endoplasmático (ER). Se encuentra en proteínas residentes del ER.

señalización autocrina
autocrine signaling
Cuando una célula segrega moléculas señal que actúan sobre la propia célula.

señalización celular
cell signaling
Proceso por el cual las células son estimuladas o inhibidas por señales extracelulares producidas por otras células.

señalización endocrina
endocrine signaling
Señalización mediante hormonas liberadas por las glándulas endocrinas a la circulación sanguínea y transportadas hasta células diana lejanas. Estas células tienen receptores que unen a la hormona específica. (Figuras 15–4 y 15–5)

señalización paracrina
paracrine signalling
Comunicación célula-célula, con un radio de acción corto, que está mediada por moléculas señal segregadas que actúan sobre las células adyacentes. (Figura 15–4)

separasa
separase
Proteasa que rompe las uniones proteicas de cohesina que mantienen unidas a las cromátidas hermanas. Actúa durante la anafase, permitiendo la separación y la segregación de las cromátidas. (Figura 17–44)

serina proteasa
serine protease
Tipo de proteasa que tiene una serina reactiva en el centro activo. (Figuras 3–12 y 3–38)

serina/treonina quinasa
serine/threonine kinase
Enzima que fosforila específicamente proteínas en serinas o treoninas. (Figura 15–70)

simbiosis
symbiosis
Una simbiosis es la asociación íntima entre dos organismos de especies diferentes, de la cual ambos obtienen a largo plazo una ventaja selectiva. (Figura 1–16)

simportador
symporter
Proteína que transporta dos tipos de soluto a través de una membrana en el mismo sentido. (Figura 11–8)

sinapsis
synapse
Unión comunicante célula-célula que permite el paso de señales desde una fibra nerviosa a otra célula. En una sinapsis química, la señal es transportada por un neurotransmisor difusible. (Figura 19–22.) En una sinapsis eléctrica, se produce una conexión directa entre el citoplasma de ambas células a través de uniones de tipo gap. (Figura 19–34)

sinapsis
synapsis
(1) En la recombinación genética, formación inicial de pares de bases entre cadenas de DNA complementarias de diferentes moléculas de DNA, que tiene lugar en los puntos de entrecruzamiento entre cromosomas. (Figura 5–56) (2) En la meiosis, la formación de un complejo sinaptonémico entre dos cromosomas homólogos íntimamente alineados. (Figura 21–9.)

sincitio
syncytium
Masa de citoplasma que contiene muchos núcleos, rodeada por una sola membrana plasmática. Habitualmente es el resultado de la fusión de células o de una serie de ciclos de división incompletos en los que los núcleos se dividen pero la célula no.

sintenia
synteny
Presencia, en diferentes especies, de regiones cromosómicas que contienen los mismos genes y en el mismo orden.

siRNA – *véase* **RNA de interferencia pequeño**

sistema de control del ciclo celular
cell-cycle control system
Entramado de proteínas reguladoras que dirige la progresión de una célula eucariota a lo largo del ciclo celular.

sistema de doble híbrido en levadura
yeast two-hybrid system
Técnica de genética molecular que permite identificar interacciones proteína-proteína y proteína-DNA. (Figura 8–24)

sistema de secreción de tipo III
type III secretion system
Sistema bacteriano que permite liberar proteínas tóxicas en el interior de las células del huésped. (Figura 24–8)

sistema del complemento
complement system
Sistema de proteínas séricas activado por complejos antígeno-anticuerpo o por microorganismos. Colabora en la eliminación de microorganismos patógenos causando directamente su lisis o facilitando su fagocitosis.

sistema inmunitario
immune system
Sistema de linfocitos y de otras células del cuerpo que proporcionan defensa contra una infección. En los vertebrados existen dos tipos de sistemas inmunitarios: el innato y el adquirido.

sistema libre de células
cell-free system
Homogenado celular fraccionado que conserva una determinada función biológica de la célula intacta, y en el que se pueden estudiar más fácilmente las reacciones bioquímicas y los procesos celulares.

sitio interno de entrada de los ribosomas (IRES)
internal ribosome entry site (IRES)
Sitio específico de un mRNA eucariota diferente del extremo 5', en el que puede iniciarse la traducción. (Figura 7–108)

SNARE
SNARE
Miembro de una gran familia de proteínas transmembrana que están presentes en la membrana de los orgánulos y en las vesículas que se derivan de ellos. Catalizan la mayoría de sucesos de fusión de membrana que se producen en las células. Se presentan por parejas: una v-SNARE situada en la membrana de una vesícula se une específicamente con una t-SNARE complementaria situada en la membrana diana (target).

SNP – *véase* **polimorfismo de un único nucleótido**

snRNA – *véase* **RNA nuclear pequeño**

sobreenrollada
coiled-coil
Estructura proteica cilíndrica, especialmente estable, formada por dos hélices α enrolladas una alrededor de la otra. (Figura 3–9)

soluto
solute
Cualquier molécula que está disuelta en un líquido. Al líquido se le denomina disolvente o solvente.

somita
somite
Miembro de una serie de pares de bloques de mesodermo, que se forman muy precozmente durante el desarrollo embrionario y se hallan a ambos lados de la notocorda de un embrión de vertebrado. Dan lugar a segmentos del eje corporal incluyendo las vértebras, los músculos y el tejido conjuntivo asociado. (Figura 22–81)

sonda
probe
Fragmento definido de RNA o de DNA, marcado de forma radiactiva o química, utilizado para localizar determinadas secuencias de ácidos nucleicos mediante hibridación.

Src (familia de proteínas Src)
Src (Src protein family)
Familia de tirosinas quinasa citoplasmáticas (se pronuncia "sarc") que se asocian a los dominios citoplasmáticos de algunos receptores asociados a enzima que carecen de actividad tirosina quinasa propia (p. ej., el receptor de antígeno de una célula T). Estas quinasas transmiten una señal mediante la fosforilación del propio receptor y de otras proteínas de señalización. (Figuras 3–10 y 15–70)

SRP – *véase* **partícula de reconocimiento de la señal**

STAT (transductor de señal y activador de la transcripción)
STAT (signal transducer and activator of transcription)
Proteína reguladora de genes latente que es activada por fosforilación por JAK quinasas y entra en el núcleo en respuesta a señales procedentes de los receptores de la familia de receptores de citoquinas. (Figura 15–68)

subunidad proteica
protein subunit
Cadena proteica individual de una proteína compuesta por más de una cadena.

sulfhidrilo (tiol, –SH)
sulfhydryl (thiol, –SH)
Grupo químico que contiene azufre e hidrógeno; se halla en el aminoácido cisteína y en otras moléculas. Dos grupos sulfhidrilo pueden unirse entre sí formando un enlace disulfuro. (Panel 2–1, pp. 106-107 y Figura 3–28)

superfamilia de las Ig
Ig superfamily
Gran y diversa familia de proteínas que contienen dominios de inmunoglobulina o dominios semejantes a inmunoglobulina. La mayoría de ellas están implicadas en interacciones célula-célula o en el reconocimiento de antígenos. (Figura 25–74)

superfamilia de receptores nucleares
nuclear receptor superfamily
Receptores intracelulares de moléculas señal hidrófobas, como los esteroides y el ácido retinoico. El complejo ligando-receptor actúa como factor de transcripción en el núcleo. (Figura 15–14)

superfamilia Ras
Ras superfamily
Gran superfamilia de GTPasas monoméricas (también llamadas proteínas pequeñas de unión a GTP) de las cuales Ras es el miembro prototípico. (Tabla 15–5, p. 926)

superfamilia TGF-β (superfamilia del factor de crecimiento transformante β)
TGF-β superfamily (transforming growth factor-β-superfamily)
Gran familia de proteínas relacionadas estructuralmente que actúan como hormonas y mediadores locales controlando un amplio rango de funciones en los animales, incluso durante el desarrollo. Incluye las subfamilias TGF-β/activina y proteína morfogénica del hueso (BMP: ***bone morphogenic protein***). (Figura 15–69)

sustrato
substrate, substratum
(1) Molécula sobre la que actúa una enzima. (2) Superficie sólida a la que se adhiere una célula.

tap-tagging (purificación por afinidad en tándem al etiquetado)
tap-tagging (tandem affinity purification tagging)
Método muy eficiente para purificar proteínas, basado en la construcción de una proteína de fusión en la que la proteína de interés se une a dos dominios proteicos en tándem que actúan como etiquetas para la purificación por cromatografía de afinidad. Si se realizan dos rondas de purificación por afinidad, utilizando primero una etiqueta y después la otra, se obtiene una preparación muy pura.

tecnología del DNA recombinante – *véase* **ingeniería genética**
recombinant DNA technology

tejido conjuntivo
connective tissue
Cualquier tejido de soporte que se halla situado entre otros tejidos y que está formado por células englobadas en una cantidad de matriz extracelular relativamente abundante. Entre ellos se encuentran el hueso, el cartílago y el tejido conjuntivo laxo.

telofase
telophase
Estadio final de la mitosis en el que los dos juegos de cromosomas, ya separados, se descondensan y empiezan a quedar delimitados por la envoltura nuclear. (Panel 17–1, pp. 1072-1073)

telomerasa
telomerase
Enzima que alarga las secuencias teloméricas del DNA, que se hallan en los extremos de los cromosomas eucariotas.

telómero
telomere
Final de un cromosoma, asociado a una secuencia característica de DNA que se replica de una forma especial. Contrarresta la tendencia del cromosoma a acortarse en cada ronda de replicación. Del griego *telos*, final.

teoría de la selección clonal
clonal selection theory
Teoría que explica cómo el sistema inmunitario adquirido puede responder a millones de antígenos distintos de forma altamente específica. A partir de una población de linfocitos con un enorme repertorio de especificidades antigénicas generadas al azar, un determinado antígeno activa (selecciona) sólo aquellos clones de linfocitos que expresan un receptor que se une al antígeno. (Figura 25–8)

terminador
terminator
En el DNA bacteriano, señal que detiene la transcripción.

tilacoide
thylakoid
Vesícula aplanada que se halla en un cloroplasto, que contiene clorofila y otros pigmentos, y en la que se llevan a cabo las reacciones de captación de la luz de la fotosíntesis. Los tilacoides apilados forman los grana de los cloroplastos. (Figura 14–35 y 14–36)

tiol – *véase* **sulfhidrilo**
thiol

tipo salvaje (o silvestre)
wild type
Forma normal, no mutada, de un organismo; la forma en la que se encuentra en la naturaleza (en estado salvaje).

tirosina quinasa
tyrosine kinase
Enzima que fosforila proteínas específicas sobre tirosinas. *Véase también* tirosina quinasa citoplasmática. (Figura 15–70)

tirosina quinasa citoplasmática
cytoplasmic tyrosine kinase
Enzimas activadas por ciertos receptores de superficie celular (receptores asociados con tirosina quinasas) que transmiten la señal hacia el interior de la célula fosforilando proteínas diana citoplasmáticas sobre cadenas laterales de tirosina.

tomografía electromicroscópica (tomografía EM)
electro-microscope tomography (EM tomography)
Técnica que permite visualizar muestras en tres dimensiones en el microscopio electrónico, mediante la cual se toman muchas imágenes desde diferentes direcciones ladeando ligeramente la muestra. Las diferentes imágenes se combinan con la ayuda de un ordenador obteniendo una imagen tridimensional.

topoisomerasa (DNA topoisomerasa)
topoisomerase (DNA topoisomerase)
Enzima que se une al DNA y corta de forma reversible enlaces fosfodiéster en una de las dos cadenas. La topoisomerasa I genera roturas transitorias de una sola cadena, permitiendo que la doble hélice se desenrolle, eliminando tensión superhelicoidal. La topoisomerasa II genera roturas transitorias de ambas cadenas y permite que una doble hélice pase a través de otra y desenrede los enrollamientos excesivos. (Figuras 5–22 y 5–23)

totipotente
totipotent
Describe una célula que da lugar a todos los tipos celulares de un organismo.

traducción (traducción del RNA)
translation (RNA translation)
Proceso mediante el cual la secuencia de nucleótidos de una molécula de mRNA dirige la incorporación de aminoácidos a una proteína. Este proceso tiene lugar en un ribosoma. (Figuras 6–66 y 6–67)

trans
trans
Situado en el otro lado (lejano).

transcitosis
transcytosis
Proceso que comprende la captación de material en una cara de la célula mediante endocitosis, la transferencia de este material a través de la célula en vesículas y finalmente su liberación en otra cara mediante exocitosis. (Figura 13–60)

transcripción (transcripción del DNA)
transcription (DNA transcription)
Copiado de una hebra de DNA a una secuencia complementaria de RNA, mediante la enzima RNA polimerasa. (Figura 6–21)

transcripción inversa (o reversa)
reverse transcription
Transcripción de RNA a DNA. Este sentido es el opuesto al que prescribe el dogma central, ya que asegura que el DNA se transcribe a RNA y el RNA se traduce a proteína.

transcriptasa inversa (o reversa)
reverse transcriptase
Enzima que se descubrió en los retrovirus y que sintetiza una copia de doble cadena de DNA a partir de una molécula patrón de RNA de cadena sencilla.

transcrito
transcript
RNA resultante de la transcripción de un DNA. (Figura 6–21)

transcrito primario (transcrito primario de RNA)
primary transcript (primary RNA transcript)
Transcrito acabado de sintetizar, antes de que sufra la maduración por corte y empalme u otras modificaciones. (Figura 6–21)

transducción de señal
signal transduction
Conversión de una señal de una forma física o química en otra (p. ej. la conversión de luz en una señal química o de una señal extracelular en una intracelular).

transfección
transfection
Introducción de una molécula de DNA ajena en una célula eucariota. Habitualmente va seguida de la expresión de uno o más genes del DNA que se acaba de introducir.

transferencia (análisis inmunológico)
blotting
Técnica bioquímica en la que unas macromoléculas separadas sobre un gel de agarosa o de poliacrilamida son transferidas a una membrana sintética quedando así inmovilizadas para posteriores análisis. [*Véase* análisis de tipo Northern, análisis de tipo Southern o análisis de tipo Western.] (Figura 8–38)

transferencia de energía fluorescente por resonancia (FRET)
fluorescent resonance energy transfer (FRET)
Técnica para hacer un seguimiento en las células de la proximidad (y por consiguiente de la interacción) entre dos moléculas marcadas con un colorante fluorescente. (Figura 8–26)

transferencia fotosintética de electrones
photosynthetic electron-transfer
Reacciones de la fotosíntesis impulsadas por la luz, en las cuales los electrones se desplazan a lo largo de una cadena transportadora de electrones, generando ATP y NADPH. (Figura 14–38)

transformación
transformation
Inserción de un nuevo DNA (p. ej., un plásmido) en una célula o en un organismo, como en una *E. coli* competente. (2) Conversión de una célula normal en otra que se parece en muchos aspectos a una célula cancerosa (p. ej., proliferación desregulada, crecimiento en cultivo independiente de adhesión, etc.)

transformación celular – *véase* **transformación**
cell transformation

transición metafase-anafase
metaphase-to-anaphase transition
Punto de control del ciclo celular eucariota que precede a la separación de las cromátidas hermanas en la anafase. Si la célula no está preparada para proceder a la anafase, el ciclo celular se detiene en este punto de control. (Figura 17–14 y Panel 17–1, pp. 1072-1073)

translocación
translocation
(1) Tipo de mutación en la cual se escinde una porción de un cromosoma y se une a otro cromosoma. (Panel 8–1, pp. 554-555, y Figura 20–50).(2) Proceso de transferencia de una proteína a través de una membrana.

translocador proteico
protein translocator
Proteína unida a membrana que dirige el transporte de otra proteína a través de una membrana. (Figura 12–23)

transmaduración (transayuste)
trans-splicing
Tipo de maduración del RNA que presentan algunos organismos eucariotas en el que se unen entre sí exones de dos moléculas de RNA distintas formando un solo mRNA. (Figura 6–34)

transportador (proteína transportadora, permeasa)
transporter (carrier protein, permease)
Proteína de membrana que se une a un soluto y lo transporta a través de la membrana, sufriendo una serie de cambios conformacionales. Los transportadores pueden transportar iones o moléculas de forma pasiva, a favor de gradiente electroquímico, o pueden vincular los cambios de conformación a una fuente de energía metabólica, como la hidrólisis de ATP, para impulsar el transporte activo. *Véase también* proteína de transporte de membrana (Figura 11–3)

transportador activado
activated carrier
Molécula pequeña y difusible que, en la célula, almacena energía fácilmente intercambiable, en forma de uno o más enlaces covalentes ricos en energía. Como ejemplos, pueden mencionarse el ATP, el acetil CoA, el $FADH_2$, el NADH y el NADPH. (Figura 2–55)

transportador de electrones
electron carrier
Molécula, como el citocromo *c*, el NADH, el NADPH y el $FADH_2$ que transportan electrones y los transfieren desde una molécula dadora a otra aceptora de electrones. *Véase también* cadena de transporte de electrones y la Figura 2–60.

transporte activo
active transport
Desplazamiento de una molécula a través de una membrana o de otra barrera, impulsado por una forma de energía diferente de la almacenada en el gradiente electroquímico de la molécula transportada.

transporte axónico
axonal transport
Transporte dirigido de orgánulos y moléculas a lo largo de un axón de una célula nerviosa. Puede ser anterógrado (desde el cuerpo celular) o retrógrado (hacia el cuerpo celular).

transporte de membrana
membrane transport
Desplazamiento de moléculas a través de una membrana, mediado por una proteína de transporte de membrana. (Figuras 11–4 y 11–4)

transporte pasivo (difusión facilitada)
passive transport (facilitated diffusion)
Transporte de un soluto a través de una membrana a favor de su gradiente de concentración o de su gradiente electroquímico, utilizando únicamente la energía almacenada en el gradiente. (Figura 11–4)

transporte transcelular
transcellular transport
Transporte de solutos, como los nutrientes, a través de un epitelio, mediado por las proteínas de transporte a través de membrana que hay en las superficies apical y basal de las células epiteliales. (Figura 11–11)

transporte vesicular
vesicular transport
Transporte de proteínas, de un compartimiento celular a otro, mediante intermediarios rodeados de membrana, como vesículas o fragmentos de orgánulos.

transposasa
transposase
Enzima que puede cortar una secuencia transposón de un cromosoma, provocando que dicha secuencia se inserte en un nuevo lugar diana. Por lo general, las transposasas están codificadas por los transposones. (Figura 5–69)

transposición (recombinación transposicional)
transposition (transpositional recombination)
Desplazamiento de una secuencia de DNA de un lugar del genoma a otro. (Tabla 5–3, p. 318)

transposición por corte e inserción
cut-and-paste transposition
Tipo de desplazamiento de un elemento transponible en el que este elemento es escindido del DNA e insertado en un nuevo lugar mediante una transposasa especial. (Figura 5–69)

transposón – *véase* **elemento transponible**
transposon

transposón sólo de DNA
DNA-only transposon
Elemento transponible que existe como DNA a lo largo de todo su ciclo de vida. Muchos de ellos se desplazan mediante transposición por corte e inserción. *Véase también* elemento transposible.

trasplante nuclear
nuclear transplantation
Transferencia de un núcleo de una célula a otra mediante microinyección. (Figura 8-6)

triacilglicerol (triglicérido)
triacylglycerol (triglyceride)
Molécula formada por tres ácidos grasos esterificados con un glicerol. Es el principal constituyente de las gotas lipídicas de los tejidos animales (con ácidos grasos saturados) y de los aceites vegetales (mayoría de ácidos grasos insaturados). (Panel 2–5, pp. 114-115)

tRNA – *véase* **RNA de transferencia**

tRNA iniciador
initiator tRNA
tRNA especial que inicia la traducción. Siempre transporta el aminoácido metionina, formando el complejo Met-tRNAi. (Figura 6–72)

t-SNARE – *véase* **SNARE**

tubo neural
neural tube
Tubo del ectodermo que formará el cerebro y la médula espinal en un embrión de vertebrado. (Figura 22–78)

tumor
tumor
Masa anormal de células producto de un defecto del control de la proliferación celular. Un tumor puede ser no invasivo (benigno) o invasivo (canceroso o maligno). (Figura 20–3)

tumor primario
primary tumor
Tumor situado en el lugar en el que ha aparecido el cáncer. Los tumores secundarios se desarrollan en otros lugares mediante metástasis.

ubiquitina
ubiquitin
Proteína pequeña y altamente conservada de las células eucariotas, que se une de forma covalente a las lisinas de otras proteínas. La unión de una cadena corta de ubiquitinas a una de estas lisinas puede marcar a la proteína para degradarla por proteolisis intracelular en un proteosoma. (Figura 6–92)

ubiquitina ligasa
ubiquitin ligase
Miembro de un grupo de enzimas que unen ubiquitina a una proteína, a menudo marcándola para que sea destruida en un proteosoma. El proceso que cataliza una ubiquitina ligasa se denomina ubiquitinación. (Figura 3–79)

unión adherente
adherens junction
Unión intercelular en la que la cara citoplasmática de la membrana plasmática está unida a filamentos de actina. Como ejemplos, las bandas de adhesión que unen entre sí células epiteliales adyacentes.

unión de anclaje
anchoring junction
Tipo de unión celular que ancla las células a sus vecinas o a la matriz extracelular. (Figura 19–2 y Tabla 19–1, p. 1133)

unión de Holliday (intercambio cruzado de cadenas)
Holliday junction (cross-strand exchange)
Estructura en forma de X que se puede observar en un DNA que está sufriendo un proceso de recombinación, en la que las dos moléculas de DNA se mantienen unidas en el punto de entrecruzamiento. También se denomina intercambio cruzado de cadenas. (Figura 5–61)

unión de tipo gap
gap junction
Canal de comunicación entre dos células, presente en la mayoría de tejidos epiteliales animales, que permite que iones y pequeñas moléculas pasen del citoplasma de una de ellas al de la otra.

unión estrecha
tight junction
Unión célula-célula que sella entre sí células epiteliales adyacentes, impidiendo que la mayoría de moléculas disueltas pasen de un lado de la lámina epitelial al otro. (Figuras 19–3 y 19–26)

unión formadora de canal o unión de tipo gap
channel forming junction
Unión célula-célula que pone en contacto los citoplasmas de células adyacentes y constituye un lugar de paso de una célula a otra a pequeñas moléculas e iones. En tejidos animales, está compuesto por proteínas conexinas o inexinas. En vegetales, una función similar a ésta la realizan los plasmodesmos. (Figura 19–2 y Tabla 19–1, p. 1133)

unión heterofílica
heterophilic binding
Unión entre moléculas de diferente tipo, especialmente entre las que participan en la adhesión célula-célula. (Figura 19–8)

unión homofílica
homophilic binding
Unión entre moléculas del mismo tipo, especialmente las que participan en la adhesión célula-célula. (Figura 19–8)

unión neuromuscular
neuromuscular junction
Sinapsis química especializada entre un terminal del axón de una neurona motora y una célula del músculo esquelético. (Figura 11–39)

unión oclusiva
occluding junction
Tipo de unión celular entre células epiteliales que hace que un epitelio quede sellado, formando una barrera a través de la cual no pueden pasar ni las moléculas pequeñas; el resultado es una lámina de células impermeable (o permeable selectivamente). (Figura 19–2 y Tabla 19–1, p.1133)

unión septada
septate junction
En invertebrados, principal tipo de unión celular estanca; su estructura es distinta a la de las uniones estrechas de los vertebrados. (Figura 19–28)

unión transmisora de señal
signal-relaying junction
Tipo complejo de unión célula-célula que permite que las señales sean transmitidas de una célula a otra a través de zonas de contacto de sus membranas plasmáticas. Incluye proteínas de anclaje y proteínas que median la transducción de la señal (Figura 19–2 y Tabla 19–1, p. 1133)

uniportador
uniporter
Proteína que transporta un soluto de un lado a otro de la membrana. (Figura 11–8)

UTR (región no traducida)
UTR (untranslated región)
Región no codificante de una molécula de mRNA. El UTR 3´ se extiende desde el codón de STOP que termina la síntesis de la proteína, hasta el inicio de la cola poli A. (Figura 7–105) El UTR 5´ se extiende desde la caperuza 5´ hasta el codón que inicia la síntesis de la proteína.

vacuola
vacuole
Vesícula muy grande y llena de líquido que se encuentra en la mayoría de células de los vegetales y de los hongos. Habitualmente ocupa más de una tercera parte del volumen celular. (Figura 13–39)

vaina de mielina
myelin sheath
Capa aislante de la membrana celular especializada que envuelve los axones de muchas neuronas de vertebrados. Producida por oligodendrocitos del sistema nervioso central y por las células de Schwann del sistema nervioso periférico. (Figura 11–32)

valencia
valence
Número de electrones que puede ganar o perder un átomo (tanto compartiéndolos como por transferencia) para llenar su orbital externo. La valencia de un átomo es igual al número de enlaces sencillos que puede formar este átomo.

variación antigénica
antigenic variation
Capacidad de cambiar los antígenos expuestos en la superficie celular; se trata de una propiedad de algunos microorganismos patógenos que les permite evadir el ataque del sistema inmune.

variación de energía libre (ΔG)
free-energy change (ΔG)
Cambio de la energía libre durante una reacción: la energía libre de los productos menos la de los sustratos. Un valor muy negativo de ΔG indica que la reacción tiene una gran tendencia a producirse. (Panel 2–7, pp. 118–119)

variación de energía libre estándar ($\Delta G°$)
standard free-energy change ($\Delta G°$)
Variación de energía libre que sufren dos moléculas que reaccionan en condiciones estándar de presión y temperatura, cuando todos los componentes se encuentran a una concentración de 1 mol por litro. (Tabla 2–4, p. 77 y Figura 14–18)

vector
vector
En biología celular, DNA de un agente (un virus o un plásmido) utilizado para transmitir material genético a una célula o a un organismo. *Véase también* vector de clonación, vector de expresión. (Figura 8–39)

vector de clonación
cloning vector
Pequeña molécula de DNA, por lo general derivada de un bacteriófago o un plásmido, que es utilizada para transportar el fragmento de DNA que se quiere clonar a una célula receptora, y que hace posible la replicación del fragmento de DNA.

vector de expresión
expression vector
Virus o plásmido que transporta una secuencia de DNA al interior de una célula huésped y allí dirige la síntesis de la proteína codificada por la secuencia. (Figura 8–48)

VEGF – *véase* **factor de crecimiento endotelial vascular**

vesícula
vesicle
Orgánulo pequeño, esférico y rodeado de membrana, del citoplasma de una célula eucariota. (Figura 11–35)

vesícula acrosómica
acrosomal vesicle
Región del extremo de la cabeza del espermatozoide que contiene una vesícula llena de enzimas hidrolíticas utilizadas para digerir la capa protectora que rodea el oocito. Cuando un espermatozoide empieza a entrar en un oocito, libera el contenido de la vesícula (la reacción acrosómica) permitiendo al espermatozoide atravesar la zona pelúcida. (Figuras 21–13 y 21–27)

vesícula de secreción
secretory vesicle
Orgánulo rodeado de membrana en el que se almacenan las moléculas destinadas a ser segregadas. A veces se denominan gránulos de secreción debido a que sus contenidos teñidos de oscuro hacen que el orgánulo pueda verse como un pequeño objeto sólido. (Figura 13–63 y 13–66)

vesícula revestida
coated vesicle
Vesícula delimitada por una membrana con una red de proteínas (el revestimiento) en su superficie citosólica. Se forma por el estrangulamiento de una región revestida de la membrana (depresión revestida). Algunos revestimientos son de clatrina mientras que otros son de otras proteínas.

vesícula sináptica
synaptic vesicle
Pequeña vesícula de secreción, llena de neurotransmisor, que se forma en las terminaciones axónicas de las fibras nerviosas. Su contenido es liberado a la hendidura sináptica mediante exocitosis cuando un potencial de acción llega al terminal del axón.

vía de secreción constitutiva (vía por defecto)
constitutive secretory pathway (default pathway)
Vía presente en todas las células mediante la cual moléculas como las proteínas de la membrana plasmática son liberadas continuamente hacia la membrana plasmática desde el complejo de Golgi en vesículas que se fusionan con dicha membrana. (Figura 13–63)

vía de señalización de los fosfolípidos de inositol
inositol phospholipid signaling pathway
Vía de señalización intracelular que se inicia con la activación de la fosfolipasa C y la generación de IP_3 y diacilglicerol (DAG) a partir de fosfolípidos de inositol de la membrana plasmática. El DAG colabora a activar la proteína quinasa C. (Figura 15-38 y 15–39)

vía de señalización de Wnt
Wnt signaling pathway
Vía de señalización activada por la unión de una proteína Wnt a receptores de su superficie celular. La vía tiene diferentes ramas. En la principal (la rama canónica), la activación hace que los aumentados niveles de β-catenina entren en el núcleo, donde regulan la transcripción de genes que controlan la diferenciación y la proliferación celular. La sobreactuación de la vía Wnt/β-catenina puede producir cáncer. (Figura 17–55)

vía de señalización Jak-STAT
Jak-STAT signaling pathway
Vía de señalización activada por citoquinas y por algunas hormonas que es una vía rápida que va desde la membrana plasmática hasta el núcleo para alterar la transcripción génica. En ella participan quinasas citoplasmáticas Janus (Jak) y transductores y activadores de transcripción (STAT).

vía secretora por defecto – *véase* **vía de secreción constitutiva**
default secretory pathway

virión
virion
Una única partícula de virus (Figura 24–13)

virus
virus
Partícula formada por una cubierta proteica que contiene ácido nucleico (RNA o DNA) en su interior. Es capaz de replicarse dentro de una célula huésped y de propagarse de una célula a otra. (Figura 24–13)

virus de DNA tumorogénico
DNA tumor virus
Término general que designa diferentes virus de DNA que pueden causar tumores. (Figura 20–43)

virus no recubierto
nonenveloped virus
Virus formado únicamente por una molécula de ácido nucleico y una cápside proteica. (Figura 24–24C y D)

virus recubierto
enveloped virus
Virus con una cápside rodeada por una membrana lipídica (la cubierta), derivada de la membrana plasmática de la célula huésped y que es adquirida cuando el virus abandona esta célula por gemación. (Figura 24–15)

virus tumoral
tumor virus
Virus que puede transformar en cancerosa la célula que infecta.

V_{max}
V_{max}
Velocidad máxima de una reacción enzimática. (Figura 3–45 y Panel 3–3, pp. 162-163)

v-SNARE – *véase* **SNARE**

weel
weel
Proteína quinasa que inhibe la actividad Cdk al fosforilar determinados aminoácidos del centro activo de Cdk. Es importante en la regulación de la entrada en la fase M del ciclo celular.

Wnt (proteína Wnt)
Wnt (Wnt protein)
Miembro de una familia de proteínas señal secretadas que desempeñan papeles muy diferentes en el control de la diferenciación y la proliferación celular y de la expresión génica en tejidos embrionarios y adultos de los animales.

***Xenopus laevis* (sapo de uñas sudafricano)**
Xenopus laevis (South African clawed toad)
Especie de rana (no de sapo) utilizada frecuentemente en estudios del desarrollo temprano de los vertebrados.

XIC – *véase* **centro de inactivación del cromosoma X**

yema
yolk
Reserva nutricional de los huevos de muchos animales.

zona pelúcida
zona pellucida
Capa glucoproteica de la superficie de los oocitos maduros todavía no fecundados. Es una barrera para la fecundación entre especies. (Figura 21–22)

transporte activo
active transport
Desplazamiento de una molécula a través de una membrana o de otra barrera, impulsado por una forma de energía diferente de la almacenada en el gradiente electroquímico de la molécula transportada.

transporte axónico
axonal transport
Transporte dirigido de orgánulos y moléculas a lo largo de un axón de una célula nerviosa. Puede ser anterógrado (desde el cuerpo celular) o retrógrado (hacia el cuerpo celular).

transporte de membrana
membrane transport
Desplazamiento de moléculas a través de una membrana, mediado por una proteína de transporte de membrana. (Figuras 11–4 y 11–4)

transporte pasivo (difusión facilitada)
passive transport (facilitated diffusion)
Transporte de un soluto a través de una membrana a favor de su gradiente de concentración o de su gradiente electroquímico, utilizando únicamente la energía almacenada en el gradiente. (Figura 11–4)

transporte transcelular
transcellular transport
Transporte de solutos, como los nutrientes, a través de un epitelio, mediado por las proteínas de transporte a través de membrana que hay en las superficies apical y basal de las células epiteliales. (Figura 11–11)

transporte vesicular
vesicular transport
Transporte de proteínas, de un compartimiento celular a otro, mediante intermediarios rodeados de membrana, como vesículas o fragmentos de orgánulos.

transposasa
transposase
Enzima que puede cortar una secuencia transposón de un cromosoma, provocando que dicha secuencia se inserte en un nuevo lugar diana. Por lo general, las transposasas están codificadas por los transposones. (Figura 5–69)

transposición (recombinación transposicional)
transposition (transpositional recombination)
Desplazamiento de una secuencia de DNA de un lugar del genoma a otro. (Tabla 5–3, p. 318)

transposición por corte e inserción
cut-and-paste transposition
Tipo de desplazamiento de un elemento transponible en el que este elemento es escindido del DNA e insertado en un nuevo lugar mediante una transposasa especial. (Figura 5–69)

transposón – *véase* **elemento transponible**
transposon

transposón sólo de DNA
DNA-only transposon
Elemento transponible que existe como DNA a lo largo de todo su ciclo de vida. Muchos de ellos se desplazan mediante transposición por corte e inserción. *Véase también* elemento transposible.

trasplante nuclear
nuclear transplantation
Transferencia de un núcleo de una célula a otra mediante microinyección. (Figura 8-6)

triacilglicerol (triglicérido)
triacylglycerol (triglyceride)
Molécula formada por tres ácidos grasos esterificados con un glicerol. Es el principal constituyente de las gotas lipídicas de los tejidos animales (con ácidos grasos saturados) y de los aceites vegetales (mayoría de ácidos grasos insaturados). (Panel 2–5, pp. 114-115)

tRNA – *véase* **RNA de transferencia**

tRNA iniciador
initiator tRNA
tRNA especial que inicia la traducción. Siempre transporta el aminoácido metionina, formando el complejo Met-tRNAi. (Figura 6–72)

t-SNARE – *véase* **SNARE**

tubo neural
neural tube
Tubo del ectodermo que formará el cerebro y la médula espinal en un embrión de vertebrado. (Figura 22–78)

tumor
tumor
Masa anormal de células producto de un defecto del control de la proliferación celular. Un tumor puede ser no invasivo (benigno) o invasivo (canceroso o maligno). (Figura 20–3)

tumor primario
primary tumor
Tumor situado en el lugar en el que ha aparecido el cáncer. Los tumores secundarios se desarrollan en otros lugares mediante metástasis.

ubiquitina
ubiquitin
Proteína pequeña y altamente conservada de las células eucariotas, que se une de forma covalente a las lisinas de otras proteínas. La unión de una cadena corta de ubiquitinas a una de estas lisinas puede marcar a la proteína para degradarla por proteolisis intracelular en un proteosoma. (Figura 6–92)

ubiquitina ligasa
ubiquitin ligase
Miembro de un grupo de enzimas que unen ubiquitina a una proteína, a menudo marcándola para que sea destruida en un proteosoma. El proceso que cataliza una ubiquitina ligasa se denomina ubiquitinación. (Figura 3–79)

unión adherente
adherens junction
Unión intercelular en la que la cara citoplasmática de la membrana plasmática está unida a filamentos de actina. Como ejemplos, las bandas de adhesión que unen entre sí células epiteliales adyacentes.

unión de anclaje
anchoring junction
Tipo de unión celular que ancla las células a sus vecinas o a la matriz extracelular. (Figura 19–2 y Tabla 19–1, p. 1133)

unión de Holliday (intercambio cruzado de cadenas)
Holliday junction (cross-strand exchange)
Estructura en forma de X que se puede observar en un DNA que está sufriendo un proceso de recombinación, en la que las dos moléculas de DNA se mantienen unidas en el punto de entrecruzamiento. También se denomina intercambio cruzado de cadenas. (Figura 5–61)

unión de tipo gap
gap junction
Canal de comunicación entre dos células, presente en la mayoría de tejidos epiteliales animales, que permite que iones y pequeñas moléculas pasen del citoplasma de una de ellas al de la otra.

unión estrecha
tight junction
Unión célula-célula que sella entre sí células epiteliales adyacentes, impidiendo que la mayoría de moléculas disueltas pasen de un lado de la lámina epitelial al otro. (Figuras 19–3 y 19–26)

unión formadora de canal o unión de tipo gap
channel forming junction
Unión célula-célula que pone en contacto los citoplasmas de células adyacentes y constituye un lugar de paso de una célula a otra a pequeñas moléculas e iones. En tejidos animales, está compuesto por proteínas conexinas o inexinas. En vegetales, una función similar a ésta la realizan los plasmodesmos. (Figura 19–2 y Tabla 19–1, p. 1133)

unión heterofílica
heterophilic binding
Unión entre moléculas de diferente tipo, especialmente entre las que participan en la adhesión célula-célula. (Figura 19–8)

unión homofílica
homophilic binding
Unión entre moléculas del mismo tipo, especialmente las que participan en la adhesión célula-célula. (Figura 19–8)

unión neuromuscular
neuromuscular junction
Sinapsis química especializada entre un terminal del axón de una neurona motora y una célula del músculo esquelético. (Figura 11–39)

unión oclusiva
occluding junction
Tipo de unión celular entre células epiteliales que hace que un epitelio quede sellado, formando una barrera a través de la cual no pueden pasar ni las moléculas pequeñas; el resultado es una lámina de células impermeable (o permeable selectivamente). (Figura 19–2 y Tabla 19–1, p.1133)

unión septada
septate junction
En invertebrados, principal tipo de unión celular estanca; su estructura es distinta a la de las uniones estrechas de los vertebrados. (Figura 19–28)

unión transmisora de señal
signal-relaying junction
Tipo complejo de unión célula-célula que permite que las señales sean transmitidas de una célula a otra a través de zonas de contacto de sus membranas plasmáticas. Incluye proteínas de anclaje y proteínas que median la transducción de la señal (Figura 19–2 y Tabla 19–1, p. 1133)

uniportador
uniporter
Proteína que transporta un soluto de un lado a otro de la membrana. (Figura 11–8)

UTR (región no traducida)
UTR (untranslated región)
Región no codificante de una molécula de mRNA. El UTR 3´ se extiende desde el codón de STOP que termina la síntesis de la proteína, hasta el inicio de la cola poli A. (Figura 7–105) El UTR 5´ se extiende desde la caperuza 5´ hasta el codón que inicia la síntesis de la proteína.

vacuola
vacuole
Vesícula muy grande y llena de líquido que se encuentra en la mayoría de células de los vegetales y de los hongos. Habitualmente ocupa más de una tercera parte del volumen celular. (Figura 13–39)

vaina de mielina
myelin sheath
Capa aislante de la membrana celular especializada que envuelve los axones de muchas neuronas de vertebrados. Producida por oligodendrocitos del sistema nervioso central y por las células de Schwann del sistema nervioso periférico. (Figura 11–32)

valencia
valence
Número de electrones que puede ganar o perder un átomo (tanto compartiéndolos como por transferencia) para llenar su orbital externo. La valencia de un átomo es igual al número de enlaces sencillos que puede formar este átomo.

variación antigénica
antigenic variation
Capacidad de cambiar los antígenos expuestos en la superficie celular; se trata de una propiedad de algunos microorganismos patógenos que les permite evadir el ataque del sistema inmune.

variación de energía libre (ΔG)
free-energy change (ΔG)
Cambio de la energía libre durante una reacción: la energía libre de los productos menos la de los sustratos. Un valor muy negativo de ΔG indica que la reacción tiene una gran tendencia a producirse. (Panel 2–7, pp. 118–119)

variación de energía libre estándar (ΔG^o)
standard free-energy change (ΔG^o)
Variación de energía libre que sufren dos moléculas que reaccionan en condiciones estándar de presión y temperatura, cuando todos los componentes se encuentran a una concentración de 1 mol por litro. (Tabla 2–4, p. 77 y Figura 14–18)

vector
vector
En biología celular, DNA de un agente (un virus o un plásmido) utilizado para transmitir material genético a una célula o a un organismo. *Véase también* vector de clonación, vector de expresión. (Figura 8–39)

vector de clonación
cloning vector
Pequeña molécula de DNA, por lo general derivada de un bacteriófago o un plásmido, que es utilizada para transportar el fragmento de DNA que se quiere clonar a una célula receptora, y que hace posible la replicación del fragmento de DNA.

vector de expresión
expression vector
Virus o plásmido que transporta una secuencia de DNA al interior de una célula huésped y allí dirige la síntesis de la proteína codificada por la secuencia. (Figura 8–48)

VEGF – *véase* **factor de crecimiento endotelial vascular**

vesícula
vesicle
Orgánulo pequeño, esférico y rodeado de membrana, del citoplasma de una célula eucariota. (Figura 11–35)

vesícula acrosómica
acrosomal vesicle
Región del extremo de la cabeza del espermatozoide que contiene una vesícula llena de enzimas hidrolíticas utilizadas para digerir la capa protectora que rodea el oocito. Cuando un espermatozoide empieza a entrar en un oocito, libera el contenido de la vesícula (la reacción acrosómica) permitiendo al espermatozoide atravesar la zona pelúcida. (Figuras 21–13 y 21–27)

vesícula de secreción
secretory vesicle
Orgánulo rodeado de membrana en el que se almacenan las moléculas destinadas a ser segregadas. A veces se denominan gránulos de secreción debido a que sus contenidos teñidos de oscuro hacen que el orgánulo pueda verse como un pequeño objeto sólido. (Figura 13–63 y 13–66)

vesícula revestida
coated vesicle
Vesícula delimitada por una membrana con una red de proteínas (el revestimiento) en su superficie citosólica. Se forma por el estrangulamiento de una región revestida de la membrana (depresión revestida). Algunos revestimientos son de clatrina mientras que otros son de otras proteínas.

vesícula sináptica
synaptic vesicle
Pequeña vesícula de secreción, llena de neurotransmisor, que se forma en las terminaciones axónicas de las fibras nerviosas. Su contenido es liberado a la hendidura sináptica mediante exocitosis cuando un potencial de acción llega al terminal del axón.

vía de secreción constitutiva (vía por defecto)
constitutive secretory pathway (default pathway)
Vía presente en todas las células mediante la cual moléculas como las proteínas de la membrana plasmática son liberadas continuamente hacia la membrana plasmática desde el complejo de Golgi en vesículas que se fusionan con dicha membrana. (Figura 13–63)

vía de señalización de los fosfolípidos de inositol
inositol phospholipid signaling pathway
Vía de señalización intracelular que se inicia con la activación de la fosfolipasa C y la generación de IP_3 y diacilglicerol (DAG) a partir de fosfolípidos de inositol de la membrana plasmática. El DAG colabora a activar la proteína quinasa C. (Figura 15-38 y 15–39)

vía de señalización de Wnt
Wnt signaling pathway
Vía de señalización activada por la unión de una proteína Wnt a receptores de su superficie celular. La vía tiene diferentes ramas. En la principal (la rama canónica), la activación hace que los aumentados niveles de β-catenina entren en el núcleo, donde regulan la transcripción de genes que controlan la diferenciación y la proliferación celular. La sobreactuación de la vía Wnt/β-catenina puede producir cáncer. (Figura 17–55)

vía de señalización Jak-STAT
Jak-STAT signaling pathway
Vía de señalización activada por citoquinas y por algunas hormonas que es una vía rápida que va desde la membrana plasmática hasta el núcleo para alterar la transcripción génica. En ella participan quinasas citoplasmáticas Janus (Jak) y transductores y activadores de transcripción (STAT).

vía secretora por defecto – *véase* **vía de secreción constitutiva**
default secretory pathway

virión
virion
Una única partícula de virus (Figura 24–13)

virus
virus
Partícula formada por una cubierta proteica que contiene ácido nucleico (RNA o DNA) en su interior. Es capaz de replicarse dentro de una célula huésped y de propagarse de una célula a otra. (Figura 24–13)

virus de DNA tumorogénico
DNA tumor virus
Término general que designa diferentes virus de DNA que pueden causar tumores. (Figura 20–43)

virus no recubierto
nonenveloped virus
Virus formado únicamente por una molécula de ácido nucleico y una cápside de proteica. (Figura 24–24C y D)

virus recubierto
enveloped virus
Virus con una cápside rodeada por una membrana lipídica (la cubierta), derivada de la membrana plasmática de la célula huésped y que es adquirida cuando el virus abandona esta célula por gemación. (Figura 24–15)

virus tumoral
tumor virus
Virus que puede transformar en cancerosa la célula que infecta.

V_{max}
V_{max}
Velocidad máxima de una reacción enzimática. (Figura 3–45 y Panel 3-3, pp. 162-163)

v-SNARE – *véase* **SNARE**

weel
weel
Proteína quinasa que inhibe la actividad Cdk al fosforilar determinados aminoácidos del centro activo de Cdk. Es importante en la regulación de la entrada en la fase M del ciclo celular.

Wnt (proteína Wnt)
Wnt (Wnt protein)
Miembro de una familia de proteínas señal secretadas que desempeñan papeles muy diferentes en el control de la diferenciación y la proliferación celular y de la expresión génica en tejidos embrionarios y adultos de los animales.

***Xenopus laevis* (sapo de uñas sudrafricano)**
Xenopus laevis (South African clawed toad)
Especie de rana (no de sapo) utilizada frecuentemente en estudios del desarrollo temprano de los vertebrados.

XIC – *véase* **centro de inactivación del cromosoma X**

yema
yolk
Reserva nutricional de los huevos de muchos animales.

zona pelúcida
zona pellucida
Capa glucoproteica de la superficie de los oocitos maduros todavía no fecundados. Es una barrera para la fecundación entre especies. (Figura 21–22)

Índice alfabético

Las cifras en **negrita** remiten a las páginas en las que el tema se trata con mayor profundidad. Las que van seguidas de la letra f, a las figuras, y las que van seguidas de una t, a las tablas.

A

α2, proteína 455
αSG, genes 456f
a1, proteína 455
AAA de dineína, dominio 1019f
AB y RTK 923t
ABA, estructura 1406f
ABC transportadores 660f, **665**f y sigs., 1583
 transportadores y cáncer 1218
AbdA, gen 1343f
AbdB, gen 1324f
Abf1, sitio de unión 288f
Abl y leucemia mieloide crónica 1261f
ABp, células 1324f, 1325
Abrazadera, cargador 274
 deslizante 273-275f
Ac-Ds del maíz 318t
Aceptor de enlaces de hidrógeno 417f
Acetato de tetradecanoilforbol *véase* TPA
Acetil CoA **84**t, 817, 819f
 CoA, estructura 83f
 CoA, rutas de producción 97f
 lisina 222f
 transferasas de las histonas *véase* HAT
 y regulación de proteínas 186t
Acetilación de histonas 223f
Acetilcolina 684, 686, 882, 883
 canales iónicos regulados por 684, 686
 estructura 886f
 fármacos 686
 receptores de 464, **684**, 685f, 696f, 910t, 916, 917
 respuesta según la célula 885, 886f
 unión neuromuscular 697f
 vesículas sinápticas 808
Acetilcolinesterasa y difusión 163
N-Acetilglucosamina *véase* GlcNAc
Acetona en agua 621f
Achaete, gen 1356, 1359
Ácido(s) 109f
 abscísico *véase* ABA
 N-acetilneuramínico *véase* NANA
 γ-aminobutírico *véase* GABA
 aspártico 127f, 129f
 aspártico, carga de cadena lateral 60f
 cítrico, ciclo *véase* Ciclo del ácido cítrico
 débiles lipófilos 836
 definición 52
 desoxirribonucleico *véase* DNA
 esteárico 114f
 etilén-diamín tetraacético *véase* EDTA
 fólico y coenzimas 167t
 fórmico, oxidación bacteriana 871f
 giberélico *véase* GA3
 glutámico 127f, 129f
 glutámico, carga de cadena lateral 60f
 hialurónico 1166f, 1179
 hialurónico, volumen 1180f
 γ-hialurónico, estructura 1180f
 indol 3-acético *véase* Auxina
 lipoico y coenzimas 167t
 oleico 114f
 palmítico 58, 114f
 pantoténico y coenzimas 167t
 péptido-nucleico *véase* PNA
 retinoico, estructura 889f
 retinoico, receptor 891f
 retinoico y migración de PGC 1285
 ribonucleicos *véase* RNA
 siálico *véase* NANA
 teicoico 1490f
 treosa-nucleico *véase* TNA
Ácidos grasos 55, 56f, 58, 59, 114f
 anclaje a bicapa 631f
 estructura 58f
 insaturados 58, 114f
 oxidación 97f
 saturados 58, 114f
 y peroxisomas 721
Ácidos nucleicos 62, 63f
 estructura 117f
 hibridación 535 y sigs.
 síntesis 85f
 síntesis directa 548
Acondroplasia 1472f
Acoplamiento de reacciones químicas 78f, 79f
 quimiosmótico **813**, 814f
Acorralamiento cortical 647, 648f
Acortamiento de filamentos 978f
ACP/C-Cdc20, actividad 1100f
ACP/C-Cdh1, actividad 1101
Acrosómica, reacción 1297, **1298**, 1299f
ACTH 803f
 respuesta celular inducida 907t
Actina 145f, 464
 adhesiones célula-matriz 1134, 1135t
 alargamiento 999f, 1000f
 ciclo celular de levaduras 970f
 cono de crecimiento del lamelipodios 1040f
 córtex 1036f
 de levaduras 983
 de microvilli 1154f
 de músculo de conejo 502
 desplazamiento celular 1036f
 e hidrólisis de nucleótidos 976
 en anillo contráctil 1093, 1094
 ensamblaje de subunidades 973-975f
 estructura del filamento 975f
 eucariótica, evolución 982, 983
 extremo más 975f, 976, 978f
 extremo menos 975f, 976, 978f
 fármacos 988t
 filamentos 27f, 994f-966, 967f, 968f
 formas de haces en una célula 1006f
 giro por acción de cofilina 1002f
 haz contráctil 1007f
 haz paralelo 1007f
 homólogos bacterianos 989, 990f
 inestabilidad dinámica 977, 978
 microtúbulos, coordinación 1046, 1047
 nucleación a partir de membrana plasmática 996, 997f
 nucleación en lamelipodios 1038f
 nucleación y patógenos 1517f
 patógenos intracelulares 1516f
 proteínas accesorias 983f
 proteínas de entrecruzamiento 1006 y sigs.
 proteínas motoras basadas en 1011 y sigs.
 recambio rotatorio 977f
 regulación de la longitud 1000
 subunidades 970
 unión célula-matriz 1133t
 velocidad de polimerización 973f
α-Actinina 994, 1135t
 estructura 1007f
Actinomicina D, efectos 385t
Activación cinética en proteínas alostéricas 900f
 de complemento, vía activa 1529f
 de complemento, vía clásica 1529f
 génica a distancia 438f
 linfocitaria 1590-1600
Activador del plasminógeno 1194
 del plasminógeno de tipo tisular *véase* tPA
 del plasminógeno de tipo uroquinasa *véase* uPA
 transcripcional de *Lac* 435, 436
 transcripcionales 342, 343, **435** y sigs.
Actividad genómica heredable **468**, 469f, 470
 proteica, control 415f
Acuaporinas 653, 663-675f
 estructura 675f
 hélices α 633f
Adaptación a la señal **902**, 903f
 de canales iónicos 690
Adaptadoras, proteínas **754**, 755, 756f
Adaptadores de traducción 372f
ADAR, enzima 483
Adenilato ciclasa 906, 907f
Adenina 2 y sigs., 61, 197, 198f
Adenocarcinoma 1206f, 1222f
Adenoma 1206f
 de colon 1252f, 1438f
 definición 1206
Adenosín bisfosfato *véase* ADP
 monofosfato *véase* AMP
 trifosfato *véase* ATP
Adenosina desaminasa y velocidad de reacción 161f
Adenovirus, entrada en la célula 1507f
 forma 1496f
 y proteínas motoras 1516
Adhesina 1503
Adhesión(es) célula-matriz **1169-1178**
 celular 1040, 1041, **1131** y sigs.
 celular, cambio de patrones 1369, 1370
 focales y FAK 1176f
 intercelular **1133-1150**
 leucocitaria, deficiencia *véase* LAD
 selectiva célula-cálula 1139 y sigs.
 y citoesqueleto 1036
Adicción oncogénica 1260
Adición génica 566f
Adipocitos 1468, **1475-1476**
 células ES 1481f
 desarrollo 1475f
 tirosina aminotransferasa 415
Adiposo, tejido, respuesta celular inducida 907t
ADN, secuencias complementarias 3
ADP **81**
 desplazamiento de miosina II 1017f
 y ATP 80f
ADP-ATP, co-transporte 822, 823f
ADP-ribosa y cólera 907
ADP-ribosilación y tos ferina 907
 respuesta celular inducida 907t
 respuesta súbita 900, 901
Adyuvantes 1539
Aecuorina 596, 597f, 912
 expresión transgénica 596
Aeróbicas, reacciones de organismos 12
Afinidad del anticuerpo 1558
Aflatoxina B1 1226f, 1229, 1230
Aflatoxina-2,3-epóxido 1226f
Afloramientos hidrotermales 12, 13f
AFM 599, 600, 601f
Agamous, mutante 1413f, 1414f
Agentes cancerígenos, retraso hasta aparición de la enfermedad 1210f
 desacoplantes 836
 mutagénicos *véase* Carcinógenos
 patógenos *véase* Patógenos
Agrecano 1166f
 agregado de 1182f

cadenas GAG 1184t
estructura 1182f
Agregación embrionaria 1140f
proteica y herencia 472f
Agregados lipídicos 115f
proneurales e inhibición lateral 1356 y sigs.
proteicos y enfermedades humanas 396, 397f
Agricultura y plantas transgénicas 568, 569
Agrina 1168
Agua, abundancia 51
bicapas lipídicas 652
canales 632
como solvente 109f
enlace 50f, 51f
enlaces de van der Waals 52f
estructura 108f
molécula 52f
moléculas anfifílicas 9
moléculas hidrofílicas 621f
moléculas hidrofóbicas 621f
moléculas lipídicas 621f
protones 828f
AID 1567
e hipermutación somática 1567f
AIRE 1588
Aislamiento de células 501 y sigs.
Aislantes 452
distribución 453f
propiedades 452f
Ajo, aroma de 782
AKAP 908
Akt **934**
quinasa 936f
Ala, células madre sensoriales 1356f
disco imaginal 1351f
división en compartimientos 1351, 1352
tamaño del compartimiento 1352, 1354
Alanina 127f, 129f
estructura 59f
Alcohol deshidrogenasa, forma 144f
y cáncer 1224f
Aldehído, grupo 56, 112f
Aldosa 112f
Alélica, exclusión 1565, 1566
Alelo(s) **558**
definición **314**, 554f
dominante 554
humanos heredados juntos *véase* Bloques haplotípicos
recesivo 554
y selección natural 562
Alergia 1556
predisposición genética 563
Alexa, colorantes 587f, 588f
Alfa herpes, virus neurotrópicos 1516
Algas, fijación de carbono 841
unicelulares 32, 33
Alineamiento presináptico 1275
Almidón 58, 94f, **95**, **846**
acumulación en plantas 841f, 842f
Alostéricas, proteínas, cinética 900f
Alotrasplante 1576
Alport, síndrome de 1167
Alquilación 1-metiladenina 298
3-metilcitosina 298
O^6-metilguanina 298
ALS y neurofilamentos 987
Aluminio, abundancia 47f
Alveolares, células 1434
Alvéolos de glándula mamaria 1427f
pulmonares 1434, 1435f
Alzheimer, enfermedad 379, 1048
enfermedad prematura 947
α-Amanitina 987
efectos 385t
Ambientales, factores y cáncer 1224 y sigs.
señales y desarrollo vegetal 1403f
Ambiente y lectura génica 32f, 34f, 35f
Ameba, desplazamiento y miosina 1041f
organización 33f
Ames, ensayo de 1225f
Amida, enlaces y ribozimas 405t
hidrólisis 161f
Amígdala(s) faríngea 1541f
palatinas 1541f
Amiloides, depósitos 397
fibras de priones 1499
Amiloplasto 841f, 842
Amino, grupo 55
Aminoacil-tRNA 377f
Aminoácido(s) 5, 55, 56f, **59-61**, 127f
acoplamiento con tRNA 370, 371
activación 371f
apolares 127f, 129f
cadena de 125
cadenas laterales 60f, 127f, 128f, 129f
de histonas, modificaciones covalentes 222f, 223f, 224
esenciales 101f
familias 128f
fórmula general 128f
isómeros ópticos 60
polares 127f, 129f
predicción de la secuencia 549, 551f
y familias genéticas 23
L-Aminoácidos 128f
Aminoacil tRNA-sintetasa 371f, 372f
Aminoacilación y ribozimas sintéticas 407
Aminoacil-tRNA estructura de la unión 371f
unido a EF-Tu 181f
Aminoacil-tRNA-sintetasa, reconocimiento del tRNA 373f
Amoníaco y túneles enzimáticos 167, 168f
AMP 86f
cíclico *véase* cAMP
AMPA, receptores 691
Ampicilina, gen de, inactivación 318f
Amplificación del DNA 545f
enzimática en microscopía 588
génica y cáncer 1237f, 1238f
Amplificantes transitorias, células 1422f, 1423f
Ampollas y gen mutante de queratina 986f
AmpR, gen 318f
Anabaena cylindrica, estructura 15f
Anafase 1054, **1071** y sigs.
A 1088-1090
B 1088-1090
complejo activador 949
complejo de control *véase* APC
fuerzas de separación 1089f
y separación de homólogos 1273f
Análisis de grupos 575f
de ligamiento 560
de proteínas **517-532**
de retraso en gel 428f
epistásico 559f
genético de ligamiento humano 561f
inmunológico **518**, 519f
Ancestro común, gen conservado 17f
común, reconstrucción 247f
Anclaje(s), dependencia de 1175, 1176
fibras de 1185
GPI 630f, 742
lipídicos y proteína de membrana 630, 631f
Anemia de Franconi 295t
falciforme 1495, 1496
falciforme, herencia 563
Anestésicos 686
Aneuploides, cromosomas 1279
Anexina V y apoptosis 1117
Anfibios *véase* también *Xenopus*
embrión 1363 y sigs.
mapa neuronal 1391f
regeneración de un miembro 1480f
Anfifílica(s), hélice alfa 630 y sigs.
moléculas 9, 59, 405
moléculas lipídicas 618
Angiogénesis 1446, 1447f
tumoral 1220, 1221
Angiosarcoma hepático 1226f
Ángulo de resonancia 525f
Anhidrasa carbónica y velocidad de reacción 161f
Anhídrido unido a carbono, energía libre 93f
Anillo complejo de tubulina γ *véase* γ-TuRC
contráctil 996, 1073f, **1093**f, 1094
contráctil y RhoA 1094, 1095f
de constricción 806f
de γ-tubulina, complejo 1076
formación 112f
porfirínico 831f
Z bacteriano 989
Animal(es) abundancia de elementos químicos 47f
alteración genética 566 y sigs.
canales de fuga de K^+ 669, 671
características anatómicas comunes 1307, 1308
clasificación de tejidos 1131
complejo ARP 998
masa celular total 1111, 1112
mecanismos de desarrollo 1305 y sigs.
modelos de estudio 36
pluricelulares, proteínas de interacción celular 1308, 1309
transgénicos y genes del cáncer 1241, 1242
Aniones extracelulares 652t
Anisomicina, efectos 385t
Anopheles y malaria 1494, 1495f
Ansiedad, fármacos 686
Antennapedia, complejo 1342
mutante 1342f
Anterior, genes de polaridad 1332f, 1334f
Anteroposterior, eje 1364
eje, formación 1341 y sigs.
Anti-IAP, proteínas 1125f
Antiapoptóticas, proteínas 1122, 1123f
Antibióticos, diana de los 1523f
inhibidores de la síntesis de proteínas 383, 384
lugares de unión al ribosoma bacteriano 384f
resistencia a 1522 y sigs.
síntesis 407
Anticodón 6, 7f, **368**f y sigs.
y codón, balanceo de apareamiento 369f
Anticuerpo(s) 156, **1551** y sigs.
anti E-cadherina 1136, 1140
anti-BrdU 1059f
cadenas 1552, 1553
catalíticos 160, 161f
con colorante fluorescente 502
esquema 1552f
estructura 257f, 1554f
fagocitosis activada por 1555f
genes 1563 y sigs.
lugar de unión al antígeno 1552
lugar de unión al antígeno, formas 1561f
lugares de unión 156, 157f
marcados con colorantes y microscopía 587, 588f
mecanismos de diversificación 1569f
monoclonales **508**, 509f, 510
monoclonales, producción 508-510
preparación para microscopía 588589
primario 588
regiones constante y variable de cadenas 1558, 1559f
regiones hipervariables 1559f
repertorio primario 1562
repertorio secundario 1562
respuesta mediada por 1540
respuesta primaria 1546f
respuesta secundaria 1546f
retención en el ER 768f
secundario 588
y linfocitos 1453
y linfocitos B 1552f
y localización de proteínas 514, 515f
y marcaje celular 502
Antidepresivos 686, 687
Antigénica, variación 1519-1521
Antígeno(s) 156, **1539**
H-2 1576
hipermutación somática 1567
independientes del linfocito T 1599
leucocito e integrinas 1174f
multivalente 1558f
polivalente 1558f
unión al anticuerpo 157f
y clones de linfocitos 1545
Antígeno-anticuerpo, interacción 1553f, **1557** y sigs.
unión 1558f
Anti-IAP y bloqueo de la apoptosis 1127f
Antimülleriana, hormona 1285
Antiparalelas, cadenas 199
Antiportadores *véase* Intercambiadores
Antirrhinum, mutante 556f
regulación ambiental 32f
Antisuero para microscopía 588, 589f
Antitubulina fluorescente 588f
Antocianos 782
Antp, gen 1343f
Ántrax 1493
toxina 1493f
Aorta, fibras elásticas 1190f
AP, endonucleasa 298, 299f
AP2/EREBP, familia de proteínas reguladoras de genes 1400t
Apaf1, proteína activadora de proteasas 1121, 1122f
Aparato de Golgi *véase* Golgi
Apareamiento complementario 197
corrección de errores 271t, 315f
de bases 62, 266

de bases reconocimiento exterior 417f
de bases y recombinación homóloga 305, 306
de homólogos 1274
de levaduras **455**, 104f, 1045f
APC 395, 949, 1359f
Apc, genes 950
genes supresores de tumores 1252t, 1253
mutación 1438
y cáncer de colon 1253
APC/C 1064, 1065f
función 1066t
y separación de cromátidas hermanas 1087f
Apéndice(s) 1541f
desarrollo y *Distal-less* 1351f
organogénesis 1347 y sigs.
Apertura numérica 581, 582f
Apetala2, mutante 1413f, 1414f
Apetala3, mutante 1413f, 1414f
Apicobasal, polaridad 1155f
aPKC, proteína **1156**, 1361
Apoptosis 884, 885f, **1115**, 1116f, 1117f
asimetría de fosfolípidos 627
Bcl2 1121 y sigs.
cáncer 1215, 1216f
excesiva y enfermedad 1127, 1128
fibronectina 1175f
inhibidores de *véase* IAP
insuficiente y enfermedad 1127, 1128
marcadores 1118f
mecanismos de bloqueo 1127f
mutación de los genes 1245, 1246
neutrófilos 1117
número de células 1116
programa de desarrollo 1327, 1328
señales de proliferación defectuosas 1107, 1108f
vía extrínseca 1119
vía intrínseca 1119, **1121** y sigs.
Apoptosoma 1121, 1122f
Apotransferrina 794f
APP 1021
Aprendizaje asociativo 1396
capacidad 690
déficit y mutación 556
y conexiones sinápticas 1394-1396
Apterous, expresión 1351f
Aquifex aeolicus, genoma secuenciado 18t
Arabidopsis thaliana 36f, 1398f
biblioteca de mutaciones 569
como modelo de estudio 36, 1398, 1399
genes de control del desarrollo 1399, 1400
genoma 551
genoma secuenciado 18t
mutantes 1402f
preparación de mutantes 570f, 1399f
proteínas reguladoras de genes 1400t
transgénica 569
y señalización 955, 956
Árbol bronquial 1381
genealógico celular de *Caenorhabditis elegans* 1322f
Árbol filogenético 11 y sigs., 955f
cloroplastos 875f
de proteínas quinasa 177f
familias de genes comunes 22, 23
genoma 247f y sigs.
mitocondrias 875f
receptores nucleares 255f
Archaeoglobus fulgidus, genoma secuenciado 18t
Área cribosa 1405f
ARF, familia 927t
Arf, proteínas **759**, 1107, 1108f
Arginina 127f
carga de cadena lateral 60f
reconocimiento de guanina en DNA 427f
y señales de localización nuclear 705
Argón, orbitales electrónicos 48f
Argonauta, proteína 494f
Argos y desarrollo animal 1316t
Armazón, proteínas de 1145, **1148**f, 1149
ARP, complejo 994, 997f, **998**, 1003
complejo y filamentos de actina 1038f
y células vegetales 998f
y red de actina 997f
Arp, proteínas 1022
Arqueas 16
cotraducción 723f
genoma secuenciado 18t
intercambio genético 22
número de genes 17, 18t
y árbol filogenético 15, 16f
Arqueobacterias *véase* Arqueas
Arrays 523
Arrestina 919, 921f
ARS 286, 287f
Arsénico y cáncer 1226f
Arterias 1446 y sigs.
Arteriosclerosis y agentes infecciosos 1500
Artritis e inmunidad 1534
reumatoide y tecnología de células híbridas 508
Artrópodos, quitina 1180
Asbesto y cáncer 1226f
Ascaris 1487, 1489f
aSG, genes 456f
Ash1, gen 1023f
Asimetría ambiental 1421f
del huevo de anfibio 1364f
divisional 1421f
en el desarrollo y retroalimentación positiva 1314, 1315f
Asma 1501
e inmunidad 1534
predisposición genética 563
Asociación, constante de equilibrio 158f
energías de unión 158f
Asparagina 127f, 129f
oligosacárido unido a 737f
unida a DNA 419f
Aspartato semialdehído y retroalimentación negativa 170f
y retroalimentación negativa 170f
Aspartato transcarbamilasa, forma 144f
interruptor sí/no 175f
transición alostérica 173, 174f
Aspartil fosfato y retroalimentación negativa 170f
Aspergillus, respuesta inmunitaria 1488f
Astringencia en la hibridación de DNA 537f
Astrocitos y células ES 1481f
AT 295t, 304
y ATM 1106
Ataxia telangectasia *véase* AT
Atenuación de la transcripción 477f
Aterosclerosis 791, 792
ATM 304, **1105**, 1106f
Atmósfera terrestre 11
Átomo(s) 45
de carbono, estructura 46f
de hidrógeno, estructura 46f
metálico y enzimas 167
radio fijo 51
tipos en las células 45, 46
ATP 813-827
actina 974, 979f
bombas impulsadas por 655, 656f, **659** y sigs.
cassette de unión a 183f, 665f
catanina 1000
celular, origen 823, 824t
chaperonas 390f
como transportador activo 80, 81
dinamismo de nucleosomas 215f, 216
e importación mitocondrial 716f, 717
en vegetales 95f
energía libre estándar 824, 825f, 826
espliceosoma 351, 352
estructura 61f
fijación de carbono 845f, 846
formas radiactivadas 602, 603f
fotofosforilación no cíclica **851** y sigs.
glucólisis 93f
hidrólisis 80f
hidrólisis, energía producida 49f
hidrólisis y proteínas motoras 1016 y sigs.
producción por fermentación 90, 870, 871
transporte de electrones 100
transporte energético 61
treadmilling 976
unión molecular 81, 82
vías alternativas de hidrólisis 86f
ATP sintasa **813** y sigs., 819f, 852f
estructura 821, 822f
gen de 864f
reversibilidad 826f, 827
ATP, síntesis 813, **814**f y sigs.
biológica 85f-87
de polinucleótidos 87f
gradiente de protones 821, 822
ATPasa de Ca^{+} *véase* Bomba de Ca^{+}
de H^{+} vacuolar 780f
de Na^{+}/K^{+} *véase* Bomba de Na^{+}/K^{+}
de tipo V 780
función 159t
SecA 731, 732f
ATPasa-H^{+}, ensamblaje 189
ATR 1105, 1106f
Atracción(es) de van der Waals *véase* van der Waals, fuerzas de
electrostáticas **54**
electrostáticas en proteínas 126
AUG, codón 367f
Aureola 582f
Aurora quinasas 1074
Aurora-A 1074, 1079
Aurora-B, función 1084
Autocatálisis 7f
Autocorrección de la DNA polimerasa 270
Autoensamblaje de proteínas **149** y sigs.
de vesículas 9
del citoesqueleto 965 y sigs.
Autofagia **782**, 783f, 784f
Autofagosoma 783f, 784f
Autofecundación en *Caenorhabditis elegans* 1321, 1322
Autoinmunitarias enfermedades 1539, **1549**
Automaduración como origen de la maduración 355, 356
Autorradiografía 283, 602, 603f
Autorreplicantes, moléculas y selección natural **404** y sigs.
Autosomas 473, 554f
Autotolerancia 1547
Autótrofos, organismos *véase* Fototrofos, organismos
Aux/IAA, proteínas 959f
Auxilina 757, **958**
estructura 959f, 1406f
Auxina, transportadores 958-960
vía de señalización 959f
y patrón de meristemos 1409f
y RTK 923t
Avidez de antígeno-anticuerpo 1558
Avogadro, número de 46
Axina 1359f
proteína de armazón 949
Axón(es) **675**f, 1383f
alargamiento 1386f, 1387f
comisurales 1389f
comisurales, guía 1388f
gigante de calamar, experimentos 679f
localización de MAP 1001f
potencial de acción 679f
propagación del potencial de acción 677f
retinianos y tectum 1392, 1393f
y citoesqueleto 1047
Axonema de espermatozoides 1293f
estructura 1031, 1032f
flexión 1033f
Ayuste del RNA **347**, 348f, 349, 350f y sigs.
del RNA, plasticidad 354, 355
AZT 1523
Azúcar(es) **55**, 56f
derivados de 113f
unión a una base 116f
y canales bacterianos 675
Azúcar-fosfato 3f
Azufre, orbitales electrónicos 48f

B

BAC 541
Bacillus anthracis 1493
anthracis, genoma secuenciado 18t
subtilis, y duplicación génica 19, 20f
Bacilo 1490f
Bacteria(s) **16**, *véase también Escherichia coli*
adhesinas 1503, 1504
árbol filogenético 15, 16f
ATPasa SecA 731, 732f
ATPasas de transporte 665f, 666f
barriles β 635f
base del codón en balanceo 369f
cambios de fase 454
cambios de fase y DNA 454, 455f
canal de K^{+} 672f, 673f, 674
citoesqueleto 988-991
"cromosoma" 202
cromosomas artificiales *véase* BAC
en bastoncillo 14f
en espiral 14f
entrada en la célula 1508f, 1509f
esféricas 14f

estructura 14f
estructuras superficiales 1490f
factores de elongación 377
formas 1490f
fotosintéticas y evolución 872, 873f
genoma secuenciado 18t
Gram-negativas 665f
hélices α transmembrana 635
inserción de porinas 717
intercambio genético 22
litótrofas 15f
lugar de inicio de traducción 380
lugar de unión de antibióticos al ribosoma 384f
macromoléculas 62f, 63t
mecanismo inductor 1509
mecanismo tipo cremallera 1509
membranas, composición 624t
motilidad y dineína 1033
mRNA policistrónico 380, 381f
mutagénesis 556
mutantes sensibles a la temperatura 557f
mutantes y respuesta SOS 311
no patógenas 1491f
nucleasas de restricción 533
número de genes 17, 18t
obtención de energía 839, 840f
origen de replicación 282
osmolaridad 663, 664f
oxidación de ácido fórmico 871f
patógenas **1489-1494**
precursoras de eucariotas 697, 698
producción de antibióticos 1524
proteína de regulación génica 418t
púrpura, cadena transportadora de electrones 876f
púrpura, centro de reacción fotoquímico 849f
púrpura, fotosistema 853, 854f
quimiotaxis 942 y sigs.
regulación génica con bucles de DNA 236-438
relación superficie/volumen 698
replicación 283f
RNA polimerasa 340
RNA polimerasa y control génico 438, 439
señales de control de la población 880
simbiosis con células 27f
tipos moleculares 55t
transportador ABC 183f
transposones 318f
Bacteriófago 21, 1491
definición 319
Mu 319
T4, horquilla de replicación 276f
Bacteriófago lambda 151f
ciclo vital 325f
proteínas reprimidas mutuamente 456-458f
recombinación conservativa específica de lugar 324, 325f
represor 416
Bacteriorrodopsina **640**f, 641f
estructura 10f, 641f
Bacteroides 1502
Bak, proteínas 1122, 1123f
Balanceo 369f
Balsas lipídicas **625**f, 899
BamHI, endonucleasa 542f
Banda(s) clara del sarcómero 1027f
de adhesión 1142, 1143f
de cromosomas politénicos 236, 237f
de DNA 203f
Eve en *Drosophila* 1340f
Ftz en *Drosophila* 1340f
oscura del sarcómero 1027f
preprofásica 1097
proteicas de la SDS-PAGE 518f
Bantam, micro-RNA 1354
Bar, dominio 756f
Barajado de fragmentos 19f
Barbitúricos 686
Barrera a metástasis 1250f
del DNA, mecanismos 229f
entre dominios de membrana 1150 y sigs.
secuencias 227, 228
Barril α transmembrana 634, 635f
Barril β transmembrana 630, 632
Barril doble psi 335f
Base(s) 3f, 109f
apareamiento 62, 266
complementariedad 198f, **199**
definición 53
del RNA 4
estructura 116f
pares de **197**
reconocimiento exterior del apareamiento 417f
reparación 297
reparación por eliminación 298, 299f
unión a un azúcar 116f
Basófilos 1452, 1556
funciones 1453t
Basolateral, superficie 1151
Bastón fotorreceptor 918f, 1432f, 1433f
fotorreceptor, cascada enzimática 920f
recambio de proteína transmembrana 1433f
Bax, proteínas 1122, 1123f
Bazo 1541f
Bazooka, proteína 1361
BB y RTK 923t
Bcl2 antiapoptóticas 1122, 1123f
Bcl2, gen y linfoma en humanos 1127
proapoptópicas 1122, 1123f
proteínas 1121-1123f
y bloqueo de la apoptosis 1127f
Bcl-X_L 1122
BCR 1596, 1597f
y leucemia mieloide crónica 1261f
Bcr-Abl, proteína 1261f, 1262f
BEAF, proteína aislante 453f
Beggiatoa, estructura 15f
Benceno y cáncer 1226f
Benzopireno 1226
Berro, genoma secuenciado 18t
Betaglucano 1184
cadenas GAG 1184t
BH123, proteínas 1122
BH1-4, dominios 1122
BHK21, línea celular 506t
bHLH, familia de proteínas reguladoras de genes 1400t
Biblioteca de cDNA 543f, **544**
Biblioteca de DNA 540-**542**, 543f
humano, construcción 542f
tipos 542
Bicapa 9
de fosfolípidos, formación in vitro 407f
sintética 652f
Bicapa lipídica **59**, 617, 618f-629
artificial 622f, 623f
asimetría 626f, 627
como fluido 621 y sigs.
ensamblaje en el ER 742-745
formación espontánea 620, 621f
función 626, 627f
libre de proteínas 652
separación de fases 625f
síntesis 744f
transición de fase 623f
y colesterol 620f
Bicoid, gen 1332f, 1334f, 1338f
proteína 448f
secuencia reconocida 418t
Bid, proteína 1123f, 1124, 1573
Biestabilidad 1315f
Biestable, circuito 901, 902f
Biliar, canalículo 1443f
Bilis 1443
Biología del desarrollo 466
química 527f
sintética 460
Biorientación de cromátidas hermanas 1083, 1084
Biosfera y comunicaciones 70
Biosíntesis 45 y sigs.
inhibición por retroalimentación 170f
Biotina, función enzimática 167
y coenzima 167t
BiP, chaperona **736**, 768
proteína 770
Biparental, herencia 866
BIR, dominios de IAP 1125
Bisulfito, intercambio y ribozimas 405t
Bithorax, complejo 1342f
Bivalente(s), estructura 1274f
quiasmas 1276f
BLAST, método 531f
Blastocisto de mamífero 1379
y ES 506f
Blastodermo celular 1330, 1331f
celular y destinos celulares 1331f
sinticial 1330
y segmentos de *Drosophila* 1330f
Blastómero 1365
Blastoporo 1367f
Blástula 1363f, **1365**, 1366f
Bloques de sintenia 250
Bloques haplotípicos 561
y selección natural 562f
BMP 939, 1126, 1469
señalización 1441, 1442f
y desarrollo animal 1316t
BMP/TGFβ, familia 1318
vía de señalización 1426
BMP4 1283, 1368f, 1442f
Boca, cáncer de, incidencia 1224f
de dragón *véase Antirrhinum*
Bomba(s) *véase también* Transportador
de Ca^{2+} **660**, 661f
de hidrógeno 836, 837f
de hidrógeno en complejos enzimáticos 835, 836
de Na^+ *véase* Bomba de Na^+/K^+
de Na^+/K^+ **661**, 662f
de Na^+/K^+ y potencial de reposo 671, 672
de protones 827-840
de tipo F **659**, 660f
de tipo P **659**. 660f
impulsadas por ATP 655, 656f, **659** y sigs.
impulsadas por luz 655, 656f,
unidas a membrana 182, 183
Bordetella pertussis 1504, 1505
Borrelia burgdorferi 1501
BP180 1135t
BP230 1135t
Branchless, gen 1382
y desarrollo animal 1316t
Brasinólidos, estructura 1406f
Brasinosteroides **956**, 1406f
Brazo D del tRNA 368f
de palanca, longitud en proteínas motoras 1020f
del cromosoma 205f
T del tRNA 368f
Brca1, gen y terapia contra el cáncer 1258
BRCA2 295t
Brca2, gen y terapia contra el cáncer 1258
BrdU 1422
Breathless y desarrollo animal 1316t
Bri1, receptor vegetal 956
Bride-of-evenless, gen 928
Bromodeoxiuridina *véase* BrdU
Bromodominio 444f
Bromuro de etidio 535
Brote primordio 1402f
vegetal 1408f
Bs1 del maíz 318t
BSE 398, 1498
Bucle(s) de cromatina, método de detección 235f
de cromatina y expresión génica 239
de DNA y regulación génica 436-438
hipervariables de antígeno-anticuerpo 1560, 1561
peptídicos de proteínas de unión a DNA 423, 424f
BudR 310f
α-Bungarotoxina 684, 685
Burbuja de replicación 282f, 284f
Burkitt, linfoma de 1500
BY2, línea celular 506t
bZIP, familia de proteínas reguladoras de genes 1400t

C

C-terminal, extremo y secuencias señal 702
C2C2, familia de proteínas reguladoras de genes 1400t
C2H2, familia de proteínas reguladoras de genes 1400t
C6, familia de proteínas reguladoras de genes 1400t
Cabeza(s) de miosina 1012f
de miosina, actividad motora 1012f
del espermatozoide 1293
hidrofílica 10f
Cadena(s) antiparalelas 135f
β de colágena 1184, 1185f
cebadoras 267f, 268f, 270f, **272**
conductora 268
de DNA 197
de DNA, rotura de una 278
de transporte de electrones 100, **814**f y sigs.
doble de DNA, localización de roturas 310f
H del anticuerpo 1553

H del anticuerpo, clases 1553-1557
H, locus 1563f
invariable 1585
invasión de una 305
invasora, rotura 305f
J 1554, 1555f
L del anticuerpo 1552, 1556, 1557
migración 308
molde 4f
patrón 267f, 268f
polipeptídicas, utilidad 137
respiratoria **817** y sigs.
respiratoria, complejos enzimáticos **832**f, 833f
retrasada 268
retrasada y DNA primasa 272
Cadena transportadora de electrones, comparación 875, 876f
de cianobacterias 873 y sigs.
evolución 870 y sigs.
Cadherina(s) 1132f, **1133**, 1134, 1135t-**1150**, 1370
anclaje a filamentos de actina 1142f
calcio 1135-1138
cambios del patrón de expresión 1141f
clásicas **1136**, 1137f, 1138t, 1177t
con siete dominios transmembrana *véase* Flamingo
desmosómicas 1177t
dominio 1137
E y metástasis 1250
endotelial vascular *véase* VE-Cadherina
estructura 1139f
función 1139f
homóloga a Fat 1137f
inactivadas, consecuencias 1138t
localización 1138t
mezcla selectiva de células 1140, 1141
microvilli 1154f
motilidad 1142, 1143f
no clásicas **1136**, 1137, 1138t
proteína quinasa *véase* Ret
regiones tipo bisagra 1139f
tipo de unión 1138t
unión hemofílica 1137, 1138f
C-Cadherina, estructura 1139f
E-Cadherina 1137f, 1138t, 1140
sistema nervioso 1141f
N-Cadherina 1136, 1138t, 1147
sistema nervioso 1141f
P-Cadherina 1136, 1138t
R-Cadherina 1136f
T-Cadherina 1136, 1137f, 1138t
VE-Cadherina 1138t, 1145
Cadherina 6 1136f
Cadherina 6B y sistema nervioso 1141f
Cadherina 7 y sistema nervioso 1141f
Cadherina 23 *véase* Cdn23
Caenorhabditis elegans 37f, 1489, *véase también* Nematodos
como modelo de estudio 36, 37f
compensación de dosis 476, 477f
desarrollo **1321-1328**
frecuencia de mutación 264
genoma secuenciado 18t
mutantes y conducta 557f
proteínas reguladoras de genes 1400t
CAF-1 291f
Caja MADS, familia de proteínas reguladoras de genes 1400t
TATA 340f, 342f
Cajal, cuerpos accesorios 365f
cuerpos Géminis *véase* GEMS
CAK **1063**f y sigs., 1066t
Calcineurina y transporte nuclear 711f
Calcio, abundancia 47f
activación del oocito 1299, 1300
adhesión celular 1135, 1136
bomba de **660**, 661f
cadherinas 1137, 1138, 1145
canal de K^+ activado por 690
canal y unión neuromuscular 697f
canales liberadores sensibles a IP_3 910
canales musculares liberadores de 1029f
canales regulados por voltaje 682
canales TRPC 1388, 1389
como mediador celular ubicuo 912
como mensajero 894
concentración citosólica 912, 913f
concentración citosólica y contracción muscular 1028-1030
concentración y oocito 912f
exocitosis 804
extracelular 652t
indicadores fluorescentes 595, 596, 597f
intracelular 652t
liberación inducida por Ca^{2+} 914
orbitales electrónicos 48f
oscilaciones 912, 913f, 914
quinasa dependiente de *véase* MLCK
reacción acrosómica 1298
respuesta celular 912, 913f, 914
secuestro y ER 726
selectinas 1145
tropomiosina 1030f
uniones tipo gap 1161, 1162
Calcio/calmodulina, estructura 914f
Caliptra 1407f
Callos 568
de células vegetales 504f
Calmodulina **914** y sigs.
forma 144f
y contracción muscular 1030
Calnexina **738**, 739, 768
Calor y energía 118f
y metabolismo 66 y sigs.
Calreticulina **738**, 739
Cámara digital sensible en microscopia 584
Cambio(s) conformacionales de integrinas 1170, 1171, 1172f
de clase 1562, 1568, 1569f
de fase **454**, 455f
cAMP, canales catiónicos regulados por 917
como mensajero 894
degradación 907f
fosfodiesterasa de 907f
síntesis 907f
y señalización extracelular 906f
y transcripción génica 900f
Campo morfogénico 1313f
CAM-quinasa 914 y sigs., 936f
II **915**
II y oscilaciones de Ca^{2+} 916f
Canal(es) **653**f y sigs.
bacteriano de K^+ 672f, 673f, 674
de agua de acuaporina 633f
de fuga de K^+ **669**, 671
de membrana y registro de zona 681
de unión, calibre 1159f
intercelulares **1158-1164**
liberadores de calcio sensibles a IP_3 910
tempranos de K^+ 688f, **689**, 690
transmembrana 651
TRPC 1388
Canal regulado
mecánicamente 668f, 669
por iones 669
por ligando 668f, 669
por nucleótidos 669
por transmisor 669
por voltaje 668f, 669
Canales catiónicos regulados
por cAMP 917
por GMP cíclico 917
por voltaje **676** y sigs., 692t
por voltaje y evolución 682
Canales de Ca^{2+} 660, 661f
regulados por voltaje 682
Canales de Cl^-
estructura 674f
y fármacos psicoativos 686
Canales de K^+
activados por calcio 690
estructura 674f
inactivación 678f
modelo de la bola y la cadena 678f
regulados por voltaje 678
y registro de zona 681f
Canales de Na^+
inactivación automática 677, 678
ley del todo o nada 680, 681f, 682
neuronales 676f, 677f
regulados por voltaje 676-678
Canales iónicos **667**, 668f y sigs.
diseño de fármacos 686
proteína G 916, 917
regulados por nucleótidos cíclicos 917
regulados por transmisores 682, **683**f y sigs., 892, 893f
regulados por voltaje 692t
selectividad 668, 669
unión neuromuscular 687f
Canalículos óseos 1470
Cáncer(es) **1205-1268**
agentes infecciosos **1499-1500**
anormalidad cromosómica 1231
búsqueda de genes críticos 1239, 1240
cervical 1228t, 1499
cervical, detección precoz 1212
cervical, etapas del desarrollo 1212f
cervical y papilomavirus 1248f
colono-rectal **1251**, 1252f
colono-rectal no polipósico hereditario *véase* HNPCC
como macroevolución **1205** y sigs.
crecimiento 1222, 1223
de células basales cutáneas 951
de colon 295t
de colon, cariotipos 1254f
de colon hereditario no poliposo *véase* HNPCC
de colon, secuencia de cambios genéticos 1255f
de colon y apareamiento de DNA 1253, 1254
de hígado y aflatoxina 1226f
de mama 295t
de origen vírico, distribución mundial 1228t
de ovario 295t
de piel 295t
de próstata 295t
de pulmón de células pequeñas 1256
de pulmón, tiempo hasta hacerse aparente 1210
de vejiga 1226f
desarrollo gradual 1210, 1221
diferencias de expresión del mRNA 414f
edad 1229f, 1265
gástrico 1503
gen *Ras* 1233
genes 1230
genes supresores de tumores 1247-1249
hepático 1500
humano, evolución histórica 1229f
humano y senescencia celular 1217
humanos y vías de señalización 1243f
incidencia de los tipos 1206, 1207f
incidencia por países 1224f
MDR 666
microchips de DNA 575
mortalidad 1206, 1207f
mutación 265
mutaciones somáticas 1208, 1209
nomenclatura 1206, 1207
número de mutaciones 1209, 1210
origen monoclonal 1207-1209f
prevención **1224** y sigs.
rayos X 1106f
recombinación homóloga 310
resistencia a las terapias 1259, 1260
señales de proliferación defectuosas 1107, 1108f
señalización celular 881
tabaco 1266
tecnología de células híbridas 508
terapia de respuesta inmune 1262, 1263
terapias con diseño de moléculas 1260-1262
terapias simultáneas 1263f
terapias tradicionales 1257
testicular 1257
tiempo hasta hacerse aparente 1210f
transiciones epitelio-mesenquimáticas 1141
tratamiento 1256-1265
Canceroso hereditario, síndrome 1234, 1235
Candida albicans, traducción del codón CUG 383
CAP 435
fragmento de 420f
proteína activadora 435
secuencia reconocida 418t
y control de *Lac* 437f
Capa basal, células madre 1420
Capacitación de espermatozoides 1297
in vitro 1297
Caperuza 5', eliminación 492
y 347f
unión a extremo 5' 345 y sigs.
Capilares, estructura 1446f
Capilares tras una lesión 1448f
Cápside **1497**f
de poliovirus 1489f
de virus 149f
de virus y cambio de pauta de lectura 383
CapZ de las bandas musculares 1003
Cara *cis* del Golgi 772
trans del Golgi 772
Caracteres poligénicos 563
Carbamil fosfato sintetasa, túnel 167, 168f

Carbohidratos 55, 56
capa **36**, 637f
Carbonilo, grupo 55
Carbono 14 46f
abundancia 47f
celular 54, 55
ciclo del 71f
enlace 50f
esqueletos 106f
estructura del átomo 46f
fijación 69, **841** y sigs., 844f, 845f,
véase también Fotosíntesis
orbitales electrónicos 48f
Carbono-carbono, enlaces 50f
unión y ribozimas 405t
Carboxilo, grupo 55, 114f
reacción de transferencia 84f
Carboxipeptidasa 167
Carbunco *véase* Ántrax
Carcinogénesis 1208
Carcinógeno(s) 556, **1225** y sigs.
activación 1226f
identificación 1229, 1230
químicos 1208
unido a guanina 1226f
Carcinoma(s) cutáneos 1226f
de células basales 1207
definición 1206
CARD 1119
Cardíaca(s), células musculares **1463**, 1464
fibra muscular y acetilcolina 886f
Cardiolipina 816, 817f
estructura 868f
Cardiomiopatía familiar hipertrófica 1031
predisposición genética 563
y agentes infecciosos **1500-1501**
Carga **749**, 750f
Cargador de la abrazadera **274**, 275f
de la helicasa 283f
Cariocarcinoma 1257
Carioferinas 708
Cariotipo 203f, **204**
de cáncer de colon 1254f
del diablo de Tasmania 1266
y cáncer cervical 1212
Carpelos 1401f, 1412f
Carrier *véase* Transportador de membrana
Cartílago 1470
crecimiento 1470f
secreción de matriz extracelular 1179
Cascada de fosforilación 895
de MAP-quinasas 1103,1104f
de señalización 894
enzimática amplificación 920f
Caseína quinasa 1 *véase* CK1
Casetes de unión a ATP 183f, 665f
mecanismo 456, 457f
silenciosas 456
Caspasa-8 1124
Caspasas **1118**
dominio de reclutamiento *véase* CARD
humanas 1119t
Casquete de ATP y citoesqueleto 979f
de GTP y citoesqueleto 979f
Catalasa(s) de peroxisomas 721
distribución celular 747f
forma 144f
y difusión 163
Catálisis 65 y sigs.
ácida 160, 161, 164f
ácida y básica 164f
básica 160, 161, 164f
enzimática **159** y sigs.
Catalítica, acción 6f
Catalizador(es) **159**
biológicos, evolución 406
y energía de activación 73f
Catástrofe **977**, 1080, 1081f
factores 1004, **1080**, 1081f
Catenina(s) 995, 1000, 1001f
función 1142f
α-Catenina 1135t
β-Catenina **949**, 1135t, 1142f, 1145, 1252t, 1359f
degradación 948 y sigs.
gen y cáncer de colon 1253
γ-Catenina 1135t, 1142
estructura 1144f
Catenina-P 120 1142f, 1145
Cátodo del microscopio electrónico 605
Caulobacter crescentus, forma 991f
Caveola 790f
Caveosoma 790
CBC 353f
CBP 908
CCAAT/proteína de unión activadora 1475
CCD, cámaras con 584, 591
CCR 5, receptor 1505, 1506f
CD3, complejo 1592t
y TCR 1590f, 1591f
CD4 1592t
correceptor 1581f, 1582
proteína de superficie celular 1505, 1506f
y HIV 765f
CD8 1592t
correceptor 1581f, 1582
CD9, proteína 1298, 1299
CD28 1592t
CD31 1550f
CD40, ligando 1591
receptores de 1591
Cdc, genes 1057 y sigs.
Cdc6 **1068**, 1069f
fosforilada 289f
Cdc20 **1064**, 1065f, 1088f
función 1066t
Cdc25 **1063**, 1064f
función fosfatasa 1066f
Cdc42 927t, 931
y organización de actina 1042f
CDH 1239f
Cdh1 1064
función 1066t
Cdk 289f
cáncer 1243, 1244f
como elemento integrador 177f
control del ciclo celular **1061**, 1062f y sigs.
inactividad en fase G1 1100, 1101
proteínas inhibidoras *véase* CKI
quinasa activadora *véase* CAK
regulación 177, 178
regulación mediante fosforilación inhibidora 1064f
replicación eucariótica 289f
Cdk-ciclina complejos 1062f y sigs.
inhibición por CKI 1064f
Cdk-G1 **1062f**, 1063t y sigs.
y mitógenos 1103, 1104f
Cdk-G1/S **1062f**, 1063t y sigs.
y mitógenos 1103, 1104f, 1105
Cdk-M 1062f, **1063t** y sigs., 1088f
defosforilación e inicio de la mitosis 1074, 1075
ensamblaje del huso 1078, 1079
entrada en mitosis 1071, 1074
mecanismo de activación 1074f
y Sic1 1101
Cdk-S **1062f**, 1063t y sigs., 1104f, 1105
Cdk4 1243, 1244f
Cdk4-ciclina D 1104f
Cdn23 1137f, 1138t
cDNA 537
clones 543f, **544**
clones y PCR 546f
síntesis 543f
y microchips de DNA 574
Cdt1 289f, **1068**, 1069f
Cebador de RNA **272**, 283f
de RNA, síntesis 272f
CEBP, familia 1475
Ced3 de nematodo 1327, 1328
Ced4 de nematodo 1327, 1328
Célula-célula, interacciones y desarrollo embrionario 1324f, 1325
Celular(es), comunicación **879** y sigs.
control de la división **1101** y sigs.
cultivos **501-510**
determinantes del destino 1099
diferenciación 1355, 1356
respuesta 1540
senescencia replicativa 293
suspensión 510
terminal, diferenciación 1420
tipos, origen **453** y sigs.
tipos y expresión génica **411** y sigs.
Célula(s) 1 y sigs.
a/α de levaduras 455
absorbentes intestinales 1436f, 1437f
acompañantes 1405f
adhesivas 1041f
adiposas *véase* Adipocitos
aislamiento 501 y sigs.
almacenamiento de energía 91-95
alveolar 1427f
alveolares tipo I 1434, 1435f
alveolares tipo II 1434, 1435f
amplificadoras transitorias 1216, **1421** y sigs.
amplificadoras transitorias tumorales 1219f
animal, tamaño 579, 580f
apoptóticas 884, 885f
apoptóticas, reconocimiento 1117, 1118f
β del páncreas *véase* Insulina
basales 1419f
basales y neuronas olfativas 1430
caliciformes intestinales 774f, 1436f, 1437f
caliciformes pulmonares **1434-1436**
características universales 1-15
cartilaginosas *véase* Condrocitos
cebadas, secreción 804f
cerebrales SCN 461
ciliada sensorial funcional 1431f
ciliadas del oído 1430f
ciliadas pulmonares 1434-1436
citotóxicas naturales 1453
compartimientos internos 695 y sigs.
componentes químicos 45 y sigs.
comportamiento y citoesqueleto 1025 y sigs.
comprometida 1312f
congelación 505
conservadoras de marca 1422
control y tumores 1212
controles sociales 1205
cultivo de placa 502, 504f y sigs.
de guarda 1405f
de la cresta neural, desplazamiento 1036
de la granulosa 1291
de la teca y gen *Sox9* 1285
de Leydig 1294f
de Leydig y células de Sertoli 1285
de mamífero y estudio del ciclo celular 1058, 1059f
de Schwann 680
de Sertoli **1285**, 1294f
de sostén 1429
degradación de la matriz 1193-1195
del estroma y madre hematopoyéticas 1458f, 1459
del tejido vascular embrionarias 1402
desplazamiento sobre sustrato sólido 1036f
desplazamiento y cuerpo de vertebrados 1363 y sigs.
destino 1312
diferenciada DNA 411
diferencias entre tipos 412
efectoras 1543, 1544
embrionarias, clasificación 1370f
en desarrollo y gradiente morfogénico 886
endocrinas 882f
endocrinas y pulmón 1435
endoteliales 1374, 1417, **1445-1450**
endoteliales estrelladas 1446, 1447f
epidérmicas, expresión de genes y maduración 1419, 1420
endoteliales fenestradas 1443f
epidérmicas embrionarias 1402
epidérmicas, producción 1422f
especificada 1312
espermáticas 1401f
espinosas 1419f
eucariota, estructura 27f
extensión convergente 1369f
fagocitarias y patógenos 1531-1533
fotorreceptoras retinianas 1432f, 1433f
frente de avance 1036f, 1040f
fuentes de energía libre 12
fundadora 1323
ganglionares de la retina 1391, 1432f
gliales **680**f, 1360f, **1383** y sigs.
granulares 1419f
hermanas de embrión 1324f
hermanas distintas 1313f
híbridas, tecnología 508, 509f
hija, destinos 1420, 1421
inmortalizadas 505
intercambio de señales 32
intestinales de *Caenorhabditis elegans*, linaje 1322f
intestinales, migración 1440f
L 1140
límite del número de divisiones 1107
matriz, adhesión **1169-1178**
matriz y fibronectina 1191

MDCK 1155f
mecanismos de adhesión 1131 y sigs.
meristemáticas 1404f
mesenquimáticas, unión 1141
métodos de observación 579-615
migratorias, control 1373-1375
migratorias de peces 1037f
mioepiteliales de la glándula mamaria 1427f, 1428
mutantes, generación 1348f
necróticas 1115
nerviosas *véase* Neuronas
neurogliales y PDGF 1102
nodriza y oocito 1290f, 1291
número de genes 10
número de replicaciones 293
obtención por disección 502
organización interna 616-694
parenquimáticas embrionarias 1402
pigmentarias *véase* Melanocitos
plasmáticas 1543
polares de *Drosophila* 1330, 1331f
polarizadas, tipos 806f
postsináptica 682
precursora de adipocitos 1475f
presentadoras de antígeno 1540, 1570
presináptica 682
primeras 405, 406
reagrupación en tejidos **1139** y sigs.
regionalmente determinadas 1312
regulación de filamentos **992** y sigs.
regulación de proteínas motoras **1023** y sigs.
regulación enzimática 169, 170
relación superficie/volumen 698
sanguíneas, formación **1451-1463**
satélite de fibra muscular 1467f
señales externas y expresión génica 413, 415
señales recibidas de uniones intercelulares 1145
somáticas **265**, 1271
superfluas y muerte celular programada 1115-1116
supervivencia e integrinas 1175, 1176
T *véase* Linfocitos T
temporización del desarrollo 1319
tinción 585f
tipos y cantidad de mRNA 412
transfectadas 541
transformadas 1233
tumorales, análisis de cromosomas 1208
tumorales, bases moleculares 1241 y sigs.
túnico-vasculares 846
valores posicionales 1312f, 1313
vecinas, competencia 1110
vegetales pluripotentes 568
vegetales y osmolaridad 663, 664f
vivas y microscopia de fluorescencia 587
vivas y microscopio óptico 583
Células cancerosas
cadherinas 1141
capacidad de invasión 1220
en ambiente adverso *véase* Metástasis
en cultivo 505
expresión del mRNA 414f
inestabilidad genética 1214, 1215
mutaciones somáticas1208, 1209
primera 1207, 1208, 1209f
señales de proliferación 1245f
Células dendríticas 1417, 1418f, 1453, 1527, **1542**, 1571, **1572**f y sigs.
e inmunidad 1537
y linfocito T colaborador 1585f
Células diana 881
de hormonas esteroideas 890, 891
de hormonas tiroideas 890, 891
de vitamina D 890, 891
y linfocito T citotóxico 1573f
y número de neuronas 1126f
Células epiteliales
citoesqueleto 970f
endosomas 798, 799f
segregación 1141
y GPI 807
y TGN 806f, 807
Células ES 1380, *véase también* Células madre embrionarias
clonación terapéutica 1303f
ratón quimérico 1381f
Células foliculares
de *Drosophila* 1290f
y oocito 1290f, 1291
y gen *Sox9* 1285
Células germinales 1271
determinantes de 1282f
e inactivación-X 473
embrionarias *véase* EG
función 265f
primordiales *véase* PGC
Células madre
adultas 1380
definición 1420f
del folículo piloso 1418f
distribución en epidermis 1422f
embrionarias, 505-507, 1380 *véase también* Células ES
especificidad 1479, 1480
fundadoras, población 1424f
ganglionar 1360f
hematopoyéticas 1451, **1454-1456**, 1543f
hematopoyéticas, diferenciación gradual 1456, 1458
ingeniería 1477-1482
iniciales 1360
intestinales 1438, 1439
mesenquimáticas 1469
nicho 1441, 1442f
pluripotenciales **1451-1463**
progenitoras 1217
sensoriales de insecto 1356f
velocidad de división 1425, 1426
y DNA inicial 1424, 1425f
y renovación de tejidos **1417-1482**
Células musculares
cardiacas **1463**, 1464f
de los vasos 1450
isoformas 1465, 1466
tipos 1464f
vías de migración 1374f
Células progenitoras
comprometidas 1458
de granulocitos/macrófagos *véase* GM
linfoides comunes 1543f
tumorales 1217, 1218, 1219f
Celulosa 58, 1196
composición y funciones 1199t
estructura 1197f
orientación dirigida por microtúbulos 1200f, 1201f
orientación y crecimiento vegetal 1199f, 1200
sintasa, genes 1200
y pared celular primaria 1197, 1198f
CENP-A 224f, 229, 230
Centrifugación de microsomas 726
Centríolo 27f, **993**f, 1076f
del espermatozoide 1301
replicación 1078f
Centro(s) buscador de centrosoma 996f
de inactivación X *véase* XIC
de reacción fotoquímico **848**f, 849f y sigs.
de reacción fotoquímico, transferencia de electrones 850f
de reacción fotosintético 642f
de señales embrionario 1368
de señales, localización 1315, 1316
ferrosulfurados 831f
hierro-cobre de citocromo-oxidasa 833f, 834
organizador de microtúbulos *véase* MTOC
señalizador 886
Centrómero 209, **210**f, 1075
de levadura, estructura 229f
formación *de novo* 230
herencia directa 232f
humano 231f
humano, plasticidad 230f
tramo de heterocromatina 229
Centrosoma 27f, **992**, 293f y sigs., 1073f, **1075**
células sin 1081, 1082f
centro buscador de 996f
duplicación 1078f
estructura 1076f
maduración 1079
y formación de microtúbulos 992, 995f, 996f
Cepa de la gripe 1522f
Cera, capa 1405f
Ceramida, estructura 744f
síntesis en el ER 744
Cerebro, cadherinas 1136f
cáncer 414f
conexiones sinápticas y experiencia 1394-1396
humano, mapa 1392f
producción de neuronas 1478f
proteínas, expresión 414f
y acetilcolina 686
α-Cetoglutarato 99
Cetona, grupo 56, 112f
Cetosa 112f
CFCαE 1461t
CFP, colorante 587f
CFTR 667
CG, islas ricas en **470**, 471f
CGN 771f, **772** y sigs.
Chagas, enfermedad de 1510
Chaperona(s) de histona **290**, 442, 443f
Hsp60 388, 389, 390f
Hsp60, estructura 390f
Hsp60, función 390f
Hsp70 388-390f, 715, 716f
moleculares 131, **388** y sigs.
Chaperonina 390
Charcot-Marie-Tooth, enfermedad 1048
CheA 943
CheW 943
CheY 943
Chimpancé, genoma 551
Chips 523
Chk1, proteína quinasa 1105, 1106f
Chk2, proteína quinasa 1105, 1106f
Chlamydia pneumoniae 1500f, 1501
trachomatis, respuesta inmunitaria 1488f
trachomatis y membranas del huésped 1513f
CHO, línea celular 506t
Choque osmótico 510
séptico 1534
Chordin 941
Cianobacterias, cadena de transporte electrónico **873** y sigs., 876f
fijación de carbono 840, 841
Ciclina 177
A 1104f
D 1243, 1244f
E 1104f
G_1, función 1062
G_1/S, función 1062
M, degradación 1065f
M, función 1062
S 1104f
S, función 1062
y control del ciclo celular 1062f
Ciclo de Calvin *véase* Fotosíntesis
de fijación del carbono *véase* Fotosíntesis
de Krebs *véase* Ciclo del ácido cítrico
de la urea 867
de los ácidos tricarboxílicos *véase* Ciclo del ácido cítrico
del carbono 71f
haplo-diploide 554f
Ciclo celular **209**, 1053, 1054f y sigs.
control 1056 y sigs.
eucariota 208f, 285f
interruptor binario 1061
mecanismos de control 505
nucleolo 363f
puntos de control 303
puntos de control y cáncer 1216
replicación 284 y sigs.
retraso por alteraciones del DNA 303, 304
señales de proliferación defectuosas 1107, 1108f
sistema de control **1060** y sigs.
Ciclo del ácido cítrico 97f, **98**f y sigs., 815f, **817**
etapas 122f, 123f
glucólisis 99f
metabolismo 102f
Cicloheximida 384
efectos 385t
Ciclopamina 951
Ciclopía 951
Ciclosoma *véase* APC/C
Ciliada sensorial, célula 1430f, 1431f
Ciliados, fagocitosis 28f
organización 33f
Cilio(s) 966
del epitelio olfativo 1429f
disposición de microtúbulos 1032f
microtúbulos 1031 y sigs.
movimiento 1031f
primario **899**, 1034
SEM 609f
Cin4 del maíz 318t
Cinética enzimática 160f, 162f, 163f
enzimática, representación doble recíproca 163f

Cinetocoro 1072f, 1075, 1076f
empuje hacia el polo 1085f
estructura 1083f
microtúbulos 1035f
papel en la meiosis 1277, 1278
unión a microtúbulos 1083f
y cromátidas hermanas 1082
Cinturón de adhesión **1142**, 1143f
Circuito de alimentación hacia delante 459f
de retroalimentación 457, 458f
de retroalimentación negativa 901f, **902**f
de retroalimentación positiva **901**f, 902f
de transcripción **458** y sigs.
Cisteína 127f, 129f
Cisterna(s) *cis* 771f y sigs.
del Golgi 771f y sigs.
media 771f
modelo de maduración **778**f
trans 771f y sigs.
Cistina en orina 653
Cistinuria 653
Citocalasina 988t
B, estructura 1040f
Citocidas, células *véase* NK, células
Citocinesis 805, **1054** y sigs., 1073f, **1092** y sigs.
en plantas superiores 1098f
localización de reguladores 1097f
mitosis sin 1099, 1100
y fragmoplasto 1097f, 1098
Citocromo **829**, 831f
b 562 137f
b, gen del 861f
b-c_1, complejo 832, 833f
b-c_1, estructura 836f
c, forma 144f
c y apoptosis 1121
c y hemo 831f
oxidasa, complejo **832**, 833f
oxidasa, estructura 834f
oxidasa, gen de 861f
oxidasa, mutación 867
P450 y ER 725
Citocromo-c-GFP 1121f
Citoesqueleto 26, 27f, **965**f y sigs.
bacteriano 988-991
comportamiento celular **1025** y sigs.
cortical, función 646f-648
de células epiteliales 970f
de espectrina 646, 647f
división celular 967f
embrión de *Drosophila* 967f
estructuras estables 969
funciones **965** y sigs.
orgánulos 697
patógenos 1514, 1516f, 1517f
polimerización en el tiempo 978f
proteínas motoras 1011
protofilamentos **971**, 872f
regulación celular **992** y sigs.
superficie apical 969
superficie basolateral 969, 970f
unión a membrana plasmática 1009, 1010
velocidad de formación 972, 973f
Citolítico, efecto del virus 1496, 1497
Citomegalovirus 1536
Citometría de flujo 576, 1059, 1060f
Citonema 1318
Citoplasma 26, 27f, **696**
de oocitos 1287, 1288
Citoplasmática, herencia 865f
Citoquina(s), propiedades 1599t
receptor 765f
secreción 1595
vía activada por 937, 938f, 939t
Citoquininas 1406
Citosina **2** y sigs., 61, 197, 198f
desaminación 298f
Citosol **696**f
ambiente reductor y enlaces disulfuro 636f
pH y transportadores de membrana 657, 658
volumen relativo 697t
CKI 949, 951, **1063** y sigs.
acción 1064f
degradación 1065f
función 1066t
síntesis 1101
Cladosporium fulvum, infección 1532f
Clasificador celular activado por fluorescencia 502, 503f
Clatrina, depresiones recubiertas de **789**f, 790
ensamblaje de la cubierta **751**, 754, 755f, 756f
estructura 754
vesículas recubiertas **751**, 754f, 755f
Claudina 1132f
cordones selladores 1152, 1153f, 1154f
Claudina-1, gen de 1152
Clavata1/Clavata2, receptor 956
Clavata3, gen 1410f
Clon de cDNA 543f, **544**
de cDNA, secuencias codificantes continuas 544
de cDNA y PCR 546f
de DNA genómico 542
definición 507
genómico y PCR 546f
Clonación 1287
de DNA 532, **540** y sigs.
reproductiva 507f, 508, 1303
terapéutica 507f, 508
terapéutica y clonación reproductiva 1303f
y estudio del desarrollo 1325
Cloranfenicol 384
efectos 385t
lugar de unión 384f
Cloro extracelular 652t
intracelular 652t
orbitales electrónicos 48f
Clorofila 844, **847**, 848
estructura 848f
Cloroplasto(s) 28, 696, 813, **840-855**
árbol filogenético 875f
cadena transportadora de electrones 876f
captación de energía solar 843, 844
del polen 866
estructura 29f, 842f, 843f
evolución 698, 699f
fuerza protón-motriz 853-855f
genoma 699, 863, 864f
mutantes diminutos 867
número 857
origen evolutivo 30f, 699
precursor proteico 720f
proteínas transportadoras 854, 855
síntesis lipídica 867
transporte de electrones 814, 815f
transporte de proteínas 713f, 719, 720
Cloroquina, transporte de 666
Cloruro de cesio, método 511
de vinilo y cáncer 1226f
CMC 637, 638f
CML 1208
tiempo hasta hacerse aparente 1210
y gen *Abl* 1261f
y translocación 1231
C-N, grupos químicos 107f
Cnm67p, localización 607f
CO y señalización celular 881, 889
C-O, grupos químicos 107f
CoA, estructura 83f
Coagulación sanguínea 1102
Cob, gen 869
Cobre y transporte de electrones 831
Coco 1490f
Cocobacilo 1490f
Código de histonas 224, **225**, 266
de regulación combinatoria 187
genético 367f
genético estándar, variaciones 382, 383
genético mitocondrial, comparación 861, 862t
Codón(es) 6, **367**
AUA, traducción en mamíferos 383
AUG 380
AUG e inicio de la traducción 488, 489
CUG de *Candida albicans* 383
de inicio 367f
de la metionina 367f
de paro 367f
de paro, función 381f
de paro sin sentido 386
forma de escritura 367f
mitocondriales **860** y sigs.
UAA, función 381
UAG, función 381
UGA, función 381
uso relajado 861
Codón-anticodón, apareamientos correctos 377, 378f
balanceo de apareamiento 369f
y rRNA 377f, 378f
Coenzima(s) 167ft
A *véase* CoA
Q *véase* Quinona
Cofilina en lamelipodios 1038f
y filamentos con ADP 1002
y giro de actina 1002f
Cohesina(s) 1070, 1088f
complejo 1272
cromátidas hermanas 1054, 1070f
separación de cromátidas hermanas 395, 396
Coilina 365f
Coincidencia, detectores intracelulares 897
Coinmunoprecipitación 523
Cola(s) de histonas y fibra de 30 nm 218f
de miosina 1012f
del espermatozoide 1293
hidrocarbonadas de fosfolípidos 618, 619f
Colágena **1184** y sigs.
asociada a fibrillas 1185, 1186t, 1188, 1189f
de la dermis 1418f
de tipo IV 1165, 1166f, 1186t, 1189f
de tipo IV, función 1166, 1167
de tipo IX 1186t, 1189f
de tipo XVII 1135t
en matriz extracelular 1131, 1132f
enlaces cruzados 1187f
escorbuto 1187
fibrilares 1166f, **1185**f, 1186t
forma 144f
formadora de redes 1185, 1186t
membrana basal **1165** y sigs.
modificaciones postranscripcionales 1186, 1187
tejido conjuntivo 1179
tipos 1185, 1186t
triple hélice 146f
volumen 1180f
Colagenasa 502, 1194
Colcemida 988t
Colchicina 987, 988t
Colecistoquinina 1475
Colénquima 1404f
estructura 1404f
Cólera 1489f
genoma de la bacteria 551
y gangliósidos 629
Colérica, toxina 907
Colesterol 115f, **620** y sigs.
e importación nuclear 710
estructura 620f
genes de biosíntesis 575f
influencia en bicapas lipídicas 623, 624
síntesis 83f
síntesis en el ER 744
vía de absorción 791, 792
y proteínas Hedgehog 950
Colina axónica *véase* Segmento inicial
Colipoliposis adenomatosa 949
Colon, adenoma de 1438f
Colonia de macrófagos y RTK 923t
Colorantes fluorescentes 502, 586, 587
Columna de filtración en gel 513
Columnar simple, estructura epitelial 1151
Combinatorio, control génico 464, 465f
Combustión y oxidación biológica 820f
Commissureless, proteína 1389
Compactación de células en embrión de mamífero 1379
Compartimentación en orgánulos subnucleares 242f
Compartimiento(s) alares 1352, **1353**f y sigs.
celulares **695** y sigs.
celulares, relaciones topológicas 700f
del cloroplasto 713f
mitocondriales **713**f y sigs.
nuclear 704
sellado 620, 621f
Compensación de dosis y cromosoma X 473
Complejo(s) antena **848**f, 851f, 1342
ARP 994
Bithorax 1342
de cohesinas 1272
de control de la anafase *véase* APC
de Golgi *véase* Golgi
de lectura de código 225f, 226
de poros nucleares **358**, 359f, 699
de preiniciación **1067**, 1069f
de proteínas de membrana 642
de proteínas reguladoras de genes 447f
de recombinación 1275
de reconocimiento de origen *véase* ORC
de señalización inductor de muerte *véase* DISC
de señalización intracelular 897, 898f

de unión 1154f
de unión de exones *véase* EJC
del poro nuclear *véase* NPC
E2-E3 *véase* Ubiquitina ligasa
enzimáticos respiratorios **819** y sigs., 832, 833f, 835, 836
genes del 864f
histona de acetilasas *véase* HDAC
hnRNP 353f
Hox **1342** y sigs.
lector-escritor 227f
Mre11 310f, 313f
mTOR 935
multienzimáticos 168, 169
piruvato deshidrogenasa 96
prerreplicativo *véase* pre-RC
principal de histocompatibilidad *véase* MHC
promotor de la anafase *véase* APC/C
proteico, tamaño y forma 522
recombinante 1280
remodeladores de cromatina 215f, 216f, 228f, 443f, 444f
remodeladores de cromatina, reclutamiento 446f
silenciador mediado por RNA *véase* RISC
sinaptinémico 1274f, **1275-1276**
translocadores de proteínas **714**f, 715
Complementación 555f
prueba de 558
Complementariedad de bases 198f, **199**
Complemento, activación 1529f
complejo de ataque a la membrana 1530f
componentes tempranos 1528
fagocitosis 788
sistema del 1528, 1542
Comunicación bidireccional 884
celular **879** y sigs.
Concatenación de DNA 1070
Concentración crítica 973f, 976, 977f, 978f
gradiente y transporte pasivo 653, 654f
micelar crítica *véase* CMC
y potencial redox 830f
Condensación(es) 63
de cromosomas 1071
de cromosomas mitóticos 243
del DNA 210, 211
e hidrólisis 85f
reacción **56**, 57f
repetitivas, intermediarios 87f
Condensinas 243, 244f, **1075**f
localización 245f
Condición permisiva de mutantes 1057f
restrictiva de mutantes 557, 1057f
Condroblasto 1179
Condrocitos **1468** y sigs.
Condrodisplasias 1187
Condroitina sulfato 1179
Condroma 1207
Condrosarcoma 1207
Conducción neuronal saltatoria 680
Conducta, déficits y mutación 556
humana y epidemias 1519
Conducto(s) calcóforo 1471f
de Müller, regresión embrionaria 1285
formación 1143f
torácico 1549f
Conexinas 1132f, 1159f
reciclaje en uniones tipo gap 1160f
y células foliculares 1291
Conexión(es) 171
sinápticas cerebrales y experiencia 1394-1396
sinápticas, patrones 1393, 1394f
Conexón heteromérico 1159f
homomérico 1159f
subunidades **1159** y sigs.
Conformación **130** y sigs.
de integrinas, cambios 1170, 1171, 1172f
estable 64f
Congelación rápida y microscopio electrónico 605
Conjuntivo, tejido, matriz extracelular **1178-1195**
Cono(s) de crecimiento 1386f
de crecimiento, cambio de sensibilidad 1389
de crecimiento neuronales 1048, 1049f
de crecimiento y destino de la neurita 1387-1389
fotorreceptor 918, 1432f
Conoide 1510f
Consenso de reconocimiento del DNA 429, 430f
Constante de afinidad 158f
de afinidad de antígeno-anticuerpo 1558
de asociación 158f
de asociación proteica y SPR 526
de disociación 158f
de disociación proteica y SPR 526
de equilibrio 76
de equilibrio de unión de proteínas **157**, 158
de equilibrio y energía libre 77t
de unión del transportador 655f
Contacto guiado en embrión 1140
horquilla-protuberancia de RNA 403f
Contracción muscular **1026** y sigs.
muscular y calcio 660, 1028-1030
Contrarreceptores 1174, 1550
Control(es) combinatorio 425
de calidad y mRNA dañados 385-387
de la actividad proteica 415f
de la degradación del mRNA 415f
de la regulación del entrecruzamiento 314
del ciclo celular, sistema 1053
del complemento, dominio 140f
del crecimiento 1423, 1424
del procesamiento del RNA 415f
del transporte del RNA 415f
negativo de genes 434
positivo de genes 435
postranscripcionales **477** y sigs.
respiratorio **837**, 838
transcripcional 415f
Control génico 411-499
ambiente 32f
combinatorio 464, 465f
RNA polimerasa 438, 439
Control traduccional 415f
mecanismos 489f
positivo 488
Conversión génica 311, **314**, 315f
Coordinación del crecimiento celular 1108, 1109f, 1110f
COPI, vesículas recubiertas 769-**751**, 754f
COPII, vesículas recubiertas **751**, 752, 754f, 759f, 760, 767, 769f
Copias génicas, fluctuaciones aleatorias 476
Corazón, ataque y ES 506, 507
cadherinas del 1138t
respuesta celular inducida 907t
Cordina y desarrollo animal 1316t
Cordones selladores 1152, 1153f
Coriomeningitis linfocitaria *véase* LC
Córnea, estructura de colágena 1189f
Coronavirus, forma 1496f
Corpúsculo(s) basales **1033**, 1034
basales, estructura 1033f
de Barr 473f
polar 1290
polar mitótico 993
Corrales del esqueleto cortical 647, 648f
Corrección de errores de apareamiento 271t, 272, **277**f, 278
de errores por DNA polimerasas 372f
de pruebas **268** y sigs., 270f, 271t
exonucleótica de pruebas *véase* Corrección de pruebas
Correceptor del HIV 1506f
Correceptor-proteínas del complemento, complejo 1596
Corte y empalme, maduración 345
maduración alternativa **479**f, 480f
Córtex celular 996
citoplasmático 646, 1288
Corteza adrenal, respuesta celular inducida 907t
Corti, órgano de 1430f, 1431f
Corticotropina *véase* ACTH
Cortisol, acción 890
estructura 889f
receptor 891f
COS, línea celular 506t
Costra osteogénica 1471f
Cotiledón 1401f, 1402f
Cotraduccional, translocación 724f
Co-transporte ADP-ATP 822, 823f
Cox1, gen 869
CPSF, complejo 357
Cre/lox, sistema de recombinación 567
técnica 1439
Creatina fosfoquinasa 464
CREB **908**, 909f
Crecimiento, atrofia 295t
canceroso 1222, 1223
celular 1102
celular, control **1101** y sigs.
celular, coordinación 1108, 1109f, 1110f
cono 1386f
control 1423, 1424
factores 1108
vascular endotelial, factor *véase* VEGF
vegetal, control 1199f, 1200
Cremallera, cierre rápido 306f
de leucina, motivo 423, 424f
Crescentina 991f
Cresta(s) genital 1283
mitocondriales **817**, 818f y sigs.
neural 1366f, 1367f, **1374**, 1383f
neural, vías de migración 1374f
Creutzfeldt-Jacob, enfermedad 398
CRF humano, gen 252f
Cribajes genéticos de *Drosophila* 1332, 1333
Crick, Francis 196
Crio-EM de alta resolución 612f
Cripta intestinal 1436f
Criptocromos 960, **961**f
Cristalino, cadherinas del 1138t
Cristalografía de rayos X **527**, 528f, 529, 530t
electrónica 641
Cro de lambda 420f, 421f
Cromátida(s) formas de unión 1084f
Cromátidas hermanas 243, 1054, **1273**
resolución 1075
separación 395, 396, 1087f
unión 1070f
Cromatina 27f, 211
altamente condensada, momento de la replicación 285
bucle 235f
complejos remodeladores 215f, 216f, 443f, 444f
de 30 nm 217f
definición 202
del centrómero humano 231f
desplazamiento 239 y sigs.
duplicación 1069, 1070
empaquetamiento 244f
herencia de estados **473** y sigs.
herencia de estructuras 230
inmunoprecipitación 431, 432
interfásica 209f
memoria celular 233f
modelo en solenoide 217f
modelo en zig zag 217f
momentos de la replicación en la fase S 285f
Ran-GTP 711, 712
regulación estructural **219** y sigs.
silenciadora de genes 220
SWI/NF 444f
Cromatografía de afinidad **428**, 429f, 512-514f, 515f
de filtración 512, 514f, 515f
de inmunidad 523
de intercambio iónico 512, 515f
en columna **512**, 513f
hidrofóbica 512, 514f
líquida automatizada *véase* LC
líquida de alta resolución *véase* HPLC
matrices 513, 514f
Cromodominio 446f
Cromómero 234, 235f
Cromoplasto, origen evolutivo 698, 699f
Cromosoma(s) 195, **202** y sigs.
2 de *Drosophila* 330f
artificiales de bacterias *véase* BAC
artificiales de levadura *véase* YAC
bacterianos 202
bacterianos, orígenes de replicación 282
brazo p 554f
brazo q 554f
ciclo rotura-fusión-puente 1247f
circular, horquilla de replicación 269f
condensación 1071
conjunto diploide 554f
desplazamiento en el huso 1085, 1086
división **1067** y sigs.
elementos estructurales 209, 210
en división 195f
en metafase 243f
entrecruzamiento 311
estructura **233** y sigs.
extremos 292
Filadelfia 1208f
gigantes de *Drosophila* 38f
homólogos **202**, 1271
homólogos, entrecruzamiento 312, 1092f
interfásicos 209
interfásicos, organización 234, 236f
mitóticos 209, **243**f y sigs., 1075f

número en las especies 205f
patrón de bandas y diferenciación celular 412
plegamiento **234** y sigs.
plumulados 234f
plumulados, estructura 235f
politénicos **236**, 237f
politénicos, modificación de histonas 238f
puff 239f
segregación 1053f, 1088-1090
sentido de transcripción 339f
sexuales 473, 1271
sueltos y cromátidas hermanas 1087, 1088
unión sin cinetocoro 1082f
X 202, 554f
X, condensación 473
X humano 1284f
X, inactivación 473f, 474f, 475f
X, inactivación y cáncer 1209f
X_m 473, 474f
X_p 473, 474f
Y 202, 554f
Y humano 1284f
Y y determinación del sexo 1284
Cromosomas humanos 203f
3, historia 208f
17, variaciones 259f
22, genes 205f
aberrante 204f
territorios dentro del núcleo 239f
Cromosómica, sinapsis 1276f
Cromosómico, entrecruzamiento 1279
Cruce de RNA 403f
Crumbs, complejo 1156, 1157f
CSF **1459**, 1460
macrófagos 1460, 1461
neutrófilos 1460, 1461
subunidades 1461f
c-Src, protooncogén 1232
CstF, complejo 357
CTCF, proteína de ratón 470f
CTD 341f, 346
CTLA4 1592t
CTR1, señalización en vegetales 958
CtxA 1492f
CtxB 1492f
Cubierta del oocito 1288
pérdida y entrada en la célula 1506
proteínas de 759
vesicular 751
vitelina 1288
Cubitus interruptus, proteína latente reguladora de genes 951
Cuerpo(s) accesorios de Cajal 365f
apoptóticos 1115
de procesamiento *véase* Cuerpos P
Géminis de Cajal *véase* GEMS
medio 1094f
multivesiculares **795**f, 796f
P 494, 495f
residuales 787, 788
Cullinas 184, 186, 189f
Cultivo(s) celular 501-510
celular, inhibición por contacto 1234f
de callos 568
de células ES 1481f
de células humanas 556
de mioblastos 1465f
de placa 502, **504**f y sigs.
de queratinocitos basales 1421
primario 504
y hematopoyesis 1459
Curare 686
Cutícula 1405f
CXCR4 receptor quimiotáctico 1375f, 1505, 1506f
Cy3, colorante 587f, 587f
Cys-Cys-His-His, dedos de zinc 422f

D

D, segmento antigénico 1563f
Dador de enlaces de hidrógeno 417f
Dally, cadenas GAG 1184t
gen 1184
Dally-like, gen 1184
DAPI, agente intercalante 477f
colorante 587f
Dbx, proteínas reguladoras génicas 1372f
DCC y netrina 1388f
Decapentapléjico *véase* Dpp
Decapping 492
Deconvolución 589, 590f
Decorita 1166f
cadenas GAG 1184t
estructura 1182f
Dedo(s) de zinc **421**, 422f
de zinc Cys-Cys-His-His 422f
GL1 427f
moldeamiento por apoptosis 1116f
TTK 427f
Zif 427f
Defensas epiteliales 1526f
Defensinas 1526-1527
Degradación de lisosomas 782-784f
Degrons 393
Deinococcus radiodurans 552
Deleción 555
Delta 946, 1132, 1324f
inhibición letal mediada por 947f
y desarrollo animal 1316t
Delta-Notch, señal 1384
Dendrita(s) **675**f, 1383f
alargamiento 1386, 1387f
cambios rápidos 1050f
crecimiento 1387f
localización de MAP 1001f
y citoesqueleto 1047
Dendríticas, células e inmunidad 1537
Densidad e inhibición de la división celular 1110
Dependencia de anclaje 1175, 1176
Depresión(es) a largo plazo *véase* LTD
fármacos para 686, 687
predisposición genética 563
recubiertas de clatrina 754, 755f
Dermatán sulfato 1179
Dermis 1418f
Desacoplante del tejido graso marrón 838
Desaminación 296, 297f, 298f
Desaminasa inducida por activación *véase* AID
Desapareamiento de bases *véase* Balanceo
Desarrollo animal, mecanismos 1305 y sigs.
cambio de respuesta de células 1325, 1326
celular, temporización 1319
control génico combinatorio 464, 465f
de *Caenorhabditis elegans* **1321-1328**
de *Drosophila* **1328-1341**
de la glándula mamaria 1426-1428
difusión de señales 1318
embrionario de *Drosophila* 1329
gradiente de señales 1319f
pluricelular dirigido por el genoma 31, 32
temporización 1326, 1327
temporización y genes heterocrómicos 1326, 1327
vegetal **1397-1415**
Desensibilización **902**, 903f
Desert hedgehog, gen 950
Desfosforilación de proteínas 176
Deshidrogenación 72
Desinapsis cromosómica 1276
Desmetilasa dependiente de hierro 298
Desmielinización y esclerosis múltiple 680
Desmina 985t
filamentos de 1144f
Desmocolina 1135t, 1136, 1138t, 1137f, 1144f, 1177t
Desmogleína 1135t, 1136, 1138t, 1144f, 1177t
Desmoplaquina 1135t
Desmosoma(s) **1133**t, 1134f, 1135t
estructura 1144f
queratina 985, 986f
resistencia mecánica 1143, 1144f
Desmotúbulos 1162, 1163f
Desnaturalización del DNA 536
Desorden, tendencia al 67f
Desoxirribonucleasa, forma 144f
Desoxirribosa 4
estructura 116f
primitiva 408f
Desplazamiento celular 1305, 1306f
de miosina II, mecanismo 1017f
de partículas individuales 644
Desplegasas *véase* Proteínas AAA
Despolarización neuronal *véase* Potencial de acción
Despurinación 296, 297f, 298f
Destino celular 1312
Destoxificación en ER 725
Destrucción regulada de proteínas, control 395, 396
Detección al microscopio óptico 582
de quórum 880
Detector de coincidencias 755, 897
Detergente(s), micelas 638f
no iónicos 638, 639f
y proteínas de membrana 636
Determinación celular 465
celular test, estándar 1312f
Determinada en su destino, célula 1312
Determinante(s) antigénicos 1545, 1553f, 1558f
de células germinales 1282f
del destino celular 1099
Dextrógira, hélice 146f
Dfd, gen 1343f
DHFR 471f
DHFR, gen y terapia antitumoral 1260
Diabetes infantil 1549
predisposición genética 563
tipo I y ES 506
DIABLO y apoptosis1125
Diacilglicerol 909, 911f
como mediador intracelular pequeño 910
como mensajero 894
Diacinesis 1276
Diáfisis del hueso 1472
Diafragma de hendidura 1164f
Diana para proteasas y purificación de proteínas 515
Diarrea sangrante *véase* Disentería 1491
y diseminación del huésped 1518
Dicer, enzima 494f
Dickkopf y desarrollo animal 1316t
Dictiosoma 752f, **771**f y sigs.
organización 779
Dideoxi, método 549, 550f
Didinium y fagocitosis 28f
Diente de dragón, regulación ambiental 32f
Dieta y cáncer 1224f
Diferenciación celular 465
cáncer 1215, 1216
expresión localizada de genes 1355, 1356
irreversibilidad 411
terminal 1420
Diferenciación embrionaria 1140f
Difracción de rayos X 527 y sigs.
de rayos X y estructura del DNA 197
efectos ópticos 581
en el microscopio óptico 582f
Difusión 74
a través de bicapa 652
en el NPC 705
facilitada *véase* Transporte pasivo
lateral de proteínas de membrana 643, 644f
por transportador 655f
reacción limitada por 168
rotacional 642
simple, velocidad 655f
Dig4, proteína de armazón 1148f
Digestivo, sistema 1436 y sigs.
Digitalización de imágenes microscópicas 584
Digoxigenina 536f
Dihidro uracilo 370f
Dihidrofolato reductasa *véase* DHFR
Dihidrolipilo deshidrogenasa 96f
Dímero(s) de actina, estructura 1007f
de histonas 212f, 213, 214f
de timina y UV 297f
H2A-H2B 290, 291f
N,N-Dimetil guanina 370f
Dimetil lisina 222f
Dimetilbenzo(a)antraceno *véase* DMBA
Dinactina 1022
Dinamina **757**, 758f
mutaciones 758f
Dineína(s) **1014**, 1015f, 1077f
axonemales 1015f
ciliar, estructura 1032f
ciliar, mutaciones humanas 1032, 1033
cilios 1031 y sigs.
citoplasmáticas 1014, 1015f
en flagelos 1032f
golpe de potencia 1019f
mitosis 711
patógenos intracelulares 1517
unión a orgánulo 1022f
Dinitrofenilo *váse* DNP
Dinoflagelados, organización 33f
Dióxido de carbono, fijación 12 y sigs.
de carbono y bicapas 652
Diploides, células 1270f
organismos 1090, **1269**
Diploteno 1276

Dipolos de agua, orientación 54f
permanentes 50
Disacáridos 113f
formación 57f
tipos 57f
DISC 1120f
Disco(s) imaginales de *Drosophila* 1331, 1350f
imaginales y señales morfogénicas 1353f
intercalados 1142
Z del sarcómero 1026, 1027f, 1028f
Discs-large, proteínas 1148f, 1155
Disentería 1491
Dishevelled, gen 1158
proteína armazón 949
Disminución de receptor y regulación 903f
Disqueratosis congénita 294
Distal-less, expresión 1351f
Distonina 1135t
Distrofia muscular 1173t, 1467
ES 506
plectina 1006
Distroglucano 1167
Disulfuro, enlaces en el citosol 636f
isomerasa, proteína *véase* PDI
Disyunción, no 1279
Diversificación combinatoria 1564
de la unión 1564
División(es) amplificantes transitorias 1423, 1424
asimétricas de *Caenorhabditis elegans* 1323f
asimétricas y receptor Frizzled 1358, 1359
de segmentación 1058f
patrón en embrión de nematodo 1324f
vegetal orientada 1406, 1407
División celular 1
asimétrica 1098, 1099f, 1314f
aumentada y cáncer 1216f
bacteriana 988-991
control 1101 y sigs.
inhibida por densidad 1110
miosina 1022, 1023f
mitógenos 1102 y sigs.
número y temporización 1327
plano 1095-1097
retraso 1103
DMBA 1226, 1238
DNA 2 y sigs., **62**, 144f, 195-262
a proteína 331f
a RNA 331 y sigs.
aceptor de enlaces de hidrógeno 417f
agentes que dañan y cáncer 1225, 1226
alteraciones espontáneas 296f
amplificación 545f
análisis **532** y sigs.
análisis del contenido 1059, 1060f
apareamiento erróneo y cáncer 1253, 1254
apertura de la doble hélice 273f
bacteriano 2, 202
bandas y electroforesis en gel 534, 535f
barrera y complejo lector-escritor 227, 228
bases no naturales 301f
bibliotecas de **540** y sigs.
bucles y regulación génica 436-438
cadenas 197
cambios de fase bacterianos 454, 455f
chatarra 31
clonación 532, **540** y sigs.
clonación con vectores 540
codificante, porcentaje 206f
código de reconocimiento 417f
complementariedad de bases 198f, **199**
complementario *véase* cDNA
concatenación 1070
condensación en los cromosomas 210, 211
consenso del reconocimiento 429, 430f
corte **532** y sigs.
corte y ribozimas 405t
dador de enlaces de hidrógeno 417f
dañado, replicación y cáncer 1247f
dañado y división celular 1105, 1106
de anticuerpos 1562
de cadena sencilla, proteína de unión *véase* Proteína SSB
de cadenas de anticuerpos 1560f
de células diferenciadas 411
de regulación en eucariotas 31
del cloroplasto **855** y sigs.
del cloroplasto, cantidad 857t
descubrimiento de la función 195, 196
doble hélice 3f, 416f
dominio de unión y sistema de doble híbrido 523, 524f
e hidrógeno unido a carbono 417f
egoísta 316
electroforesis en gel 534, 535f
elementos móviles **316** y sigs.
empaquetamiento **202** y sigs.
empaquetamiento y regulación génica 440
errores de copia 246, 247
espaciador 211
estructura **197** y sigs.
estructura y herencia 199, 200
extremo 3' 199f, 267f
extremo 5' 199f, 267f
eyectado por neutrófilos 1533f
fase de síntesis *véase* Fase S
fosforilación y ribozimas 405t
fósil 207f
fragmentos de cadena 62f
fragmentos de restricción purificados 536f
función **197** y sigs.
genes de mantenimiento 1231
girasa 345
glucosilasas 297, 298
glucosilasas y reconocimiento de nucleótido inusual 300f
grupos metilo 417f
hélice, unión de proteínas distintas 438f
herencia del empaquetamiento 232f
hibridación 536
hibridación con RNA mediante sondas 537
horquilla de replicación 266
huellas en el 429, 430f, 431, 535
inicial y células madre 1424, 1425f
inmortal 1425f
intercatenario y enfermedades 295t
inversión química directa 298
lectura **329** y sigs.
leído por proteínas 416, 417
localización de secuencias codificadoras de proteínas 551f
mal apareado, corrección 315
manipulación 501 y sigs., 532 y sigs.
mantenimiento de la secuencia 263-265
mecanismos de reparación y cáncer 1208, 1209
mecanismos de replicación 266
metil transferasa de novo 467
metilación **467**, 468, 472f
metilación y tumores 1213, 1214
microchips 286f, 537, **574f**, 575
microchips y cáncer 1240
migración de cadena 308f
modelo de Watson-Crick 197
molde y RNA 334f
motivos estructurales y regulación génica 416
muescas 278
ocultación de superficie activadora 446f
organización modular y genes con funciones múltiples 1338, 1339f
paso a través de la hélice 281f
patrón 266
polimerización 3
primera demostración de la función 196f
primitivo 408f
protuberancias hidrofóbicas 417f
purificado, marcaje 535, 536f
recombinación **263** y sigs.
reconocido por Cro 421f
reconocimiento de guanina 427f
reconocimiento por p53 424f
renaturalización 306
reorganizaciones reversibles 454
reparación 263, **295** y sigs.
reparación, velocidad 296, 297
reparación y ubiquitinación 395f
repetitivo 207f
replicación 4f, **263** y sigs.
replicación semiconservativa 268f
rotura de las dos cadenas 278
rotura doble y recombinación homóloga 308, 309f
roturas de una de las dos cadenas 278
satélites α 230
señales para la RNA polimerasa 336 y sigs.
síntesis, procesos químicos 267f
síntesis y ATP 87f
sistemas humanos de reparación de doble cadena 1254
sonda de **536** y sigs.
superenrollamiento 344
tensión y transcripción 343, 344f, 345
tipos de bibliotecas 542
topoisomerasas **278**f y sigs.
unidades estructurales 3
unido a homeodominio 421f
unión a dedos de zinc 422f
unión a láminas, 422, 423f
unión competitiva al 446f
vías de reparación 297-299
viral, tamaño 858, 859f
DNA helicasa 182, **273**, 283f
estructura 274f
función 273f
medición de actividad y ATP 273f
mutante en ratón transgénico 568f
y enfermedades 295t
DNA ligasa 272
I y enfermedades 295t
reacción catalizada 273f
vectores plasmídicos 540, 541f
DNA mitocondrial **855** y sigs.
cantidad 857t
mutaciones humanas 866
replicación 857f
DNA polimerasa 266, **268** y sigs., 536f
autocorrección 270
corrección de pruebas 269, 270f
de emergencia 302
η y enfermedades 295t
función 268f
móvil, abrazadera 273
DNA primasa **272**f, 283f
función 272f
DNA recombinante 534
hitos 533t
señales de localización nuclear 705, 707f
tecnología 510, **532** y sigs.
DNA regulador 7, 9f
de Eve 1339f
desarrollo pluricelular 1309, 1310
pauta de secuencia de expresión génica 1309
DNA, secuenciación 196
a gran escala 549
árboles filogenéticos 248 y sigs.
automática 549, 551f
DNA, secuencias
conservadas 207
cortas 418
de función desconocida 252 y sigs.
reguladoras 206
DNA-proteína, interacciones 417 y sigs.
DNP, estructura 1545f
Doble enlace de fosfolípidos 618, 619f, 623f
hélice **197**, 199f
Dodecil sulfato sódico *véase* SDS
Dolicol **737**f, 738f
fosfato 115f
Dolly, oveja 1287
Dominancia negativa 564f
negativa de RTK mutados 924f
ocular, franjas cerebrales 1395f
Dominio(s) AAA de dineína 1019f
barajado de 140f
cadherina 1137
combinaciones más abundantes 141, 142
comunes **140** y sigs.
C-terminal *véase* CTD
de activación 441
de familia Src, estructura 178f
de homología de señalización 899
de Ig **1559**, 1560f
de interacción y señalización intracelular 898, 899f
de membrana 645, 646f
de muerte 1120f
de reclutamiento de caspasas *véase* CARD
de unión a ligando, estructura 891f
de unión al DNA *véase* Homeodominios
de unión del NAD^+ 137f
efector de muerte 1120f
humanos, barajado 142
kelch de la galactosa oxidasa 191f
motores 1011
parejas juntas en proteínas 141, 142
PDZ 1148f
proteicos 131, **136**f y sigs., 348
Dominio SH2 132f, 133f, 136f, 139f, 140f, 141, 153f, **925**, 926f
estructura 926f
forma 144f

frecuencia 141f
rastreo evolutivo 155
Dominio SH3 136f
y Src 178
Dorsal, proteína 1334f, 1335f
Dorsoventral, eje 1364
genes de polaridad de *Drosophila* 1334f, 1335
patrón de *Drosophila* 1335f
Dos fotones, efecto 592f
Doublesex, gen 481f, 482f
Down, síndrome 1279
Dpp, desarrollo animal 1316t
gradiente morfogénico secundario 1336
patrón del disco del ala 1325
proteína 1335f
transcrito 1335f
Drosophila melanogaster 37f
3' UTR 487, 488f
anti-IAP 1125
biblioteca de mutaciones 569
células foliculares 1290f
como modelo de estudio 37 y sigs.
compartimientos alares 1351 y sigs.
compensación de dosis 475, 476
cromosoma 2 330f
cromosomas politénicos 236, 257f
desarrollo 1329f
destinos celulares 1331f
determinación del sexo 479f, 480, 481f, 1285
discos imaginales 1350f
efecto de variegación de posición 221f
esquema anatómico 1328f
gen *Eve* 447
gen *White* 221f
genes *Dally* 1184
genes de polaridad del huevo 1332f-1334
genes *Fgf* 1381
génesis del esquema corporal **1328-1341**
genoma 18t, 551, 1308
genoma secuenciado 18t
gránulos P 1324
homeodominios 138f, 421
IAP 1125
larvas mutantes 1332f
maduración alternativa del RNA 479f, 480, 481f
mitosis sin citocinesis 1100f
mutagénesis 556
mutantes condicionales 568
mutantes de segmentación 1337f
mutantes y genes del desarrollo 1311
ojo 927f
oocito 1333f
organogénesis 465, 466f
preparación de mutantes 570f
proteínas reguladoras de genes 418t, 1400t
receptores nucleares huérfanos 890
relojes circadianos 461, 462f
señalización de Hedgehog 952f
transposones 323
y RNAi 571
Dscam, gen 179f
dsRNA 571f
y patógenos 1535
Dsx, gen 481f, 482f
DT40, línea celular 506t
Duplicación(es) cromosómica, control 1068f
divergencia 255, 256
función génica 40f
génica 3, 4, 18, 19f, **20f** y sigs.
génica, capacidad y evolución de vertebrados 1308
génica y evolución **254** y sigs.
repetidas y genoma de vertebrados 38, 39

E

E, célula 1324f
E1, proteína 1065f
E2, proteína 1065f
E2F, proteína reguladora de genes **1103**, 1104f
E3, fosforilación 395
EB1, proteína 1004f
EBV 551, 1228t, 1487, 1500
genoma del virus 551
Eco RI, endonucleasa 534f, 542f
Ectodermo **1307**, 1365f, 1366
Ecuación de Nernst 670f **671**
Edad y cáncer 1209f, 1229f, 1265
Edematoso, factor 1493
Edición **371** y sigs.
de A a I 484f, 485
de C a U 484
de receptores 1548, 1565
del RNA 477f, **482**, 483, 484f
hidrolítica 372f
EDTA 502
EF1, función 377
EF2, función 377
Efecto de posición **220**, 221f
de posición de variegación 221f
túnel de electrones 834, 835
Efectoras, proteínas 880f
EF-G, función 377
Eficacia de señalización celular 897
Efrina(s) **922**, 1132
desarrollo animal 1316t
señalización bidireccional 923
RTK 923t
EfrinaA 1392
EfrinaB 1393
Efrina-Eph, señalización y epitelio intestinal 1440, 1441
EF-Tu, estructura tridimensional 181f
función 377
unido a aminoacil tRNA 181f
EG 1283
EGF 794, 922, 923f, 1238
captación 811f
desarrollo animal 1316t
RTK 923t
vía de señalización 1426
Egl1 de nematodo 1327, 1328
EGP, función 1102, 1103
Ehlers-Danlos, síndrome 1187
El4α1, línea celular 506t
Eicosanoide 910
eIF 380
EIN3, proteína reguladora de genes 958
EJC 352, 386f
Eje anteroposterior, formación 1341 y sigs.
dorsoventral de insectos y vertebrados 1336f
Elastasa 137, 138f, 139
Elastina 147, 1179, **1190-1191**
enrollamiento 146f
estiramiento 1190, 1191f
Eléctrica, actividad y conexión sináptica 1395f
Electrodenso, material 605 y sigs.
Electroforesis bidimensional en gel **521**, 522f
en gel de campo pulsante 534
en gel de poliacrilamida con SDS *véase* SDS-PAGE
proteínas solubilizadoras 517f
Electrogénica, bomba de Na^+/K^+ 663
Electromicrografía, combinación de métodos 610-612
Electromiografía de membrana celular 618f
Electrón(es) 45
cadenas transportadoras 814f y sigs., **827-840**
cadenas transportadoras, comparación 875, 876f
cadenas transportadoras, evolución 870 y sigs.
de alta energía y ciclo del ácido cítrico 817
efecto túnel 834, 835
enlaces 46 y sigs.
flujo inverso 872, 873f
longitud de onda 604
transferencia en centro de reacción fotoquímico 850f
transferencia y energía liberada 829
transportadores 829, 831, 832f
transporte 82f, 100
Electroporación 566, 597, 598f
Electrostáticas, atracciones 111f
Elemento(s) 1 del genoma humano 207f
de respuesta a Rev *véase* RRE
F de *Drosophila* 318t
genéticos móviles **316** y sigs.
L1 321, 322f
P de *Drosophila* 318t
transponibles *véase* Transposones
eIF2, ciclo del factor 490f
eIF4E, factor 1108, 1109f
Eliminación génica 566f
ELISA, test 588
Elongación, factores 343
factores, función 377, 378
fase 1067
EM, tomografía **612**, 613f
Embarazo, prueba 588
y glándula mamaria 1427f
Embolia cerebral 1127
Embriogénesis de *Arabidopsis thaliana* 1402f
Embriología experimental 1310, 1311f
Embrión, clasificación de células 1370f
crecimiento 1320, 1321
de anfibio 1363f y sigs.
de *Caenorhabditis elegans*, patrón de divisiones 1324f
de *Drosophila*, origen de los segmentos 1330f
de mamíferos y PGC 1282, 1283
de ratón **1378-1382**
de vertebrado, origen del sistema nervioso 1384f
estudio de genes del cáncer 1241, 1242
falta de implantación 1173t
globular 1402f
interacciones celulares **1310** y sigs.
médula espinal 1372f
regresión del conducto de Müller 1285
reguladores 1380
vegetal, estructura 1401f
y control del ciclo celular 1057 y sigs.
Embrionario, centro de señales 1368
desarrollo y cadherinas 1136f
Empaquetamiento celular y gastrulación 1368, 1369
de cromatina 244f
de filamentos 1005, 1006
de moléculas lipídicas 621f
del DNA **202** y sigs.
del DNA, herencia 232f
genómico denso 861
Emplazamiento y activación de la maquinaria proteica 185, 186f
Empuje celular, forma de la matriz 1042f
EMS, células 1324f, 1325
EMT 1141, 1250
Enanismo acondroplásico 1472f
Encefalinas 803
Encefalitis equina oriental, virus1496f
Encefalopatía espongiforme bovina *véase* BSE
Endocítica, ruta 749
ruta y clasificación de proteínas 794f
Endocitosis 749, 750f, 784f, **787** y sigs.
a lisosomas 782
de LDL 793f
mediada por receptor 791, 792
ubiquitinación 395f
Endocrina, señalización 882f, 883f
Endodermo **1307**, 1365f, 1366, 1404f, 1434
Endofagosoma de patógenos intracelulares 1512f
Endolisosoma 781f
Endonucleasa 318t
de maduración del tRNA 370f
β-Endorfina 803f
Endosimbióntica, hipótesis 859, 860f
Endosoma(s) 696f, 749, 550, **751f** y sigs.
de reciclaje 793f, 794f, 797f, 798
proteínas de membrana 807f
recuperación de proteínas 793-795
retrómero 755
volumen relativo 697t
Endosomas tardíos 781f, 784f, **792** y sigs.
cuerpos multivesiculares 795f
ruta hacia 795-797f
Endosomas tempranos, 751f, 782, 784f, **792** y sigs.
apical 799f
basolateral 799f
del epitelio 799f
Endotelina-3 1375
Endotelio 1445
cadherinas 1138t
Energética, conversión 813-878
Energía, almacenamiento **820** y sigs.
de oxidación y ATP 817, 819
de procesos químicos 49f
e importación mitocondrial 716f, 717
electromagnética 69f
fotosíntesis 68 y sigs.
geotérmica, aprovechamiento 13f
glucosa como fuente 57
obtención a partir de los alimentos 88 y sigs.
obtención de las grasas 95, 96f
potencial 69f
reservorios celulares 91-95
transporte celular y ATP 61f
uso celular 65 y sigs.
Energía de activación 72, 73f
disminución 73f
enzimas 160

Energía de enlace
fosfato 845
químico 69f
Energía libre 72, 75, 118f
consumo 1
de Gibbs 119f
de una reacción 76, 77
estándar y ATP 824, 825f, 826
fuentes para las células 12
potencial redox 830f
reacciones viables 75
vida 8
Enfermedad(es) *véase también el nombre de la enfermedad*
apoptosis 1128
autoinmunitarias 1127, 1539, **1549**
bloques haplotípicos 560, 561, 562f
causadas por priones **397**f y sigs.
contagiosas 1488
crónicas y agentes infecciosos 1501
de las fibras rojas deshilachadas *véase* MERRF
de las vacas locas *véase* BSE
de Lou Gehrig *véase* ALS
de Lyme, genoma de la bacteria 551
del legionario 1508
del sueño 1502, 1519
estudio y células ES 1482
genéticas de la queratina 986
hereditarias y ES 508
hereditarias y peroxisomas 723
humanas, predisposición 41
humanas y análisis genético de ligamiento 561f
humanas y plegamiento proteico anómalo 396 y sigs.
humanas y tripletes sin sentido 387
infecciosas **1485** y sigs.
mentales, predisposición genética 563
neurodegenerativas 1479
neurodegenerativas y mutaciones 1048
neurológicas y peroxisomas 722
neurovegetativas y priones 1498
parasitarias **1485** y sigs.
por mutación de la integrina 1172-1174
reparación del DNA 295t
transporte de membrana 653
Enfoque isoeléctrico *véase* Isoelectroenfoque
Engrailed 1338f, 1351
desarrollo en especies distintas 1306f
expresión 1340f, 1531f
Enhancers *véase* Potenciadores
Enlace(s) amida, hidrólisis 161f
anhídrido a fosfato, energía libre 93f
débiles, cambio de número 159f
disulfuro 147f, 148
electrones **46** y sigs.
fosfodiéster 62
fosfoéster, energía libre 93f
iónico 47, 48f, 53t
laterales de filamentos intermedios 983-985
no-covalentes 53t, 54, 55f, 64, 65, 158f
polares covalentes 50
rotura, energía producida 49f
sencillo 50f
S-S y β-mercaptoenol 517
Enlace covalente 47, **48**f, 106f
apolar 51f
formación 48, 49, 71f
polar 47, 51f
tipos 50
Enlace de hidrógeno 51, 52t, **54**f, 108f, 110f
del DNA 197
en proteínas 126
Enlace fosfato
a creatina fosfato, energía libre 93f
energías libres 93f
enol, energía libre 93f
Enlace fosfoanhídro 61
energía libre 93f
Enlace peptídico 59, 128f
formación y ribozimas 405t
tipos 130f
Enlaces dobles 50f
alternos 106f
de fosfolípidos 618, 619f, 623f
Enlaces químicos 47
débiles 110f
eNOS 889
Ensamblaje de vesículas 9
factores 151
proteicos 145f
Enteroendocrinas, células 1437f
Entrecruzamiento 1271, 1274f, **1279**
control de la regulación 314
de cromosomas 311, 312f y sigs., 1092f
de filamentos 1005, 1006
regulación 1280
Entropía 119f
Env, gen del HIV 485f
Envejecimiento prematuro 294, 295t, 568f
y mitocondrias 868
Envoltura nuclear 26, 27f, 200, **704**, 705f
ensamblaje del huso mitótico 1079, 1080
filamentos intermedios 966
mitosis 711, 712f
Envoltura vírica, adquisición 1515f
Enzima(s) 72, **159**
activadora de la ubiquitina *véase* Proteína E1
actividad y ligando inhibidor 173f
ADAR 483
alostéricas, lugares de unión 171
alostéricas y cambio de conformación 171
cinética 160f
cinética de Michaelis-Menten 163
conjugadoras de la ubiquitina *véase* Proteína E2
convertidora de interleuquina-1 *véase* ICE
de desplazamiento de genes saltarines 318t
de recombinación conservativa específica de lugar 326f
de subunidades idénticas 172, 173f
definición 66
del metabolismo lipídico 695
deshidrogenasa, evolución 872, 873f
Dicer 494f
digestivas 137, 138f
energía de activación 160f
especificidad **158** y sigs.
estrategias 166f
función 5, 66, 72, 73, **158** y sigs.
glucólisis 91
límites por difusión 163f
modificadora de histonas 443f
proteolíticas 137, 502
punto de equilibrio de una reacción 78f
receptores acoplados a 684
regulación celular 169, 170
reparadoras del DNA 295
retroalimentación negativa 170f
sustrato, encuentro 73 y sigs.
tipo de catálisis 160, 161
velocidad de desplazamiento 74
Enzima-sustrato, complejo 165f
Eosina, tinción 585f
Eosinófilos 1452f, 1556
ataque 1533f
funciones 1453t
EPEC 1504f
Eph, receptores 1132
EphB mutada 1441f
Epidemias y conducta humana 1519
Epidemiología del cáncer 1229, 1230
Epidérmica, célula madre 1478
Epidermis **1418**f y sigs.
bullosa y plectina 1006
distribución de células madre 1422f
estructura poliestratificada 1419f
interfolicular 1418
renovación **1417-1428**
señales de renovación 1426
vegetal 1405f
Epidermolisis bullosa
juntural 1165
simple 986f
Epidídimo 1294
Epífisis del hueso 1472
Epigenética, herencia **219** y sigs., 471, **472**f, 473
Epigenéticos, cambios y cáncer 1208
cambios y genes supresores de tumores 1236, 1237f
Epigenoma 473
Epilepsia mioclónica 866
y canales catiónicos 682
Epistásico, análisis 559
Epiteliales, células, clasificación 1133, 1134f
Epitelio(s) 1131, **1150** y sigs.
alteraciones 1173t
cara apical 1150 y sigs.
cara basal 1150 y sigs.
cervical y cáncer 1212f
colonización bacteriana 1502 y sigs.
columnar simple 1133, 1134f
compartimientos endosomales 798, 799f
distribución asimétrica de proteínas 645, 646
E-cadherinas 1136
e infecciones 1526f
flexión 1371f
intestinal, motilidad 1143f
intestinal y Efrina-Eph 1440, 1441
membrana basal 1164 y sigs.
mesénquima 1381, 1382
olfativo 917f, 1429f
pigmentario 1432f
polaridad 1155 y sigs.
respiratorio 1435f
sensoriales **1429-1434**
transportadores de membrana 658, 659f
uniones estrechas **1150-1158**
Epitelio-mesenquimáticas, transiciones 1141
Epítopos 1545
marcaje y purificación de proteínas 516f
EPR 831
Epstein-Barr, virus *véase* EBV
Equilibrio químico **76**, 77f
Equivalencia, grupo de 1313f
ER 27f, **723-745**, 751f
acumulación de proteínas mutantes 559f
con polirribosomas 696f
de transición 725
formas estructurales **724** y sigs.
funciones 696, 724
Golgi, transporte 766 y sigs.
hipótesis señal 727f
inserción de rodopsina 735f
liso 696, **725**f
liso, volumen relativo 697t
lugares de salida 767
membrana nuclear 704, 705f
membranas, composición 624t
N-oligosacáridos 772, 775f
origen evolutivo 700f
patógenos intracelulares 1513f
plegamiento de proteínas **736** y sigs.
proteína transmembrana de paso múltiple **734**, 735f, 736
proteínas residentes 736
proteosoma 392
purificación de microsomas 726f
quinesina 1021
rugoso 725f
rugoso, volumen relativo 697t
señal de importación 702t
señal de recuperación 770
señal de retención 736
señal de retorno 702t
transportador ABC 666, 667
vesículas recubiertas 751
vesículas recubiertas de COPII 765f
eRFI, estructura 382f
ERGIC53 y transporte de proteínas 767
Eritroblastos, desarrollo 1459f
Eritrocito(s) **1451** y sigs.
bicapa lipídica asimétrica 626f
bomba de Na^+/K^+ 663
forma y proteínas de membrana 646, 647f
funciones 1453t
membranas, composición 624t
Eritromicina, efectos 385t
lugar de unión 384f
Eritropoyetina 939t, 1459, **1460**
células diana 1461t
Erk MAP-quinasa 929
ERM 994
proteínas 1009, 1010f
Errores de apareamiento, corrección 271t
de meiosis en mamíferos 1281
ES 505, **506**f y sigs., 1283, **1480**, 1481f, 1482
estudio de fármacos 1482
personalizadas 507, 508
Escala de pH 52
Escalador mucociliar 1504
Escamas cutáneas 1419f
Escherichia coli 1490f, *véase también* Bacterias
adhesinas 1503f
cambios en el medio de crecimiento 432
cepa K-12 25
como objetivo de estudio 24, 25
enteropatogénica *véase* EPEC
factores sigma 439t
flagelo durante la natación 943f
frecuencia de mutación 263, 264
genes del flagelo 558

genoma 9f, 18t, 25f
origen de replicación 282
replicación 283f
secuencias GATC 284f
sentido de la transcripción 339f
síntesis de triptófano 433 y sigs.
Esclereidas 1404f
Esclerénquima, estructura 1404f
Esclerosis lateral amiotrófica *véase* ALS
Esclerosis múltiple 680
Escorbuto y colágena 1187
Escramblasa 627
Escritora de códigos, enzima 226, 227
ESCRT, complejos 796f, 797f
Esfingolípido 618
Esfingomielina 618, 619f
Esfingosina 618, 619f
Esófago, cáncer de, incidencia 1224f
Espacio de las vesículas del ER *véase* Lumen
intermembrana mitocondrial 713f y sigs., **816**, 817f
perinuclear 704, 705f
tilacoidal 713f
Espasmos musculares 682
Especialización celular 1305, 1306f
Especies, número 1
supervivencia y variabilidad genética 263
Especificación 20f
Especificidad de señalización celular 897
neuronal 1392
Espectinomicina, lugar de unión 384f
Espectrina **646**, 994, 1008, 1009
estructura 1007f
volumen 1180f
Espectrometría de masas 518, 519f y sigs.
Espectrómetro en tándem 519
Espectroscopia de RMN 529f
Espermátidas 1293, 1294f
Espermatocitos, formación 1281
primarios 1293, 1294f
secundarios 1293, 1294f
Espermatogénesis **1293**
etapas 1295f
Espermatogonias 1293, 1294f
Espermatozoide(s) 1269, 1292-1296
desarrollo como sincitio 1294-1296f
dominios de membrana 645, 646f
fecundación por uno solo 1300f, 1301
humano, estructura 1293f
inyección intracitoplasmática *véase* ICSI
mitocondrias 815, 816f
motilidad y dineína 1033
pieza intermedia 1293f
producción y genes del cromosoma Y 1285
puentes citoplasmáticos 1296f
sección transversal 1293f
SNARE 764
tamaño 1292
Espermatozoide-oocito, mecanismo de fusión 1298, 1299
Espinas dendríticas, crecimiento 1397f
Espirilo 1490f
Espiroqueta 1490f
Espliceosoma **349** y sigs.
de tipo U12 353
función 349 y sigs.
reordenaciones 351f
RNA del 405t
y ATP 351, 352
Esqueleto polipeptídico 125, 126f y sigs.
Esquema Z 852f
Esquizofrenia, fármacos 686
predisposición genética 563
ESR, espectroscopia de 622
Estabilidad de filamentos 1001, 1002
Estabilización del RNA 477f
Estadios del desarrollo de *Drosophila* 1329f
Estado de transición 160
estacionario y cinética enzimática 162f
Estados Unidos, incidencia del cáncer 1225
Estambres 1401f, 1412f
Estatmina 1000
Estereocilios 609f, 966, 1430f, 1431f
Ésteres de forbol 1226
Esterilidad masculina y mutación de la dineína 1032, 1033
Esteroides 58, 115f, 881
Estigma 1401f
Estilo 1401f
Estimulación astral, modelo 1096f
Estimuladora, proteína G 907
Estímulos mitogénicos anómalos 1107, 1108f
Estómago, cáncer 414f, 1228
cáncer, incidencia 1224f
colonización bacteriana 1503
pH 1436
Estomas, estructura 1405f
Estornudos y diseminación del huésped 1518
Estradiol, estructura 889f
Estrelladas, células endoteliales 1446, 1447f
Estreptomicina B, lugar de unión 384f
efectos 385t
Estrés y vía de señalización dependiente de NFκB 951-954
Estrógenos, producción 1285
receptor 891f
Estroma del cloroplasto **719**, 720f, 842f, 843f
del tumor 1221, 1222
Estructura cuaternaria 136
primaria 136
secundaria 136
terciaria 136
Etano, enlace 50f
Eteno, enlace 50f
Etileno, efecto sobre el crecimiento vegetal 1407f
estructura 1406f
hormonas vegetales 957, 958f
vía de señalización 958f
Etioplasto 841
Eubacterias *véase* Bacterias
Eucariota(s) 14
árbol filogenético 15, 16f
atenuación de la transcripción 477f, 478
barriles β transmembrana 635
base del codón en balanceo 369f
ciclo celular 208f, 285f
ciclo celular y replicación **284** y sigs.
compartimientos intracelulares **695**f y sigs.
complejo Sec 731, 732f
complejo tRNA iniciador-metionina 380
complejos de orígenes de replicación 287, 288f
concentración de calcio 912, 913f
control de expresión génica 462
control del ciclo celular **1056** y sigs.
corrección de errores de apareamiento 277f
degradación del mRNA 492f
desplazamiento de la horquilla de replicación 284f
división celular 1055f
elongación de la transcripción 345 y sigs.
ensamblaje de nuevos nucleosomas 289, 290
estructura del mRNA 346f
estructuras de cromatina **231** y sigs.
etapas de expresión génica 415f
factor de inicio *véase* eIF
factores de elongación 377
fase haploide **1269** y sigs.
formación del extremo 3' 357f
gen a proteína 345f
herencia de patrones de modificación de histonas 2990, 291
información genética **26** y sigs.
interruptores génicos 439 y sigs.
líneas celulares 505
localización del DNA 200
metilación del DNA 278
operones 440
origen como depredadores 26
producción de proteínas 399f
región de control génico 440, 441f
regulación génica por bucles 437 y sigs.
secuencias consenso 342f
situación de ribosomas 374f
transcripción 445f
transferencia horizontal de genes 21
transportador ABC 183f, 665f
Eucariotas, circuitos
de alimentación 459f
de regulación génica 458
génicos, complejos 459f, 460f
Eucariotas, evolución
de actina 982, 983
de orgánulos 814, 815
de tubulina 982, 983
por simbiosis **27** y sigs.
Eucariotas, genoma
no codificante 30
secuenciado 18t
híbridos 30
Eucariotas, inicio
de replicación **282-284**, 286-289f
de síntesis 380f
de transcripción 339, 340, 341f, 343f
Eucariotas, proteínas
activadoras de genes 441-444
fosfatasa 176, 177
quinasa 176, 177
reguladoras, número de 440
represoras de genes 445
Eucariotas unicelulares 32, 33
fagocitosis 28f
Eucromatina **220**, 1070
Euglena, mutantes diminutos 867
Euglenoide, organización 33f
Euploides, cromosomas 1279
Europa, incidencia del cáncer 1225
Eve, DNA regulador de 1339f
gen 448f, 449f, 1338f
mutantes 1337f
proteína 448f
Evenless, mutante 928
Even-skipped véase *Eve*
Evolución, canales catiónicos 682
clonal 1212f
complejos ARP 998
de actina 982, 983
de genomas **245** y sigs.
de mitocondrias 855, 859, 860f
de orgánulos **697-699**
de plastidios 855, 859, 860
de tubulina 982, 983
duplicación génica 40f
humana 253
oxígeno 874f
plasticidad de centrómeros 230
secuencias conservadas 252f
Excitadores, neurotransmisores 684
Exclusiones alélicas 1565, 1566
Exocitosis 749, 750, **800-809**
de lisosomas 786
de vesículas secretoras 802f
regulada 804f, 805
Exón 347
definición 206
disposición en genes humanos 348f
longitud 353f
recombinación 257
salto 352f
Exón/intrón, límites, determinación 537
Exonucleasa 3' accesoria y enfermedades 295t
correctora 3' a 5' 270f
Exosoma nuclear 358
Expansión celular vegetal 1406, 1407
clonal 1544
Experiencia y conexiones sinápticas 1394-1396
Exploración genética 556-558
Explosión respiratoria 1533
Exportación nuclear 477f, **485**, 486f, **708**, 709
Expresión de cadherinas, cambios 1141f
monoalélica 472
Expresión génica 7, 331
análisis por la imagen 576
cambio de posición dentro del núcleo 240f, 241f
cáncer 1208
control 411-499
desplazamiento de cromatina **239** y sigs.
DNA regulador 1309f
en organismos pluricelulares **453** y sigs.
estudio 553
genes marcadores 572, 573
herencia **471** y sigs.
microchips de DNA 574, 575
oscilador 1371 y sigs.
patrón y clasificación de cánceres 1264
región nuclear 241f
RT-PCR cuantitativa 573f, 574
ruido biológico 575, 576
señales externas 413, 415
Extensión convergente 1368, 1369f
Extractos celulares 510
celulares, utilidad 511, 512
Extraembrionarias, estructuras 1379
Extremidades de vertebrados, desarrollo 1354
Extremo(s) 3', formación 356, 357f
3', maduración y corte 477f
3', poliadenilación 345, 346
5' y caperuza 345 y sigs.
cohesivos 534f
de los filamentos de actina 975f, 976

no homólogos, unión 303f
N-terminal y regulación de destrucción de proteínas 395
Ey de *Drosophila*, gen 465, 466f
desarrollo en especies distintas 1306f
organogénesis 1362
Eyaculación y capacitación 1297
Eyeless véase *Ey*

F

Factor(es) 1α inducible por hipoxia *véase* HIF1α
ambientales y cáncer 1224 y sigs.
de catástrofe 1004, **1080**, 1081f
de elongación 343
de elongación, función 377, 378
de ensamblaje 151
de inicio de traducción eIF4E 1108, 1109f
de liberación de la traducción humano *véase* eRFI
de liberación de la traducción y codón de paro 381
de necrosis tumoral α *véase* TNFα
de supervivencia 1102, **1126**, 1127f
de transcripción **416** y sigs.
de transcripción de la polimerasa II *véase* TFII
de virulencia **1491**, 1494f
edematoso 1493
ensambladores de cromatina *véase* Chaperonas de histona
estimuladores de colonias *véase* CSF
eucariotas de inicio *véase* eIF
extracelulares y crecimiento 1109f
generales de transcripción **340** y sigs.
inducible de hipoxia-1α *véase* HIF-1α
intercambiadores de nucleótidos de guanina *véase* GEF
intercambiadores de nucleótidos de guanina de Ras *véase* Ras-GEF
letal 1493
mitógenos 1107, **1108**
nuclear de células T activadas *véase* NF-AT
rho y RNA polimerasa 337f
sigma de *E. coli* 439t
Factor de crecimiento 1102, **1108**, 1109f
de fibroblastos *véase* FGF
de hepatocitos *véase* HGF
derivado de las plaquetas *véase* PDGF
endotelial vascular *véase* VEGF
epidérmico *véase* EGF
fibroblástico *véase* FGF
módulo 140f
nervioso *véase* NGF
similar a la insulina-2 *véase* Igf2
transformante β *véase* TGFβ
vascular endotelial *véase* VEGF
y RTK 923t
FAD 817
$FADH_2$ 82, 817, 819, 823
estructura 99f
Fagocitos profesionales 787
Fagocitosis 27f, 784f, **787** y sigs., 806f, 1527, 1532f
activada por anticuerpos 1555f
de patógenos **1528** y sigs.
estrategias bacterianas 1508, 1509f
filamentos de actina 969f
muerte celular 1116f
por macrófagos 788f
por neutrófilos 788f
Fagosomas **787** y sigs., 1453
membrana 1512f
FAK 937, 1135t, 1176f, 1177
Faloidina 987, 988t
Familia(s) de proteínas 137-139
genéticas 20
genéticas universales 24t
GPCR 904, 905
Rho 916, 1042
Rho de GTPasas 931, 932f
Smad 940
SRC 936
Fanerógamas, desarrollo 1401f
estructura 1404f
FAP 1253f
Fármaco(s), acción a través de GPCR 905
administración guiada 598
anticancerosos y p53 1127
destoxificación 725
estudio y células ES 1482
filamentos intermedios 988t
inhibidores de las caspasas 1127
psicoactivos, dianas 686, 687
Farnesilo, anclaje 631f
Fas 1574
ligando **1120**f, 1569
receptor de muerte 1120f
Fasciclina2 1147
Fasciclina3 1147
Fase(s) del ciclo celular 1054 y sigs.
G_1, complejo prerreplicativo 288
M 208f, 284
preparativas 1055
S **284**, 285f
FASTA, método 531
Fat, cadherina 1137f, 1138t
Fat1, cadherina 1138t
Fc, receptores 1597f
Fecundación 1269, 1270f, 1287, **1297-1303**
in vitro *véase* IVF
Fenilalanina 101f, 127f, 129f
tRNA específico 368f
Fenotipo(s) **553**, 554f
complejos, estudios de mutación 556, 557f
condicional 1057
definición 554f
mutante 554f
mutante y función del gen 24f
salvaje 554f
FepA, proteína 635f
Fermentación **90**
alcohólica 90f
producción de ATP 870, 871
Feromonas 917
Ferritina, control de la traducción 492, 493f
Ferrosulfurados, centros **831**f
FG, secuencias 707
FGF 922, 923f, 1465, 1467
desarrollo animal 1316t
vía de señalización 1426
y RTK 923t
Fgf, genes 1381
Fgf10, gen y pulmón 1381, 1382f
Fibra(s) de anclaje 1185
de colágena 1185, 1186t
de cromatina **202** y sigs.
de cromatina y nucleosomas 217f
de DNA 197
del músculo esquelético **1463**, 1464f
densas del espermatozoides 1293f
elásticas 1190f
esclerenquimáticas 1404f
Fibras musculares
estructura **1026**f y sigs.
lentas 1466f
lisas 1468
rápidas 1466f
Fibrilarina 365f
Fibrilina 1191
Fibrillas de colágena 1185f, 1186t, **1187-1188**
de colágena, formación 1187f, 1188f
de fibronectina 1192, 1193f
Fibrina 264
Fibrinógeno, frecuencia de mutación 264
y plaquetas 1174
Fibrinopéptidos 264
Fibroblástico, factor de crecimiento *véase* FGF
Fibroblasto(s) 1417, **1468** y sigs.
cadherinas de los 1138t
caveolas 790f
desarrollo 1469f
desarrollo de adipocitos 1475
en cultivo 504f, 505
en tejido conjuntivo 1179f
matriz extracelular 1468, 1469
microtúbulos 1049f
número de replicaciones 293
PDGF 1102
producción de matriz extracelular 1179
Fibronectina 1165, 1166f, **1191**, 1192f
de tipo III, despliegue 1192f
de tipo III, repetición 1191
distribución celular 1175f
estructura del dímero 1192f
fibrillas 1192, 1193f
módulos 140f, 141f
unión a integrinas 1170f, 1193
Fibrosis quística
genes 560
transporte de membrana 667
transporte en el ER 768
Fiebre 1534
de las Montañas Rocosas 1514
glandular 1500
Fijación de carbono **841** y sigs., 844f, 845f
de nitrógeno 100, 101
Fijadores químicos para el microscopio electrónico 605f
Filadelfia, cromosoma 1210
Filagrina 1005
Filamento(s) alargamiento 999f
alteración de la polimerización 987, 988f
con ADP y cofilina 1002
de actina **965** y sigs.
delgados de sarcómeros 1026 y sigs.
dinámica alterada 1002, 1003
encasquetamiento 1003f
entrecruzados β 397f
extremos 1003 y sigs.
gruesos de sarcómeros 1026 y sigs.
interacción de proteína en los extremos 1002, 1003
polar 1511f
proteínas laterales y estabilidad 1001, 1002
subunidades 970, 971f
transversales 1275, 1277f
Filamentos del citoesqueleto 646, 647, 648f
adaptabilidad 966-969
dinámica 966-969
estructura 965 y sigs.
Filamentos intermedios 27f, 146f, 965, **968**f y sigs., 1135t
anclaje 1133t
desmosomas 1144f
empaquetamiento 1005, 1006
enlaces laterales 983-985
organización 972f
polipéptidos 984f
red 1144f
sobreenrollamiento 983, 984f, 985
tetrámeros 984f
Filamina 994, 1008, 1009f, 1135t
motilidad celular 1009f
Filariasis 1519
Filogenética, huella 431f
Filogenia de patógenos 1488, 1489
Filopodios 996, **1037**
Filtro de selectividad 668f, **672**, 673f, 674f
Fimbrias 1490f
Fimbrina 994, 1008f
estructura 1007f
FITC, colorante 587f
Fitocromo **960**, 961f
Flagelina bacteriana 454
Flagelo(s) 966
bacterianos 1033
bacterianos, motor 943f
bacterianos y mutación 558
control de la longitud 1032
disposición de microtúbulos 1032f
microtúbulos 1031 y sigs.
movimiento 1032f
rotación y gradiente de protones 822, 823f
Flamingo 1137f, 1138t
mutante 1157f
Flavín adenina dinucleótido reducido *véase* $FADH_2$
Flavina y transporte de electrones 831
Flc, locus 1412
FLIP 643, 644f, 753, 1120
inconvenientes 644
Flipasa inespecífica 627
Flip-flop, circuito transcripcional 459f, 622
Floema, estructura 1405f
Flor, estructura 1401f, 1412f
genes selectores homeóticos 1413, 1414f
Flora normal 1486
Floración, activación 1412, 1413
Flowering, locus C *véase Flc*, locus
FLP 1348, 1349
Flp, gen 1348
Fluidez de la bicapa lipídica 621-623
Flujo de microtúbulos **1085**, 1086f
iónico 670f
Fluoresceína 586, 587f
enjaulada 595f
clasificador celular activado por 502, 503f
Fluorescencia pérdida tras fotoblanqueado *véase* FLIP
tras fotoblanqueado, recuperación *véase* FRAP
Fluorocromos orgánicos y microscopía 587

Folículo(s) astral 1292f
en desarrollo 1291, 1292f
linfoides 1550
muerte sin madurar 1292
piloso 1418f
primordial 1291, 1292f
rotura 1292f
Follistatina 941,1527, 1532f
Footprinting 535
Formilmetionina en extremo *N*-terminal de proteínas 380
Forminas 994, 998, 999f, 1000f
anillo contráctil 1094
Formol-Met-Leu-Phe y neutrófilos 1045f
Fosfatasa alcalina en micrografía 588
de fosfoinositoles 933
función 159t
PTEN 933
Fosfatidilcolina 618, 619f
síntesis en el ER 742, 743f
Fosfatidiletanolamina 618, 619f
Fosfatidilinositol 743, *véase también* PI
Fosfatidilinositol 3-quinasa *véase* PI_3-quinasa
Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato *véase* PIP_2
Fosfatidilserina 618, 619f
apoptosis 1117
en células muertas 627
Fosfato(s) 116f
cálcico y hueso 1470
energía de enlace 845
estructura 107f
grupo 55
regulación de proteínas 186t
transferencia 80f, 81f
unido a creatina fosfato, energía libre 93f
Fosfoamida, unión y ribozimas 405t
Fosfodiéster, unión 117f
Fosfodiesterasa 299f
de cAMP 906, 907f
de GMP cíclico 917
y NO 889
Fosfoglicerato 844f, 845f
Fosfoglicérido **618** y sigs.
estructura 619f
Fosfolipasa(s) C 627f, 909
C y fecundación 1300
C-β, acción 911f
C-β y proteínas G 909-911
C-γ **925**, 926f
función 627
lugares de corte 627f
Fosfolípidos 58, 59, 114f, 405
asimetría 626, 627
de inositol 624
de inositol, función 627f
de inositol y proteínas G 909-911
de membrana **618**, 619f
estructura 59f
formación de bicapas 620, 621f
monocapa 10f
movilidad en la bicapa 623f
orientación 59f
proteínas de intercambio de 745
síntesis en el ER 742, 743f
Fosforilación 903f
activación proteica 894
cascada de **895**, 896
de E3 395
de factor de iniciación 488
de histonas 223f
de lámina nuclear 712f
del ORC 289f, 1069f
e importación nuclear 710, 711f
oxidativa 98, **100**f, 660, 695, 817, **819**f y sigs.
oxidativa, evolución 871, 872f
proteica 174, 175, 176f
señalización 180f
Fósforo, abundancia 47f
compuestos y afloramientos hidrotermales 12
orbitales electrónicos 48f
Fosfoserina 222f
Fosfotirosinas, dominios de unión *véase* PTB
residuos como dominios de unión 925, 926
Fotoactivación **593**, 594, 596f
Fotoblanqueado 643, 644f
Fotofosforilación 924
cíclica sin NADPH 853
no cíclica **851-853**
Fotoproteína 960
Fotorreceptoras, células 1432f, 1433f
Fotorreceptores **918**f
de vertebrados 640
vegetales 960, 961
Fotorrespiración **846**
y peroxisomas 722
Fotosíntesis 28, **68** y sigs., 660, 695, 815f, **840-855**
centro de reacción 642f
etapas 70f
evolución 874f
flujo de electrones en tilacoides 852f
primitiva 873f
reacción de transferencia de electrones **843**, 844f
respiración 70f
variación de potencial redox 852f
Fotosistema 814
funcionamiento 484f y sigs.
gen 864f
I 851 y sigs.
I, estructura 853, 854f
II 851 y sigs.
II, estructura 851f, 853, 854f
Fototirosinas de RTK 924, 925f
dominio de unión a 926f
Fototrofos, organismos 12
Fototropina 961
Fraccionamiento celular 511f
Fragmento(s) de Okazaki 267 y sigs.
S1 de miosina 1012f
Fragmoplasto 1098
y citocinesis 1097f, 1098
FRAP **595**, 596f, 643, 644f, 753
inconvenientes 644
Frecuencia de mutación 263
FRET 526f, **593**, 595f
Fringe, familia 947
y desarrollo animal 1316t
Frizzled 1158, 1324f
receptores **948** y sigs., 1358, 1359f
y desarrollo animal 1316t
FRT 1348, 1349
FSH 1291
FTIIE 341t
FtsZ, proteína 989f, 991
Ftz 1338f
Fuerza(s) de van der Waals *véase* van der Waals, fuerzas de
hidrofóbicas **54**, 111f
polar de expulsión 1085, 1086f
protón motriz 821
Fugu rubripes, genoma 31f
Fumar *véase* Cáncer
Fumarasa y difusión 163
Función de dispersión de un punto 589
epitelial de barrera 1150
Fura-2 912
Fused serina/treonina quinasa 951
Fusión de membranas 598f
homotípica de membrana 769f
nucleolar 363f

G

G_0 de diferenciación terminal 1103
estado no proliferativo 1103
fase 1055
G_1, detención del ciclo celular en 1106f
fase 1055f
fase y Cdk 1100, 1101
G_2, fase 1055f
G_{12}, proteína 916
$G_{12/13}$ 919t
GA3, efecto sobre el crecimiento vegetal 1407f
estructura 1406f
GABA 684
canales iónicos regulados por 684, 686
fármacos 686
vesículas sinápticas 808
GAG 1165, 1166f, **1179** y sigs.
cadenas de 776
estructura 1179f
formación de geles 1179, 1180
Gag, gen 383, 485f
GAG y proteoglucanos 1181f y sigs.
Gal4, secuencia de reconocimiento de 418t, 442f
Gal4/uas, técnica 1349f
Galactocerebrósidos, estructura 628f
Galactoquinasa, gen de 442f
Galactosa oxidasa, dominio kelch 191f
Galactosidasa, gen de 442f
β-Galactosidasa 437f
Gameto(s) 1269
como fase haploide 1270, 1271
formación **1272-1274**
haploides 314
producción 1281
producción en la meiosis 1279f
Ganglios humanos, estructura 1551f
linfáticos 1541f, 1549f, 1550f, 1551f
Gangliósido(s) 628
G_{M1}, estructura 628f
G_{M1}, función 629
GAP 179, **708**, 759, 926f
Gap, fases *véase* Fases preparativas
genes **1336**, 1337f, 1338f-1341
regulación del gen 1338f
Gap, uniones tipo 884f, 1133t, **1158-1162**
calibre del canal 1159f
funciones 1161
regulación 1161, 1162f
Garganta, cáncer de, incidencia 1224f
GARP, familia de proteínas reguladoras de genes 1400t
Gases, intercambio pulmonar 1434, 1435f
Gastritis 1503
Gástrula 1363f
Gastrulación 1307f
corta *véase* Sog
de *Xenopus* 1367f
desplazamientos 1366, 1367, 1369f
señales incitadoras 1367, 1368f
GATA1, proteína 451f, 1457
secuencia reconocida 418t
Gcn4, secuencia reconocida 418t
GDI 931
y Rab 761
GDP y Ran 708, 709f
GEF 179, **708**, 758, 759, 896f, 908, 910f
ensamblaje del huso mitótico 1081
proteínas Rho 1044
Gel, análisis de retraso 428f
de agarosa para DNA 534, 535f
de poliacrilamida para DNA 534, 535f
migración de proteínas de unión al DNA 427, 428
vítreo 605
Gelsolina 994
superfamilia 1000
Gemación 1269f
Gemelos idénticos 472, 473f
Geminina 1069
GEMS 363, 364, 365f
Gen(es) 195, **440** y sigs., *véanse también los genes por su nombre*
7SL, RNA del 323f
altamente conservados 17
amplificación 544 y sigs.
amplificación selectiva por PCR 545 y sigs.
AmpR 318f
Apc 950
Ash1 1023f
Bride-of-evenless 928
canales iónicos regulados por transmisor 686
Cdc 575f, 1057 y sigs.
circuito regulador 35f
clonación 540 y sigs.
Cob 869
conservado desde el ancestro común 17f
constitutivos 470, 471f
control transcripcional 415f
controlados por *Mat* 456f
Cox1 869
CRF humano 252f
críticos del cáncer **1231** y sigs.
de anticuerpos 1563 y sigs.
de canales catiónicos 682
de defectos de partición 1156
de efecto cigótico 1336
de efecto materno 1323
de GPCR 905
de histonas en vertebrados 289
de la celulosa sintasa 1200
de la galactoquinasa, activación 442f
de la GFP 593, 594
de la leptina humana 248f
de la leptina y evolución 248f y sigs.
de la plectina, mutación 1006
de la recombinasa Cre 326f
de la regla par 1337f, 1338f-1341

de la secreción 752
de la transposasa 318f
de la α-tropomiosina, maduración alternativa 349f
de los receptores olfativos 452
de mantenimiento del DNA 1231
de mantenimiento del DNA y tumores 1214
de polaridad del huevo de *Drosophila* 1332f-1334
de polaridad del segmento 1337f, 1338f
de proteínas de señalización 880
de reparación de daños, grupo 575f
de resistencia a los fármacos 1524
de segmentación **1336** y sigs.
de segmentación, expresión localizada 1337, 1338
de señalización dorsoventral 1334f, 1335
de síntesis del colesterol, grupo 575f
de transporte transmembrana 651
de virulencia 1491
definición 7, 8, 554
definición nueva 480, 481
del cáncer, descubrimiento 1230
del ciclo de división celular *véase* Genes *Cdc*
desplazamiento en el núcleo 241f
distancia en el genoma 560
distantes, regulación 452
Dscam, maduración alternativa 479f
E6 y papilomavirus 1248, 1249f
E7 y papilomavirus 1248, 1249f
eficacia de expresión 332f
en los cromosomas 204
estudio de la función 195
eucarióticos, región de control 441f
eucarióticos, transcripción 445f
Eve, componentes 447
Eve, franja 2 449f
Eve, proteína codificada 448f
Eve, regulación 448, 449
evolución 16, 17
Ey de *Drosophila* 465, 466f
familias universales 22-24t
fenotipo 554f
función conocida por la mutación 23, 24
gag 383
gap 1336, 1337f, 1338f-1341
heterocrónicos y temporización del desarrollo 1326, 1327
homólogos 246
homólogos de la globina 21f
Hox 1378
Hox, localización cromosómica 1343f
Igf2 de ratón 470f
inactivación genética 1214f
interruptor sencillo 433 y sigs.
Kit, mutación 41f
LacZ 437f
lectura y señales ambientales 32, 34f, 35f
Lin-14, mutación 1326f
localización con sondas 537f
marcadores y expresión génica 572, 573
MHC 1577, 1578f
modificados, inserción en línea germinal 565, 566
múltiples y rasgos complejos 563
mutación y número de mutaciones 264
mutagénesis dirigida 565f
Myc 1238f
NFκB 946
niveles de expresión 34
ordenación en vías 559
p16 1243
p53, acción normal 1246f
p53 y cáncer 1246, 1247, 1252t
per 462f
pol 383
pronucleares 1356
proteínas reguladoras de 1400t
Ras 928, **1233-1234**, 1241
Rb 1234, 1235, 1236f, 1241
redistribución y entrecruzamiento 1279, 1280
reguladores y organogénesis 1362
reorganización en la reproducción sexual 1271
reparto irregular en la meiosis 314
reportero 523, 524f
rRNA 360
saltarines 316 y sigs.
secuenciación y función 22
selectores homeóticos 420, 421, 1337, 1338f, **1341** y sigs.
selectores homeóticos y partes de la flor 1413, 1414f
sensible a la temperatura 557f
silenciados 220
Son-of-evenless 928
Sox9 1285
Sry 1284-1286f
sustituciones en ratones 567f
tempranos inmediatos 929, 1104f
TetR 318f
Tim 462f
Toy de *Drosophila* 466f
transcripción y cAMP 909f
transferencia 21, 22
transferencia horizontal 21
variantes por duplicación 19, 20
White y efecto de posición 221f
Wingless 948
zonas ricas del núcleo humano 240f
Genes, expresión 331
bucles de cromatina 239
control 411-499
desplazamiento de la cromatina 239 y sigs.
errónea en *Drosophila* 1349f
Genes humanos
de la β-globina 200f, 250, 450, 451f, 452f
de la queratina 985
estudios en cultivo 556
exones 348f
herencia en bloques haplotípicos 560 y sigs.
intrones 348f
Genes supresores de tumores 1231, 1232f
identificación 1234, 1235
inactivación 1235-1237
pérdida de una copia 1236f
y cáncer 1247-1249
Genética **553**
de mitocondrias 855-876
del desarrollo 1310
diversidad y meiosis 1271
estudio del desarrollo 1325
historia 195
inestabilidad y tumores 1214
inversa 553, **563**, 564
inversa y proteínas marcadas 564, 565
inversa y RNAi 572
transporte vesicular 752
Genético(s), cambios y genes supresores de tumores 1236, 1237f
mosaico 1348
Génica, conversión 314, 315f
Genoma(s) 8, **195-262**
clasificación 15, 16
completo, secuenciación 551, 552
con homólogos en especies distintas 1308
de *Arabidopsis thaliana* 36, 1399, 1400
de especies distintas, comparación 247 y sigs.
de vertebrados 38, 39
definición **200**, 554
del cloroplasto 699, 863, 864f
del ratón 249 y sigs.
desarrollo pluricelular 31, 32
diversidad 11 y sigs.
errores de copia 246, 247
eucariota, tamaño 30
evolución 245 y sigs.
inestable 295t
secuenciados 18t
secuenciados y genes de proteínas 139
tamaños 31f, 204
víricos 1497f, 1498
víricos, liberación 1507f
Genoma humano 40 y sigs., 248 y sigs.
barajado de dominios 142
características 206f
número de proteínas 200
proyecto 532
secuencia de nucleótidos 205 y sigs.
secuencias repetidas 207f
secuencias únicas 207f
sitios polimórficos 259
Genoma mitocondrial 699
comparación entre especies 861f
humano 861f
Genómica comparativa 431f
Genoteca 540, 541, **542**, 543f
Genotipo 553
definición 554f
sencillo y mutación 556
Gen-proteína, relación 199f
Germinación 1401f
Germinales, hojas 1365f
Gfi1, gen 1458
GFP 185, 186f, 526f, **592**, 593f, 594f, 643, 644f, 857, 1250
colorante 587f
como reportera 593f
estudio del transporte intracelular 753
gen 594
láser 594, 595
G_s, 907, 919t
Giant, proteína 448f
Giberelinas 1406
Glándula mamaria, ciclos 1426-1428
mamaria, estructura 1427f
salival y acetilcolina 886f
sebácea del folículo piloso 1418f
Glanzmann, enfermedad de 1173t, 1174
GlcNAc 774f, 775f-777
fosfotransferasa 785, 786f
regulación de proteínas 186t
transferasa I 752f
Gleevec 1261, 1262f
estructura química 1262f
Glía, células de la **1383** y sigs.
Gliceraldehído 3-fosfato 845f
Glicerol en fosfolípidos de membrana 619f
y canales bacterianos 675
Glicina 127f, 129f, 686
Glioxilato, ciclo del y peroxisomas 722
Glioxisomas 722f
Globina, evolución 256f, 257
familia de genes 21f
genes expresión 450, 451f
β-Globina, familia génica 257f
gen humano 200f
genes 200f, 250, 450, 451f, 452f
transcrito primario y talasemia 355f
Glóbulo(s) blancos **1451** y sigs.
blancos y heridas 1454f
fundido 388f, 389f
rojos *véase* Eritrocitos
Glucagón, respuesta celular inducida 907t
Glucanos de entrecruzamiento, composición y funciones 1199t
vegetales de entrecruzamiento 1196, **1198**f
Glucocáliz 636
Glucocorticoides, expresión del receptor 463f
expresión génica 413, 415
Glucoesfingolípidos 807
Glucógeno 58, **91**, 94f
sintasa quinasa 3 *véase* GSK3
volumen 1180f
Glucolípido(s) 58, 115f, **628**, 629
de membrana 628, 629
función 628, 629
neutros 628
Glucólisis **88**, 89f
almacenamiento de energía 92f
ciclo del ácido cítrico 99f
etapas 6 y 7 92f, 93f
metabolismo 102f
por etapas 88f, 89f
producción de ATP **88** y sigs.
reacciones 120f, 121f
Glucoproteínas células secretoras 773
Glucosa a partir de tirosina 415
estructura 56f
oxidación, energía producida 49f
oxidación y ATP 823, 824t
transportador de 657f
D-Glucosa 57f
Glucosaminoglucanos *véase* GAG
Glucosidasa del ER 775f
Glucosídicos, enlaces y ribozimas 405t
Glucosilación proteica 737f
N-Glucosilación 776f
función 776, 777
O-Glucosilación 776f
Glucosilfosfatidilinositol *véase* GPI
Glucosil-transferasa 776
Fringe 947
Glutamato, canales iónicos regulados por 684, 686
fármacos 686
hipocampo 691
memoria humana 1396
receptor 1148f
vesículas sinápticas 808, 809f
Glutamina 127f, 129f
Glutaraldehído 605f

Glutatión peroxidasa 868
S-transferasa *véase* GST
GM **1460**, 1461t
GMCSF 939t
células diana 1461t
GMP cíclico, estructura 917f
cíclico y NO 888f, 889
GNCSF, subunidades 1461f
G_o 919t
G_{olf} 917, 919t
Golgi 27f, 696f, 751f
acumulación de proteínas mutantes 559f
células secretoras de glucoproteínas 773
cisternas 696, **771**f y sigs.
compartimentación molecular 773f
estructura **771**f y sigs.
funciones 696, 766
imagen tridimensional 613f
localización en células 772f
procesamiento de oligosacáridos 773f
proteínas motoras 1021f
proteoglucanos 775, 776
red *cis véase* CGN
red *trans véase* TGN
Salmonella enterica 1514f
transporte a través del 776, **778** y sigs.
volumen relativo 697t
Gónadas, desarrollo y gen *Sry* 1284
Gonorrea 1529
genoma de la bacteria 551
Gooseberry, mutante 1337f
Gotas lipídicas **625**, 626
formación 626f
GPCR 641, 684, 892, 893f, **904** y sigs., 918, 922, 936f, 1283
desensibilización 920, 921
estructura 904f
gen 905
proteínas G 905, 906f
quinasa *véase* GRK
GPI 1183, 1184
células epiteliales 807
de anclaje **630**, 742
G_q 919t
Gradiente de concentración y transporte pasivo 653, 654f
de densidad para centrifugación 511
de morfógeno 886f
de voltaje 654
dorsal de morfógeno 1335f
electroquímico 670f
electroquímico de protones 813, 814f, 815f, 820, **821**f y sigs.
morfogénico 1317
morfogénico, inducción 1318f
Gráfico de hidropatía 632, 633f
Gram, tinción de 665, **1489**
Gram-negativas, bacterias 665f, 1490f
Gram-positivas, bacterias 1490f
Granulocitos **1451** y sigs.
funciones 1453t
Gránulos corticales 1288
de secreción 801-803
P de *Caenorhabditis elegans* 1323f, 1324
Granulosa, células de 1291
Granzima B 1573
Grasa(s) 94
de adipocito 1475f
degradación a acetil CoA 96, 97
gotas de 94f
marrón 838
oxidación y ATP 823, 824t
respuesta celular inducida 907t
y obtención de energía 95, 96
Gravitropismo y auxina 959f
Grim, proteína 1125
Gripe asiática 1522f
aviar 1521, 1522f
aviar, evolución 1522f
de Hong Kong 1522f
entrada del virus en la célula 1507f
española 1522f
fusión de membranas 765f
pandemias 1522f
proteínas motoras 1516
rusa 1522f
virus, forma 1496f
GRK **920**, 921f
Groucho, proteínas correpresoras 950
Grupos de equivalencia 1313f
químicos 55
G_s 907, 919t
GSK3 949, 951
GSK3β 1359f
GST y purificación de proteínas 514, 516f
G_t 919t
fosfodiesterasa de GMP cíclico 919
GTP 98
e inestabilidad dinámica 981f
estructura 99f
Ran 708, 709f
readmilling 976
señalización 180f, 894-896f, 897
transporte nuclear 709f
tubulina 973, 979f
GTPasa(s) 179
como interruptor molecular 179f
de la familia Rho 931, 932f
de reclutamiento 758, **759**
monoméricas **179-181**, 896, 926 y sigs.
monoméricas, regulación 896f
proteína activadora *véase* GAP
Rac 1043f
Ran 708, 709
Rho 788
RhoA *véase* RhoA
y ensamblaje de cubiertas 758-760
Guanilato ciclasa 917
ciclasa y NO 888f, 889
Guanina **2** y sigs., 61
factor nuclear intercambiador *véase* GEF
interruptor ribosómico 478f
Guanosina bifosfato *véase* GDP
trifosfato *véase* GTP

H

H1, histona 218
H2A-H2B, dímero 212, 214f
H3-H4, dímero 212, 214f
tetrámero 212, 214f
H9, línea celular 506t
Haemophilus influenzae, genoma 551
Hairy, gen 1372
Halobacterium salinarum 640f
Haploide(s) células 1270f
fase, longitud en eucariotas 1269-1271
organismos 1090, **1269**
proliferación en fase 1056
Hapmap 561
humanos 562, 563
HAR 253
Hassall, corpúsculos 1587
HAT 222
Haustorio 1400, 1401f, 1402f
Haz contráctil de actina 1007f
paralelo de actina 1007f
vascular 1404f, 1405f
HDAC 222
HDV, plegamiento del RNA 406f
Hebbs, regla de 1396
Hebra inmortal, hipótesis 1424, 1425f
Hedgehog, cáncer 1241
desarrollo animal 1316t
patrón del disco del ala 1352
proteínas 946, **950** y sigs.
señalización 952f, 1441, 1442f
vía 1340, 1426
HeLa, línea celular 506t
Helicasa, proteína cargadora de 283f
Hélice(s) β transmembrana 630f, 632
de DNA 3
de reconocimiento 419, 420f
de subunidades proteínicas 143, 145
doble **197**, 199f, 416f
interruptor 180
interruptor, cambio de conformación 181f
nucleación 306f
propiedades 146f
superenrollada 135
Hélice α **131** y sigs., 134f
de bacteriorrodopsina 640
gráficos de hidropatía 632, 633f
inserción en bicapa lipídica 634f
transmembrana 630f, 631, 632f
transmembrana, interacción 632, 633f
Hélice-bucle-hélice, motivo *véase* HLH
Hélice-giro-hélice 419, 420f y sigs.
unión al DNA 419, 420f
y polipéptido flexible 425f
Helicobacter pylori 1485
amoniaco 1503
cáncer 1228, 1229, 1500
genoma secuenciado 18t
Helio, orbitales electrónicos 48f
Heliozoos, organización 33f
Hemangioblastomas 1449
Hematopoyesis, control 1454
parámetros reguladores 1462
proceso 1457f
Hematopoyéticas, células madre 1451, 1477, 1478
Hematopoyéticos, tejidos 1543
Hematoxilina, tinción 585f
Hembras de mamíferos, meiois 1281
desarrollo y gen *Sry* 1285f
Hemicanal *véase* Conexón
Hemidesmosomas 1133t, 1134f, 1135t, 1171t
estructura 1144f
Hemo, átomo de hierro 166
citocomo *c* 831f
estructura 166f
Hemofilia, herencia 563
Hemofílica, unión **1137**, 1138f
Hemoglobina, forma 144f
genes parálogos 20
subunidades 143f
Hendidura sináptica 682, 1149f
Hepadnavirus 1228t
Heparán sulfato 1179f
Hepáticas, membranas, composición 624t
Hepatitis crónica 1500
Hepatitis-B, virus 611f, 1228t
Hepatitis-C, virus 1228t
Hepatocito(s) **1442**, 1443f
cordones de 1443f
ER liso 725
pérdida y proliferación 1443, 1444
Herencia biparental 866
citoplasmática 865f
de la expresión génica 454
del patrón de metilación 467f, 468
del patrón de represión génica 467, 468f
duplicación 3, 4
epigenética **219** y sigs., 471, 472f, 473
genética y epigenética, comparación 219f
materna de orgánulos 865, 866
mendeliana 865f
mitocondrial 864, 865f
teoría cromosómica 1272
transmisión 195
uniparental 866
Herida, agentes patógenos 1502
celular, reparación 806f
migración celular 1036f
respuesta inflamatoria 1454f
Herpes simplex 1487, 1496, 1536
respuesta inmunitaria 1488f
Herpesvirus 1228t
desplazamiento en un axón 1517f
forma 1496f
Hes1, gen 1372, 1373
Hes2, gen 1373
Heterocariontes 509f
proteínas de membrana 642, 643f
Heterocigosidad, pérdida 310, 319
Heterocigoto 554f
Heterocromatina 205f, **220**, 1070
centromérica, herencia directa 232f
formas 238f, 239
organización 220 y sigs.
silenciada 220, 231
síntesis dirigida siRNA 494, 495f
Heterocrónicos, genes 1326, 1327
Heterodímero(s) de proteínas de regulación génica 424f, 425f
Ku 303f
Heterodúplex, región 306, 314f
Heterofílica, unión 1138f
Heterotípico, canal intercelular 1159f
Hexoquinasa 159
Hexosa 112f
HGF 922, 1443, 1465
HI, línea celular 506t
Hialuronato *véase* Ácido hialurónico
Hialuronidasa 1181
Hibridación 306f
con anticuerpos de proteínas 517, 518
del DNA 202, 203, **536**
del DNA y astringencia 537f

 genómica comparativa 1239,f
 in situ 572, **573**f y sigs., 586f
Híbrido, doble sistema 523f
Hibridoma **508**, 509f
 líneas celulares 508-510
 preparación 509f
Hid, proteína 1125
Hidrocarbonos 106f
Hidrofílicas, moléculas 52
Hidrofílico, extremo lipídico 618
Hidrofóbicas, moléculas 52
Hidrofóbico, extremo lipídico 618
Hidrogenación 72
Hidrógeno, abundancia 47f
 bombeo 836, 837f
 enlaces **54**, 110f
 estructura del átomo 46f
 extracelular 652t
 gradiente 655
 intercambios 109f
 intracelular 652t
 orbitales electrónicos 48f
 transporte activo 657
 transporte en bacterias 840f
 unido a carbono en el DNA 417f
Hidrolasas ácidas 780f
 ácidas, receptor de 755
 función 159t
 lisosómicas, reconocimiento 786f
 lisosómicas, transporte 785f
Hidrólisis 57f
 ácida estomacal 1436
 anaeróbica de piruvato 90f
 condensación 85f
 de ATP y proteínas motoras **1016** y sigs.
 de GTP, proteínas de 178, 179
Hidropatía, gráfico de 632, 633f
Hidroxiapatito 1470
Hidroxilisina 1186, 1187f
Hidroxilo, grupo 55
Hidroxiprolina 1186, 1187f
Hierro, control postraduccional 493f
 grupo hemo 166
HIF1α 1220, 1448, 1449
Hígado, cáncer de 414f, 1226f, 1228t, 1229
 función 1442, 1443
 proteínas, expresión 414f
 respuesta celular inducida 907t
 tirosina aminotransferasa 415
Higromicina B, lugar de unión 384f
HindIII, endonucleasa 534f
Hipermutación somática 1567
Hipertensión, predisposición genética 563
Hipocampo, entrada de calcio 690
 función 690, 691
 y aprendizaje 690-692
Hipodermis 1418
Hipótesis endosimbióntica 859, 860f
 señal 727f
Hipoxantina 301f
 fosforribosil transferasa 471f
Hipoxia, factor 1α inducible por *véase* HIH1α
Histamina 1556, 1557f
 basófilos 1452
 secreción 804f, 805
Histidina 101f, 127f
 carga de cadena lateral 60f
 quinasa CheA 943
 quinasa, receptores asociados 942
Histona(s) 211
 a partir de timo de ternera 502
 acetiltransferasa 444f
 código de 224, **225**, 226
 colas de aminoácidos N-terminales 213
 colas de, función 218f
 complejo lector-escritor 227f
 de enlace *véase* Histonas H1
 desacetilasa, reclutamiento 446f
 dímeros 212, 214f
 eliminación 442, 443f
 espaciadora *véase* Histonas H1
 H1 218
 H3 229, 444f
 H3 trimetilada, reconocimiento 225f
 H3 y modificaciones covalentes 187f
 H4 444f
 herencia de patrones de modificación 290, 291f
 hipoacetilación 474
 lectura del código 444f
 memoria del patrón de modificación 290, 291f
 metilación 474
 metiltransferasa, reclutamiento 446f
 mitocondrias 858
 modificación en cromosomas politénicos 238f
 modificación y herencia 472f
 modificaciones covalentes 22f, 223f, 224, 442
 octámeros de 211
 pliegue 213f
 puente *véase* Histonas H1
 quinasa 444f
 regulación génica 220
 regulación y ubiquitinización 395f
 sustitución 442, 443f
 ubiquitinación 474
Histoplasma capsulatum 1494f
HIV 320, 321f, 329, 1488
 atenuación de la transcripción 477, 478
 cáncer 1228t
 edición tras la infección 484
 entrada en la célula 765f, 1507f
 forma 1496f
 genoma 485f, 1498f
 latencia 485
 proteínas de fusión 765f
 proteínas motoras 1516
 receptor 1505, 1506f
 resistencia de fármacos 1523
HIV-1, diversificación 1521f
HIV-2, diversificación 1521f
HLA, antígenos 1576
HLH **425**, 426f
 activo, estructura 426f
 inactivo, estructura 426f
HMC, proteínas **1577** y sigs.
 proteínas y linfocitos T 1575, 1576f
HNPCC 278, 1254
Hodgkins, linfoma de 1206f
Hoja(s) de semilla *véase* Cotiledón
 germinales, origen 1365f
 nervio central 1404f
Holliday, uniones de 311f, 312, 313f y sigs.
Holoenzima de la RNA polimerasa 337
Hombre adulto, memoria 1396
 análisis de ligamiento 560
 análisis genéticos **560** y sigs.
 ancestro común con simios 247f
 árbol filogenético 247
 barajado de dominios 142
 cáncer y senescencia celular 1217
 cáncer y virus 1227, 1228t
 color de los ojos 563
 control de la expresión génica 463
 cromosoma 17 259f
 deleciones y origen de replicación 290f
 disposición de intrones y exones 348f
 edición del DNA 483, 484
 entrecruzamiento de homólogos 1280f
 estudio de mutaciones 556
 evolución 253
 flora normal 1486
 frecuencia de mutación 264
 gen de la β-globina 250f
 genes de señalización 880
 genes mitocondriales 860, 861f, 863
 genoma 18t, **40** y sigs., 1308
 historia del cromosoma 3 208f
 infertilidad 1301-1303
 longitud de exones 353f
 longitud de intrones 353f
 mapa cerebral 1392f
 mutación de dineína ciliar 1032, 1033
 mutaciones mitocondriales 866
 mutantes y genes del desarrollo 1311
 normal, cromosomas 1284f
 número de células 1
 número de divisiones celulares 1107
 número de genes 440
 oocitos, desarrollo 1291, 1292f
 órganos linfoides 1541f
 propiedades de anticuerpos 1557t
 proteínas Ras 926
 proteínas reguladoras de genes 440
 ratón, genomas 249f, 250f
 receptores nucleares huérfanos 890
 relojes circadianos 461
 retrotransposones no retrovirales 321, 322
 secuencia GGGTTA 292
 secuencias Alu 323f
 secuencias de inicio y final de intrón 349f
 SNP 561
 tamaño de los genes 206
 variaciones genéticas **258** y sigs.
 velocidad de replicación 283
 zonas nucleares ricas en genes 240f
Homeobox 1342, 1400t
Homeodominio(s) 138, **421**
 de unión al DNA 421f
 de unión al DNA, frecuencia 141f
 proteínas de 420, 421
 y polipéptido flexible 425f
Homeótica, mutación 1342f
Homo sapiens véase Hombre
Homocigoto 554f
Homogenado 510
Homólogos 20, 246, 1271
 alineación 1274f
 entrecruzamiento 1271, 1274f
 separación 1273f
Homoserina y retroalimentación negativa 170f
Homotípico, canal intercelular 1159f
Homúnculo 1391, 1392f
Hongos, alimentación 29
 dimorfismo 1494f
 filamentosos 1494
 genes mitocondriales 863
 parásitos **1494**
 vacuolas 781
Hooke 501f
Hormona(s) 882f, 883f
 antimülleriana y células de Sertoli 1285
 del crecimiento 936f, 939t
 del crecimiento y tejido adiposo 1475
 desarrollo de la planta 1403, 1406f
 desarrollo óseo 1474
 esteroideas 889f, **890**
 esteroideas sexuales, acción 890
 femeninas y cáncer 1229
 folículo estimulante *véase* FSH
 luteinizante *véase* LH
 respuesta celular inducida 907t
 respuestas del receptor nuclear 892f
 tiroideas 889f
 tiroideas, acción 890
 tiroideas, receptor 891f, 892f
 vegetales 1403, 1406f
 vegetales y etileno 957, 958f
Horquilla de replicación **266**, 269f, 1067
 desplazamiento 284f
 en movimiento 276f
 estructura 269f
 forma 266-268
 maquinaria 276f
 microchips 286f
 rotura 305
Hox, código 1342
 complejo y eje anteroposterior **1342** y sigs.
 complejo y extremidades de vertebrados 1355
 genes 1343f, 1344f, 1378, 1383, 1387
 genes del ratón, dominios de expresión 1346f, 1347f
 localización de genes 1343f
HoxA, complejo 1345, 1355
HoxB, complejo 1345
HoxC, complejo 1345
HoxD, complejo 1345, 1355
HpaI, endonucleasa 534f
HPLC 513
HRP, captación 811f
hSG, genes 456f
Hsp60 mitocondriales 717
Hsp70 mitocondriales 715, 716f, 717
 y transporte vesicular 757
HTLV-I y cáncer 1228t
Huella(s) dactilar genética 546, 547f
 del DNA 429, 430f, 431, 535
 filogenética 431f
Hueso(s) 1131, **1470**
 compacto 1470, 1471f
 compacto, remodelación 1473f
 desarrollo 1472f
 endocondral 1471
 esponjoso 1470, 1471f
 estructura de colágena 1189f
 formación 1471, 1472
 largo, estructura 1474f
 remodelación continua 1472-1474
 respuesta celular inducida 907t
 secreción de matriz extracelular 1179
Huésped, barreras protectoras 1501, 1502
 membranas y patógenos 1512f

Huésped-patógeno, interacción 1486, 1487, 1518, 1519
Huevo de *Xenopus*, asimetría 1364f
Humedad pulmonar 1434
Humorales, respuestas 1540
Hunchback 448f, 1338f
Huntingtina, evolución del gen 251f
Huntington, corea 397
corea, genes 560
Huso(s) anafásico, influencia de microtúbulos 1096f
central, modelo de estimulación 1096f
desplazamiento de cromosomas 1085, 1086
ensamblaje y Cdk-M 1078, 1079
longitud y proteínas motoras 1079f
metafásico, flujo de microtúbulos 1085, 1086f
punto de control del ensamblaje 1088
Huso mitótico 966, 1054, 1072f, 1073f
autoorganización 1082f
ensamblaje 1077, 1078, 1081, 1082
estructura 1075, 1076f, 1077
filamentos intermedios 966
microscopio electrónico 607f
microtúbulos 1034, 1035f

I

IAP, proteínas 1124, 1125
ICAM 1146, 1147f, 1177t
ICE 1118, 1119t
ICSI 1302
IFNγ 1593, 1596
función 1584f
Ig 1177t, 1540, **1552** y sigs.
adhesión célula-célula dependiente de calcio 1146, 1147
de adhesión 1145
dominio de la cadena ligera 137
dominios **1559**, 1560f
estructura 257f
humanas, propiedades 1557t
módulo 140f
sinapsis 1149f
superfamilia, **1146**, 1560, 1599, 1600f
IgA 1556
estructura 1556f
IgCAM 1550f
IgD 1554
IgE **1556**, 1557f
IGF 934
y RTK 923t
IGF1 922, 923f, 1775
Igf2 468 y sigs.
IgG **1554-1556**
estructura 1561f
ICAM 1174f
IgM **1553-1554**
estructura 1555f
iHog, proteína transmembrana 950
IKK 953
IL, propiedades 1599t
IL-1 1118
IL-2 y linfocitos T 1592f
IL-3 1460
células diana 1461t
subunidades 1461f
IL-4 1593
IL-10 1575
Imágenes multifotón 592f
procesamiento **583**, 584f
Imago de *Drosophila* 1329f
Impronta genómica **468**, 469f, 470
Impulso nervioso *véase* Potencial de acción
In vitro, experimentos 503
vivo, experimentos 503
Inactivación clonal 1548
de receptor 903f
Inactivación-X **473**f, 474f, 475f
Inanición y leptina 1476
Incidencia del cáncer 1224f, 1225
Incrementadores y aislantes 452f
Indian hedgehog, gen 950
Indicadores sensibles a iones 595
Índice de marcaje 1059
de masa corporal 1475
mitótico 1059
Inducción de recombinación somática 1348f
secuencial del desarrollo embrionario 1320f
Inductiva, señalización 1313f
Inestabilidad dinámica 979f, 980, 981f, 982f
Inexina 1132f, 1159
Infarto de miocardio 1127
y ES 506, 507
Infección(es) **1486-1538**
adhesinas 1503
biología celular **1501-1525**
cáncer humano 1227, 1228
epidémicas agudas 1487
hospitalarias 1523
signos 1487, 1488
síntomas 1487, 1488
Infertilidad humana 1301-1303
Inflamación 1534f
caspasas 1119t
vía de señalización dependiente de NFκB 951-954
Inflamatoria, respuesta 1454f, 1527
Información, almacenamiento 401, 402
hereditaria 1, 2f *véase también* Herencia
hereditaria, transmisión 195
propagación y energía libre 8
Ingeniería de las células madre **1477-1482**
genética **532** y sigs.
Inhibición lateral 1324, 1357f
lateral, anulación 1357f
lateral y células madre sensoriales **1356** y sigs.
por contacto 1234f
por retroalimentación 170
Inhibidor(es) de la apoptosis *véase* IAP
de la disociación de nucleótidos de guanina *véase* DGI
extracelulares y respuesta del inductor 1318
neurotransmisores 684
químicos 527
tisulares de metaloproteasas *véase* TIMP
Inhibidora, proteína G 907
Iniciación 281 y sigs.
factor de, fosforilación 488
orígenes hemimetilados 284f
Iniciador tumoral 1226, 1227f
Inicio de la división celular 1055
Injerto en embrión huésped 1311f
INK4 1243
Inmunidad 1488f
adquirida 1485 y sigs, **1539-1600**
cambios de fase bacterianos 454
cáncer 1262, 1263
innata 1486 y sigs., **1525-1537**
innata y adquirida **1540** y sigs.
respuesta primaria 1546
respuesta secundaria 1546
Inmunitario, rechazo y células madre 1482
sistema y ER 768
Inmunización 1539
Inmunocitoquímica indirecta 588f, 589f
Inmunodeficiencia combinada grave *véase* SCID
Inmunodetección con oro coloidal **606**, 607f
Inmunodominantes, determinantes 1545
Inmunoestimulantes asociados a microorganismos 1527, 1528
Inmunofluorescencia 588f
Inmunoglobulina *véase* Ig
Inmunológica, tolerancia 1547-1549
Inmunoprecipitación de cromatina 431, 432
Inopina 370f
iNOS 889
Inositol, fosfolípidos 624
1,4,5-trisfosfato *véase* IP_3
Insecto(s) *véase también Drosophila melanogaster*
células madre sensoriales 1356f
complejo Hox 1345f
eje dorsoventral 1336f
Insomnio, fármacos 686
Insulina, células secretoras 1444
factor de crecimiento similar a 1475
forma 144f
rotura del ensamblaje 152f
y RTK 923t
Integración de señales 897f
neuronal 688f, 689
Integrasa 318t, 457
lambda 324, 325f
pauta de lectura 384f
Integrina(s) 1134, 1135t, 1145, 1550, **1169-1178**
activa, estructura 1170f
activación, mecanismo 1173f
adhesión dependiente de 1550f
agrupación 1174, 1175
calcio 1145
cambios conformacionales 1170-1172f
de células sanguíneas 1177t
distribución 1173t
efectos intracelulares 1177
membrana basal 1164
mutantes de 1172-1174
subunidades 1170f
tipos 1173t
unión heterofílica 1146
vía de señalización 1426
Interacciones celulares 1305, 1306f
proteicas, mapa 188, 189
Interbanda de cromosomas politénicos 236, 237f
Intercalar, regeneración 1354f
Intercambiador 565f
Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+ 658
Na^+/Ca^{2+} 660
$Na^+/Cl^-/HCO_3^-$ 657, 658
Na^+/H^+ 657
Intercambio cruzado de cadenas *véase* Uniones de Holliday
rotatorio 979f, 980
Interfase 1055f
Interferencia del entrecruzamiento 1280
en el microscopio óptico 582f
Interferón 939t
Interferón α 1535, 1536
Interferón β 1535, 1536
Interferón γ *véase* IFNγ
Interleuquina *véase* IL
Internodo 1401f
Interruptor(es) angiogénico y cáncer 1220
del triptófano 433 y sigs.
moleculares 894-897
ribosómicos 478f, 479
Interruptores genéticos complejos, estructura 447, 448
evolución 453
funcionamiento **432** y sigs.
Intestino 1436-1442
cáncer, incidencia 1224f
células en diferenciación 1437f
células madre 1438, 1439
delgado, células epiteliales 1151f
migración celular 1440f
renovación del revestimiento 1436f, 1437
señalización Notch 1439f, 1440
simportadores 657
y *Escherichia* 1504f
Intragénica, mutación 555
Intrón(es) 347
capaces de automadurar 356f
de orgánulos 862, 863
definición 206
del grupo I 356f
del grupo II 356f
disposición en genes humanos 348f
eliminación del pre-mRNA 347, 348
longitud 353f
secuencias consenso de inicio y final 349f
Intrón/exón, límites determinación 537
Invasión de una de las cadenas 305
Inversión 555f
Investigación, métodos 500 y sigs.
Inyección intracitoplasmática del espermatozoide *véase* ICSI
Ion(es) acetato 53f
canal regulado por 669
conformaciones del receptor de acetilolina 685f
extracelulares concentración 652t
hidronio 52, 53f
indicadores sensibles a 595
intracelulares, concentración 595, 652t
Iónico, flujo 670f
IP_3 909, **910**, 911f
canales liberadores de calcio sensibles a 910
fecundación 1300
síntesis 910f
IRES 490, **491**, 1518
traducción dependiente de 491f
iRNA 443, **495-497**, 571, 572
en experimentación 496
genética inversa 572
mutaciones negativas dominantes 571f
pequeños *véase* siRNA
IRS1 924
Irx, proteínas reguladoras génicas 1372f
IS3 bacteriano 318f
Islas ricas en CG 470, 471f
Islet/Lim, genes 1385
Islotes de Langerhans 1444f

de patogenicidad 1491
Isoelectroenfoque 521f
Isoformas de células musculares 1465, 1466
proteicas 481
Isoleucina 101f
síntesis en mamíferos 383
Isomerasas, función 159t
Isómeros 112f
definición 56
ópticos 56
Isopreno 115f
Isótopos del carbono 46f
radiactivos 103t
Isquemia y agentes patógenos 1500
y apoptosis 1127
IVF 1302f, 1303
Izumo, proteína 1298
IκB proteínas inhibidoras 953
quinasa *véase* IKK

J

J, segmento antigénico 1563f
Jagged, proteína 1594
JAK 937
JAK-STAT vía de señalización **937**, 938f, 939t
Janus, quinasa *véase* JAK
Jet lag 461
JIP, proteínas 1022
JNK 1022
cascada de 1359f

K

κ, cadena ligera de anticuerpo 1556, 1557
Kartagener, enfermedad de 1032, 1033
k_{cat} 163
k_{cat}/K_m 163
KDEL, receptor 770f, 771, 784
Kin, reconocimiento 771
Kit, gen 41f
mutación 1376f
proteína 1375
KKXX, secuencia 770
K_m 163
Knockouts 566
análisis de función génica 569-571
K-Ras 926
cáncer de colon 1252t
Kringle, dominio 140f, 141
Krüppel, mutante 1336, 1337f, 1338f
proteína 448f
secuencia reconocida 418t
Kupffer, célula 1443f
Kuru 1499f

L

L1 humano 318t
L6, línea celular 506t
Lab, gen 1343f
Labio dorsal del blastoporo 1367
Lactancia, glándula mamaria 1427f
Lactato, excreción por fermentación 90f
Lactosa, permeasa de **657**, 658f
y operón *Lac* 435, 436
LacZ, gen 437f
LAD 1173t, 1174
Lagunas óseas 1470
Lakritz, mutante 557
Lambda, bucle de retroalimentación positiva 457
cadena ligera de anticuerpo 1556, 1557
Lamelipodios 966, 996, 1008, 1036f, **1037**
de fibroblasto 1040f
Lámina β **131** y sigs., 134f
antiparalela 135f
paralela 135f
reconocimiento de DNA 422, 423f
Lámina basal 1131, 1132f, 1150 y sigs., **1164-1169**, 1419f
defectos genéticos 1165
estructura tridimensional 1167f
funciones 1167-1169
tracción 1166, 1167
unión neuromuscular 1168
Lámina epitelial, plegamiento 1143f
Lamina nuclear 711, 984
Láminas nucleares 200, 704 705f, **711**f
filamentos intermedios 983
mitosis 711, 712f
Laminina, estructura 1166f
lámina basal, 1165, 1166f
receptores de 1167
polarización celular 1155f
Laminina-1 1165
Langerhans, células 1418f, 1453
islotes de 1444f
Larva de *Drosophila* 1329f
Láser, microdisección por captura 502, 503f
moléculas enjauladas 593, 594
pinzas ópticas 598, 599f
Lateral, inhibición 1357f
Latrunculina 987, 988t
Lazo en horquilla de RNA 403f
interno de RNA 403f
t 292, 293f
LC, forma del virus 1496f
técnica 522
LC-MS/MS, técnica 522
LCR 450, 451
LDL **791**, 792
endocitosis 793f
estructura 791f
receptores 791f
Leche, secreción 1427f, 1428
Lecitina *véase* Fosfatidilcolina
fabricación en el ER 742, 743f
Lectinas **636**, 637f, 777
de unión a mananos *véase* MBL
Lector de código de histonas 225f
Lector-escritor de histonas 227f
Lectura, pauta abierta YDR196C 189
pautas **367**, 368f y sigs.
Leeuwenhoek, van 501f
LEF1/TCF, familia de proteínas 950
Lefty, genes 1376f, 1377
Legionario, enfermedad del 1508
Legionella pneumophila, entrada en la célula 1508f
membranas del huésped 1513f
TLR 1531
Leptina 1474, 1476
e ingesta 1475, 1476
gen 148f y sigs.
Leptoteno 1275, 1276f
Lesión de alquilación 298
Let7 y temporización del desarrollo 1326, 1327
Letal, factor 1493
Leucemia 295t
aguda 1226f
de células T 1228t
definición 1206
diferenciación celular 1216
expresión génica 414f
mieloide crónica *véase* CML
murina, virus 1233f
tiempo hasta hacerse aparente 1210
tratamiento 1257
Leucina 101f, 127f, 129f
Leucocito(s), clases 1451, 1452f
deficiencia de adhesión *véase* LAD
funciones 1453t
polimorfonucleados *véase* Neutrófilos
Leucoplasto 841
Levadura(s) 32, 33, 1494f
Cdk de 1062
ciclo vital 34f
cromosomas artificiales *véase* YAC
de fisión 1056, 1494
de fisión, ciclo celular 1056f
de gemación 1056f
eliminación de orígenes de replicación 287f
espliceosoma 351f
estructura 33, 34f
factor de apareamiento y polarización 1044f, 1045f
fase haploide 1056
filamentos de actina 983
gemación, reguladores génicos 455, 456f
genes mitocondriales 863
genoma 551
genoma secuenciado 18t
haploides 34
homeodominios 138f
horquillas de replicación 286f
identificación 523
interacción entre genes y proteínas reguladoras 35f
interacciones proteína-proteína 189f, 190f
locus *Mat* 456
longitud de telómeros 294f
mutagénesis 556
mutantes diminutos 866, 867f
mutantes sensibles a la temperatura 557f
organización de genes 204f
orígenes de replicación 286-288f
polaridad y citoesqueleto 969, 970f
preparación de mutantes 570f
proteínas de regulación génica 418t, 1400t
proteínas infecciosas 398
proteínas reguladoras 433f
señales de acoplamiento 880f
tipos de herencia 865f
vacuolas 781
Levógira, hélice 146f
Leydig, células de 1285, 1294f
LFA1 1174f, 1177t
LH 1291
respuesta celular inducida 907t
Librium 686
Ligamiento, análisis de 560
Ligando **153**
canal regulado por 668f, 669
de Fas 1574
de Kit, células diana 1461t
estructura del dominio de unión 891f
Fas 1120
inhibidor y actividad enzimática 173f
Ligasa, plegamiento del RNA 406f
Lignina 1196
composición y funciones 1199t
Límite de resolución **581**, 604f
Lin4 y temporización del desarrollo 1326, 1327
Lin-14, gen 1326f
Linaje celular, seguimiento en el embrión 1310f
LINE *véase* Elemento L1
Línea de células madre embrionarias humanas *véase* ES
germinal 1271, 1323
lateral migración del primordio 1375f
M del sarcómero 1027f, 1028f
Líneas celulares
de hibridomas 508-510
eucariotas 505
inmortalizadas 1059
transformadas 505
Linfáticos, vasos 1445-1450
Linfocito(s) 412f, 1417, **1451** y sigs., 1453, **1540-1551**
acumulación y apoptosis 1127
autorreactivos 1548
B1 1599
cantidad 1540
circulación 1549f, 1550f
de memoria 1546f
efectores 1546f
efectores colaboradores 1575f
en reposo 1544f
funciones 1453t
pro-B 1553
T_H 1574
T_H1 1593, 1594f-1596
T_H2 1593, 1594f-1596
vírgenes 1546f
y exocitosis regulada 805
Linfocito B 1453, 1540
activado 1544f, 1598
anticuerpos 1552f
cáncer 1228t
clon 508, 509
desarrollo 1543f, 1544
diferenciación 1554f
EBV 1500
monoespecificidad 1565
receptor *véase* BCR
selección de loci 1566f
virgen inmaduro 1553
virgen maduro 1554
y linfocito T colaboradores 1587, 1598f, 1599
Linfocitos T 1132, 1453, 1527, 1540, **1570** y sigs.
activados 1544f
citotóxicos 1570, **1573-1574**, 1582f y sigs.
citotóxicos, polarización, señal externa 1047f
colaboradores 1570, **1574-1575**, 1590 y sigs.

colaboradores y linfocitos B 1597, 1598f, 1599
desarrollo 1543f, 1544
e integrina 1174f
leucemia de 1228t
proteínas accesorias de membrana 1592t
proteínas MHC 1575, 1576f
receptores de *véase* TCR
reguladores 1544f, 1570, **1575**
respuestas mediadas por 1540
selección positiva 1586, 1587
supresores 1575
tolerancia 1571 y sigs.
Linfoide común, progenitor 1457f
Linfoma de Burkitt 1228t, 1500
de Hodgkins 1206f, 1257
de linfocitos B y apoptosis 1127
definición 1206
LINK, dominio 1181
Lipídicas anfifílicas, moléculas 618
balsas 899
Lípido(s) **58**
confinamiento en membrana 645
direccionamiento en células polarizadas 806
gotas 94f
secreción desde el TGN 800, 801
Lipoamida reductasa-transacetilasa 96f
Lipopolisacáridos *véase* LPS
Lipoproteicas, partículas y ER 725
Lipoproteínas de baja densidad *véase* LDL
Liposomas **621**, 622f
Lisina 101f, 127f
acetilación 222f
carga de cadena lateral 60f
enlaces en colágena 1187f
metilación 222f
señales de localización nuclear 705
Lisis epidérmica y virus 1496, 1497
Lisosoma(s) 27f, 696f, 749, 751f, **780**f y sigs.
deficiencias por mutación 556
exocitosis 786
función 696
heterogeneidad 780, 781
rutas de degradación 782-784f
transporte desde el TGN 779 y sigs.
vegetales 781, 782
volumen relativo 697t
Lisozima(s) 6f, **161**, 164-166
forma 144f
reacción 164f, 165f
Lisozima-sustrato, complejo 165f
Listeria monocytogenes 1508
citoesqueleto del huésped 1514, 1416f
membrana fagosómica 1512f
Listerolisina O 1512f
Lítico, estado de lambda 457
Litotrofos, organismos 12
Lkb1, gen 1156
LKB1, proteína y polarización celular 1156f
Locus de la región de control *véase* LCR
definición 554f
del tipo de apareamiento *véase* Locus *Mat*
Mat 456
LOH 310, 1236
LPS 1528
estructura 1527f
y activación de macrófagos 1531f
LRP 949
LRR 956f
LTP **691**, 692f
Lugar(es) activo de una enzima 73, **171**
catalítico 6f
de regulación de una enzima **171**
Lugares de unión 142
acoplados 171, 172
cruciales y rastreo evolutivo 155
proteico 145f, 153, **154**f y sigs.
Lumen 749, 1151
del ER 724, 725f y sigs.
del orgánulo 695
Luteinizante, hormona *véase* LH
Luz azul, detección 960, 961f
bombas impulsadas por 655, 656f
manipulación de objetos microscópicos 598, 599f
respuesta de un bastón 918f
roja, detección 960, 961f
UV *véase* UV
Lyme, enfermedad 1501
genoma de la bacteria 551

M

M, fase 1054, 1055f
M6P, estructura 784f
receptor 755, 783, 784, 793
receptor, función del 784
señal de unión 785, 786f
Machos de mamíferos, meiosis 1281
desarrollo y gen *Sry* 1285f
Macrófago(s) **787**, 788f, 1532
apoptosis 1117
células ES 1481f
colonias y RTK 923t
en vías respiratorias 1434-1436
linfocitos T_H1 1595f, 1596
y CSF 1460, 1461
Macromolécula(s) 64f
compartimentación del núcleo 241f, 242
familias 63f
microscopio electrónico 612
y NPC 707
Macropinosoma 1509
Mad2, proteína en cinetocoro 1088f
MADS, proteínas reguladoras de genes 1400t, 1414
Maduración alternativa 412
alternativa del RNA por corte y empalme 479f, 480f
de células sanguíneas 1455
de cisternas, modelo 778f
de la afinidad 1567
de oocitos 1290
errores de 352f
incorrecta del mRNA 386
por corte y empalme 345, **347** y sigs.
señales crípticas 352f
trans 354f
Magnesio, abundancia 47f
extracelular 652t
intracelular 652t
orbitales electrónicos 48f
Maíz mutante 1411f
transgénico 568
Mak MAP-quinasa 929
Malaria 666, **1494-1495**f, 1520
bloques haplotípicos 562f, 563
ciclo del protozoo 1495f
evolución temporal 1495f
MALDI-TOF, técnica 519, 520f
Maltoporina 635
Mama, cáncer 295t, 414f
incidencia 1224f
y maternidad 1229f
Mamífero(s) anti-IAP 1125
árbol filogenético 248f
células madre neuronales 1478f
complejo Hox 1345f
determinación del sexo 1284
diferenciación celular 411-413f
edición del DNA 483, 484f
embrión **1378-1382**
estudio del ciclo celular 1058, 1069f
frecuencia de mutación 264
genes constitutivos 470, 471f
hipocampo 690
inactivación-X 475f
inicio de replicación 288
islas ricas en CG 470, 471f
lazo t 293f
macromoléculas 63t
migración de PGC 1283f
proteína de regulación génica 418t
receptores nucleares huérfanos 890
regiones reguladoras complejas 449-452
regulación de meiosis 1280, 1281
sexualmente invertidos 1284
traducción del codón AUA 383
Manosa, oligosacáridos ricos en 774f
Manosa-6-fosfato *véase* M6P
Manosidasa del ER 775f
del Golgi 775f
MAP 995, 1001f, 1002f, **1080**
y factores de catástrofe 1081f
MAP2 995
marcaje 1001f
Mapa de interacciones proteicas 188, 189
de restricción 540
del espacio visual 1391f
haplotípico *véase* Hapmap
retinotectal 1394f
tridimensionales crio-EM de alta resolución 612f
MAPK 929
MAPKK 929
MAP-quinasas 936f
activación 963f
cascada 1103, 1104f
proteínas de armazón 930, 931f
Máquinas proteicas 184 y sigs.
activación 185
Maquinaria de replicación 276f
Marca molecular y purificación de proteínas 514 y sigs.
Marcadores de apoptosis 1118f
moleculares de membrana 750
y análisis de ligamiento 560
Marcaje celular con anticuerpos 502
con radioisótopos 600 y sigs.
de afinidad 188
Marfan, síndrome de 1191
Masa corporal, índice 1475
MASP 1529f
Mastocitos 1556
secreción de histamina 1557f
Mat **455**, 456f
Matα1, genes controlados por 433f
proteína 455, 456f
Matα2 425f, 455, 456f
genes controlados por 433f
secuencia reconocida 418t
Mata1 425f
genes controlados por 433f
proteína 456f
Materna, herencia 865 y sigs.
Maternidad y cáncer de mama 1229f
Matriz celular, influencia de las células 1193, 1195
mitocondrial 713f y sigs., **816**, 817f
nuclear 242
ósea 1470
ósea y osteoblasto 1470, 1471f
receptores de 1169
Matriz extracelular **1131** y sigs.
colágenas 1184 y sigs.
del tejido conjuntivo **1178-1195**
diferenciación del tejido conjuntivo 1469, 1470
macromoléculas de 1166f
rotura 502
MBL 1529f
Mbl, proteína 989, 990f
Mcm, proteínas 289f, **1068**, 1069f
Mcm1 433f, 456f
MCSF 922, 1473
células diana 1461t
y RTK 923t
MDCK, células 506t, 1155f
Mdm2, inhibición 1107, 1108f
proteína 1105, 1106f
MDR 666
Mecanismo de las casetes 456, 457f
Mediador(es) 440, 441f
ensamblaje con el promotor 442
intracelulares pequeños **893**, 894, 904, 905
locales 881
Medicina forense y PCR 546, 547f
Medidas hidrodinámicas de complejos proteicos 522
Medio ambiente y patógenos 1519
Mediolateral, eje 1364
Médula espinal embrionaria 1372f
Médula ósea
como órgano linfoide 1541f, 1543
roja **1454-1456**
roja y hematopoyesis 1454-1456
Megacariocitos 1451, 1455f
Meiosis 34, 554f, 1090, 1091f, 1092, **1272-1281**
I 1090, 1273
I, conducta de cromosomas 1278f
II 1090, 1274
II, conducta de cromosomas 1278f
cinetocoros 1277
comparación con mitosis 1273f
diversidad genética 1271
fase haploide 1270f
incorrecta 1278, 1279
mitosis, comparación 1091f
producción de gametos 1279f
recombinación 312 y sigs.
regulación en mamíferos 1280, 1281
tiempo de las etapas 1281f
Melanina en el hombre 563
Melanocitos 1022, 1418f
Melanoma 1207

Melanosoma 1022
de peces, agregación 1024f
deplazamiento por el microtúbulo 1024f
Melioidosis y citoesqueleto del huésped 1514
Membrana(s) basal *véase* Lámina basal
biológicas, composición 624
bombeo de protones 829f
caveolar 790
celular, estructura 617-650
como barrera 651
complejo de ataque 1530f
confinamiento de lípidos y proteínas 645
de fosfolípidos, formación 407f
de orgánulos, volumen relativo 696, 697t
del cloroplasto 29f
dobles y transporte 665f, 666f
dominios de 645, 646f
externa mitocondrial 713f y sigs., 816, 817f
fusión homotípica 769f
interna mitocondrial 713f y sigs., 816, 817f
internas 26, 27f
internas, evolución 698
lipídica y proteínas, asociación 630f
mecanismos para el transporte vesicular 750 y sigs.
negras 622f
nuclear externa **704**, 705f
potencial de 654, **669**, 670f, 671f
primeras 405, 406
propiedades eléctricas 667 y sigs.
proteínas de 629-650
proteínas de transporte 10f
púrpura 640f
tectorial del oído 1431f
tilacoidal 713f, 843f
transporte 651-694
Membrana plasmática **9**, 606f
citoesqueleto 1009, 1010
fosfolípidos 405
funciones 617
invaginaciones 698, 699, 700f
nucleación de actina 996 y sigs.
protuberancia 1036f y sigs.
Memoria 690
celular 454 y sigs.
celular epigenética 223f
del adulto 1396
del desarrollo y retroalimentación positiva 1315, 1316
humana y priones 399
inmunológica 1545-1547
Mendeliana, herencia 865f
Meningitis, genoma de la bacteria 551
Mensajeros, primeros 893
segundos **893**, 894
β-Mercaptoetanol, estructura 517
Meristemáticas, células 1404f
Meristemo(s) 1195
auxina 959
bucles de retroalimentación 1410f
capas L 1410
control del patrón 1409f
diferenciación y receptor Clv1/Clv2 957f
mutaciones reguladoras 1410-1412
primordios microscópicos 1407, 1408
señal celular 1409, 1410
Meristemos apicales 1407f
caulinar 1401f
radicular 1401f
y desarrollo vegetal 1403f
Merlina y neurofibromatosis 1009, 1010
Mesénquima y epitelio 1381, 1382
Mesenquimática, célula madre 1469
Mesodermo **1307**, 1365f, 1366
origen y Twist 1335f
presomítico 1371
tejidos derivados 1445 y sigs.
Mesófilo, células del 846, 847f
foliar 1404f
Mesotelioma 1226f
Met, proteína, estructura 423f
Met-tRNAi 380
Metabolismo de aminoácidos, familias genéticas 23
organización 101, 102
regulación 101, 102
transportadores activos 79f
y complejos multienzimáticos 168, 169
Metabolitos, transporte y bomba de protones 813, 814f
Metafase 1054, **1071**, 1072f y sigs.
a anafase, transición 1061
cromosoma en 243f
flujo de microtúbulos 1085, 1086f
Metales como coenzimas 167
Metaloproteasas matriciales 1194
Metamorfosis de *Drosophila* 1329f
Metástasis, barreras a la 1250f
capacidad de supervivencia 1220
de adenocarcinoma 1222f
definición 1206
etapas 1221f
imagen de escáner 1206
mutaciones que permiten 1249, 1250
producción 1219, 1219
Methanococcus jannaschii, genoma secuenciado 18t
Metil transferasa de mantenimiento 467
2-Metil propano en agua 621f
5-Metil citosina 301f
Metilación de DNA 472f
de histonas 223f
del DNA **467**, 468
del receptor y quimiotaxis bacteriana 944
1-Metiladenina, alquilación 298
3-Metilcitosina, alquilación 298
5-Metilcitosina, formación 467f
N-Metil-D-aspartato 691
Metilo, grupo 55, 417f
y regulación de proteínas 186t
Metionina 101f, 127f, 129f
aminopeptidasas 395
codón de la 367f
en extremo N-terminal de proteínas 380
formulada 1527
síntesis en mamíferos 383
Método(s) de investigación 500 y sigs.
dideoxi **549**, 550f
Metotrexato y DHFR 1260
MHC 1576
de clase I, proteínas 1536
gen 1577, 1578f
proteínas 1174f, **1570** y sigs., 1588, 1589
Miastenia grave 1549
Micelas, formación 620, 621f
Micoplasma genitalium, genoma secuenciado 18t
Microchips de DNA 286f, 537, **574**f, 575
de DNA y cáncer 1240
Microdisección por captura láser 502, 503f
y estudio del desarrollo 1325
Microelectrodo 595
Microespina de fibroblasto 1040f
Microfilamentos *véase* Actina, filamentos
Microinyección 597, 598f
Microorganismos 11, 1486, *véase también* Patógenos
inmunoestimulantes asociados a 1527, 1528
microRNA *véase* miRNA
hipervariable *véase* VNTR
Microscopía crioelectrónica 610
de fluorescencia 586, 587
de fuerza atómica *véase* AFM
electrónica 604-615
fluorescente con sonda múltiple 587
fluorescente de reflexión interna total *véase* TIRF
óptica tridimensional 589, 590
óptica tridimensional informática 589
procesamiento de imágenes 584f
Microscópica, manipulación 598, 599f
Microscopio de campo claro 583, 584f
de campo oscuro 583, 584f
de contraste de fases 583, 584f
de contraste de fases interferencial 583
de fluorescencia 586f
simple 501f
Microscopio confocal **590**, 591f, 592f
de barrido 590, 591, 592f
de fluorescencia 590, 591f
Microscopio electrónico 604-615
de barrido *véase* SEM
de transmisión *véase* TEM
límite de resolución 604f
Microscopio óptico 579, 580f-603
esquema 581f
incremento del contraste 583f
resolución 580 y sigs.
Microsomas 510, **726** y sigs.
aislamiento 726f
lisos 726f
rugosos 726f
Microsporidios, invasión del huésped 1510, 1511f
Micrótomo 585f
Microtúbulos 27f, 965f, 968f y sigs.
actina, coordinación 1046, 1047
astrales 1035f, 1075, 1076f
axón 1047, 1048f
captura por cinetocoro 1084f
catástrofe 1080, 1081f
centro celular 996f
cilios 1031 y sigs.
crecimiento 976f
de crecimiento rápido 1003-1005
de espermatozoides 1293f
del cinetocoro 1035f, 1075, 1076f
dendritas 1047, 1048f
desplazamiento de melanosomas 1024f
despolimerización 1085f
dineína 711
efecto del taxol 988f
en micrografía 587f, 588f
estructura 974f
fármacos 988t
flujo de 1085, 1086f
Golgi 1021f
huso mitótico 1034, 1035f
inestabilidad dinámica 979f, 982f
inestabilidad en mitosis 1080
interpolares 1035f, 1075, 1076f, 1093f
longitud 1081f
mitocondrias 815, 816f
orgánulos 697
orientación de pared celular 1200f, 1201f
plano de división celular 1095-1097
proteínas asociadas a *véase* MAP
proteínas motoras dependientes de 1077f
recambio rotatorio 977f
regulación de la longitud 1000
tubulina γ 992
unión al cinetocoro 1083f
Microvilli 693f, 966, 996, **1151**f y sigs.
estructura 1008f
villina 1007, 1008f
Mielina, membranas, composición 624t
vaina 680f
Mielinización 680f
células madre neuronales 1479
Mieloide(s), células 1453
común, progenitor 1457f
Migración celular y lámina basal 1168
celular y señalización 1045, 1046
de cadenas 308f
de células musculares 1374f
dependiente de CD31 1550f
embrionaria 1140f
en cresta neural 1374f
en intestino 1440f
Mimetismo molecular 381
Mioblastos en adultos 1467
en cultivo 504f
fusión 1464, 1465f
proliferación 1110, 1111f
proteínas biogénicas 464f
Mioepiteliales, células 1463, 1464f
Miofibrillas **1026**, 1027f y sigs.
Miofibroblasto 1469
Mioglobina, forma 144f
genes 20
Miosina 464, **1011** y sigs.
I 1008
I, estructura 1013f
II 1007f
II, ciclo del desplazamiento 1017f
II, en anillo contráctil 1093, 1094
II, ensamblaje 1025f
II, estructura 1011f, 1013f
II, filamento grueso bipolar 1012f
II, fosforilación de cadena ligera 1025f
II y movimiento celular polarizado 1039f
V y melanosomas 1022f
cardíaca, mutación 1031f
desplazamiento de amebas 1041f
estructura de la cabeza 1015f
localización en el árbol filogenético 1013
miembros de la superfamilia 1013f
movimiento 182
muscular, digestión 1012
origen evolutivo 1015, 1016
Miostatina 1110, 1111f
crecimiento de fibras musculares 1466
mutante 1466f

Miotonía 682
Miristoílo, anclaje 631f
miRNA 336t, 488, **493**
 Bantam 1354
 expresión génica 1309
 unión al mRNA 494f
Mitocondria(s) 27f, 696f, 713f y sigs., **815-827**
 animales, sistema genético 862
 árbol filogenético 875f
 cadena transportadora de electrones 876f
 código genético universal 862t
 de espermatozoides 1293f
 degradación de azúcares y grasas 96, 97
 envejecimiento celular 868
 espacio de la matriz 713f y sigs.
 estructura 28f, 816f, 817, 818f
 evolución 855, 859, 860f
 fisión 857, 858f
 fraccionamiento 815f
 fuerza protón-motriz 853-855f
 función 696
 fusión 857, 858f
 genética 855-876
 genoma 699
 herencia materna 865, 866
 herencia no mendeliana 864, 865f
 importación lipídica 867
 membranas 713f y sigs.
 membranas, composición 624t
 metabolismo celular 838, 839f
 microscopio óptico 815
 microtúbulos 815, 816f
 número 857
 origen evolutivo 29f, 699, 700f
 plasticidad 815f
 proteínas específicas 867
 relación ADP:ATP 824
 señal de importación 702t, 714f
 transporte de electrones 814, 815f
 transporte de proteínas 713 y sigs.
 vía intrínseca de la apoptosis 1121
 volumen relativo 697t
Mitocondrial, retículo 858f
Mitógenos 1102, 1107, 1108
 crecimiento 1109f
 función 1102 y sigs.
Mitosis 209, 1054 y sigs., **1071-1092**
 cinetocoros 1277
 comparación con meiosis 1273f
 comportamiento de cromosomas 1278f
 empaquetamiento de cromatina 243
 envoltura nuclear 711, 712f
 espermatozoides 1294f
 eucariota 208f
 excesiva y apoptosis 1107, 1108f
 inicio y Cdk-M 1071, 1074
 meiosis, comparación 1091f
 sin citocinesis 1099, 1100
MLCK 1025f
MLH1 295t
 cáncer 1252t
MnSOD 868
Modelo cartilaginoso del hueso 1471, 1472
Modulina 1028f
Módulo(s) en línea, series de 141f
 MAP-quinasa 929
Moho 1494f
Mol 47f
Molde de DNA 200, 201f
Molécula(s) 45
 anfifílicas 10f, 405
 anfifílicas y encapsulación de RNA 408f
 de adhesión de células neurales *véase* NCAM
 de adhesión, familias 1177t
 de adhesión intercelular 1572
 de agua 51 y sigs.
 de histocompatibilidad 1576
 de la membrana plasmática, polaridad 9
 de señalización intracelular 893 y sigs.
 definición 48
 enjauladas 593, 594
 espacio lleno 51f
 hidrofílicas 108f
 hidrofóbicas 108f
 inmunoestimulantes asociadas a patógenos 1541, 1542
 introducción en la célula 597, 598f
 marcaje con radioisótopos 600, 601
 orgánicas 55
 pequeñas y membrana 651-694
 polares 52, 53
 señal, combinación 884, 885f
 señal, estructura 889f
 señal extracelulares 879, 880f, **881**
 señal respuesta según la célula 885, 886f
 trayectoria aleatoria 74
 velocidad de movimiento 73 y sigs.
Mom, mutantes 1325
Monastrol, estructura 527f
Monocapa de fosfolípidos, formación in vitro 407f
Monocitos 1451 y sigs.
 funciones 1453t
 macrófagos 1452
Monoclonal, respuesta 1545
Monómeros 63
 de actina, estructura 975f
Monometil lisina 222f
Mononucleosis 1500
 genoma del virus 551
Monosacáridos 55, 112f
 reacción 57
Monoubiquitinación 395f, 795, 925
Monóxido de carbono *véase* CO
Montmorillonita y RNA 408f
Morfogénesis del pulmón 1382f
Morfogénico, campo 1313f
Morfógeno(s) 886f
 efectos graduales 1317
 fuente de difusión 1319f
 gradiente dorsal 1335f
Mormones y cáncer 1225
Mortalidad por cáncer 1207f
Mórula de mamífero 1379
Mosaico genético 1348
Mosca del vinagre *véase Drosophila melanogaster*
 tsé tsé 1502
Motilidad y uniones adherentes 1142, 1143f
Motivo(s) de cremallera de leucina **423**, 424f
 de interacción con ubiquitinas *véase* UIM
 estructurales de proteínas de regulación génica 418 y sigs.
 hélice-bucle-hélice *véase* HLH
 hélice-giro-hélice y DNA 419, 420f
 RGD 1193
Motores moleculares 1010 y sigs.
Movilidad en gel y proteínas de unión al DNA 427, 428
MreB, proteína 989, 990f
Mrf4, proteína biogénica 464f
mRNA 4, 7f, **335**t
 bacteriano, estructura 381f
 bacteriano policistrónico 380, 381f
 cambios de estabilidad 491, 492
 celular, cantidad y diferenciación 412
 control de la degradación 415f
 dañados y control de calidad 385-387
 de *Ash1* 1023f
 de oocitos, cantidad 493
 degradación, mecanismos 492f
 degradación y traducción 492f
 descodificación de secuencia 367, 368
 destrucción mediada por tripletes sin sentido 386f
 estructura antes de la exportación 359f
 exportación nuclear 710
 expresión y cáncer 414f
 Gcn4 490
 incompleto y rescate del ribosoma 387f
 localización en el citoplasma 477f, 486, 487f
 localización y miosina 1022, 1023f
 maduración incorrecta 386
 maduro, exportación 358-360
 mitocondrial 856
 precursores 407
 secuencia e inicio de síntesis **379** y sigs.
 separación en columna cromatográfica 538
 traducción 376f
 trayectoria en el ribosoma 376f
MS, célula 1325
MS/MS, técnica 519, 520, 522
MSCF 1474
MSH 295t
β-MSH 803f
MTOC **992** y sigs.
 nucleación de microtúbulos 993
mTOR, activación 935f
Mucina 774f, 776
Mucus pulmonar, segregación 1435f
Muerte celular programada *véase* Apoptosis
Muescas de DNA 278
Multienzimáticos, complejos 168, 169
Multifotón, imágenes 592f
Multiubiquitinación 395f, 795
Mundo, evolución temporal 400f
 RNA 400 y sigs.
Mus musculus véase Ratón
Musculares, células, isoformas 1465, 1466
 tipos de células 1464f
Músculo(s) cardiaco 1026, **1030**, 1031
 cardiaco y mitocondrias 815, 816f
 desarrollo 464f
 respuesta celular inducida 907t
 sección transversal 1027f
 y sombreado metálico 610f
 y ER 726
Músculo esquelético **1026** y sigs.
 acetilcolina 886f
 cadherinas del 1138t
 formación 1463-1468
Músculo liso 1026
 células 1463, 1464f
 células ES 1481f
 PDGF 1102
Mutación(es) 16, **263**
 activadoras 1231, 1232f
 acumulación en el cáncer 1210
 cancerígenas dominantes 1232f
 cancerígenas recesivas 1232f
 Cdc 1057f
 condicionales 557
 Dally 1184
 Dally-like 1184
 de dominancia negativa 564f
 de ganancia de función 558f
 de la leptina 1476
 de la línea germinal 564
 de *Lin-14* 1326f
 de pérdida de función 558f
 de pérdida de función condicional 558f
 de un solo gen 556
 deletéreas 247
 elementos genéticos móviles 317
 en genes distintos 558
 frecuencia 263
 frecuencia enmascarada por selección natural 264
 función de los genes 23, 24
 homeótica 1342f
 humanas mitocondriales 866
 humanas no letales 556
 inhibidoras 1231, 1232f
 insensible al etileno 958
 intragénica 18, 19f
 Kit 1367f
 neutras, diseminación 257, 258
 número y cáncer 1209, 1210
 para metástasis 1249, 1250
 provocadas y genes del desarrollo 1311
 puntual 555f
 recesiva 558
 recesiva y complementación 555f
 reguladoras y meristemos 1410-1412
 secuencia reconocida por proteínas de regulación *véase* Huella en el DNA
 selección en tumores 1212, 1213
 selectivamente neutras 16
 sensibles a la temperatura 557f
 silenciosas 264
 somáticas y desarrollo tardío 1347-1349
 supresora extragénica 555
 supresora intragénica 555
 tasa 1213
 temperatura 1232
 termosensibles 1057
 tipos 555f
 Xpd 568f
Mutagénesis aleatoria 553, 556
 carcinogénesis 1208
 dirigida 565f
 insercional 556f
 química 556
Mutagénica, capacidad, determinación 1225f
Mutante(s) de *Arabidopsis thaliana* 1402f
 de *Arabidopsis thaliana*, producción 1399f
 de genes de segmentación 1337f
 de integrina 1172-1174
 de lámina basal 1167
 de miostatina 1466f
 de receptores de LDL 791f, 792

de uniones septadas 1155
de uPA 1194f
diminutos citoplasmáticos 866, 867f
e identificación de genes del desarrollo 1311
Flamingo 1157f
Sevenless 928
Unc 1388
MutL 1254
MutS 1254
Myb, familia de proteínas reguladoras de genes 1400t
Myc, gen 1238f, 1242f
proteína reguladora de genes 1103, 1104f
Mycobacterium marinum y citoesqueleto del huésped 1514
Mycobacterium tuberculosis 1487
entrada en la célula 1508
membranas del huésped 1513f
respuesta inmunitaria 1488f
Mycoplasma 1501
genitalium, biblioteca de mutaciones 569, 571
genitalium, número de genes 10, 11f
Myf5, proteína biogénica 464f
MyoD, familia 1465
proteína biogénica 464f
secuencia reconocida 418t
MyoD/miogenina, proteínas reguladoras 1362
MyoG, proteína biogénica 464f

N

N-Ras 926
N-terminal, extremo y secuencias señal 701
N-WASp 1516
NAC, familia de proteínas reguladoras de genes 1400t
NAD^+ **82**f, 83, 814, 817, 819f
NADH **82**f, 83, 84t, 815f, 817, 823
cesión de electrones 817, 818f, 819f y sigs.
deshidrogenasa, complejo **832**, 833f
deshidrogenasa, gen de 864f
glucólisis 93f
$NADP^+$ **82**f, 83
NADPH **82**f, 83, 84t
fijación de carbono 845f, 846
fotofosforilación no cíclica 851 y sigs.
oxidasa, complejos de 1533
NANA 774f, 775f
estructura 628f
Nano RNA 1283
Nanoarchaeum equitans, genoma secuenciado 18t
Nanopartículas fluorescentes 588f
Nanos, receptor 1332f, 1334f
NAP-1 291f
Nasofaringe, cáncer de 1228t
NCAM 1146, 1147f, 1177t
Necrosis celular 1115
Nef, gen del HIV 485f
Neisseria gonorrhoeae 21
cambio de fase 454
complemento 1529
respuesta inmunitaria 1520, 1521
Nematodo(s) *véase también Caenorhabditis elegans*
anatomía 1321f
apoptosis 1327f
árbol filogenético de células intestinales 1322f
compensación de dosis 476, 477f
destino celular 1322f, 1323
determinación sexual 1285
genes *Fgf* 1381
genoma 18t, 551, 1308
gránulos P 1323f, 1324
hermafrodita 1321
interacción célula-célula y desarrollo 1324f, 1325
intestinal 1487
masculino 1321, 1322
mutantes y genes del desarrollo 1311
receptores nucleares huérfanos 890
STAT 938
β-tubulina 982
y RNAi 571
NEMO, proteína reguladora 953
Neón, orbitales electrónicos 48f
Neoplasia intraepitelial 1212f
Nernst, ecuación de 670f, **671**
Nervios del pene y óxido nítrico 888
Nervioso, factor de crecimiento *véase* NGF
periférico, sistema 1384
sistema, desarrollo **1383-1397**
Netrina, proteína atrayente 1389f
Neuraminidasa, tetrámero de 143f
Neurexina 1149f
Neuritas, crecimiento hacia el cerebro 1388f
y cono de crecimento 1387-1389
Neuroblastos 1360f
Neurodegeneración y plectina 1006
Neurodegenerativas, enfermedades 1479
Neurofibromatosis 1009, 1010
Neurofilamentos **986**, 987f
gliales 987f
proteínas de 985f
Neuroligina 1147, 1149f
Neuromuscular, unión **684**f, 685, 687f, 688
Neurona(s) 412f
adaptación 690
adicionales y divisiones asimétricas 1359, 1360f, 1361
ajuste del número 1126f
cadherinas 1138t
N-cadherinas 1136
carácter asignado al nacer 1385, 1386
células ES 1481f
como célula polarizada 806f
conducción saltatoria 680
de vertebrado, estructura 1049f, 1383f
degeneración y priones 1499f
del olfato 917f
desarrollo **1383** y sigs.
en cultivo 504f
estructura 675f
forma y comunicación a larga distancia 676
inmaduras, migración 1385f
mielinización 680f
morfología y citoesqueleto 1047-1050
motoras medulares 688f
motoras, proteína de supervivencia *véase* SMN, proteína
olfativas 1429f
potencial de acción 676
producción continua 1478f
producción programada de tipos 1368f
retinianas difusas 1394f
sinápticas, crecimiento 1109, 1110f
sistema de conexiones 1383f
SNARE 763
uniones tipo gap 1162f
Neuronales, células madre 1478, 1479f
fases del desarrollo 1384f
mapas ordenados 1390, 1391f, 1392f
Neurotoxinas y unión neuromuscular 684, 685
Neurotransmisor(es) **682** y sigs., 882f, 883f
eliminación 683
excitadores 684
inhibidores 684
liberación 808
receptores de 1149f
secreción 683
Neurotrofinas 1390
Neurulación 1370
Neutrófilo(s) **787**, 788f, 1452f, 1532, *véase también* Leucocitos
apoptosis 1117
CSF 1460, 1461
eyección de cromatina 1533f
filamentos de actina 969f
funciones 1453t
quimiotaxis 1045f
Neutrones 45
Nexina en flagelos 1032f
NF-AT 711f
NF-H, proteínas 1005
NF-M proteínas 1005
NFκB, proteínas 1334
proteínas e inflamación 951-954
proteínas y estrés 951-954
retroalimentación negativa 954f
NFκB, gen 946
NGF acción periférica 1390
crecimiento de neurita 1390f
y RTK 923t
Niacina y coenzima 167t
Nicho de células madre 1441, 1442f
Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido *véase* NADPH
adenina dinucleótido fosfato *véase* $NADP^+$
adenina dinucleótido reducido *véase* NADH
adenina dinucleótido *véase* NAD^+
Nidógeno 1166f
Nitratos y cáncer 1224f
Nitrógeno, abundancia 47f
enlace 50f
fijación 12 y sigs., **100**, 101
orbitales electrónicos 48f
NK, células 1453, 1536f
células, funciones 1453t
células y virus 1536
Nkx, proteínas reguladoras génicas 1372f
NMDA receptores **691**, 1148f
y aprendizaje adulto 1396
NMR **529**, 530t
NO como señalizador 881
difusión celular 889
musculatura lisa 888f
señalización **887-889**
sintasas *véase* NOS
No disyunción 1279
Nocodazol 988t
NOD, proteínas 1531
Nodal, gen 1376f, 1377
y desarrollo animal 1316t
Nodo 1401f
Nódulos de Ranvier 680f
Noggin 941
Noguina y desarrollo animal 1316t
Nomarski, microscopía de contraste de fases interferencial 584f
Noradrenalina 884
inhibidores de la recaptación 687
Norepinefrina *véase* Noradrenalina
Northern, transferencia **538** y sigs.
NOS 88f, **889**
Notch **946**-948, 1132, 1324f, 1325
activación 948f
cáncer 1241
desarrollo animal 1316t
inhibición letal mediada por 947f
patrón del disco del ala 1352
procesamiento de 948f
receptores 1594
señalización 1361, 1362, 1357, 1426
señalización, bloqueo 1360f
señalización y células intestinales 1439, 1440
Notocorda 1366f, 1367f
alargamiento 1370, 1371
Noxa, proteína 1123f, 1124
NPC 358, 359f, **705**
difusión regulada por barrera 706f
importación activa 706f
mitosis 711, 712f
peso molecular 705, 706f
regulación del transporte 709, 710, 711f
situación en envoltura nuclear 706f
tamaño límite de proteínas 705, 706f
NSF 764
separación de SNARE 764f
NtrC, proteína activadora 438f
Nucleación 978f
de la hélice de DNA 306f
formación del citoesqueleto 972f, 973f
organización de filamentos 998, 999
Nucleares, señales de localización 705-707f
Nucleasa(s) de eliminación 299f
de restricción 532, **533**, 535f
función 159t
velocidad de reacción 161f
Núcleo(s), ambientes distintos 241f, 242
celular 695, 696f
celular, envoltura 200
de células somáticas, trasplante 507, 508
de eucariotas 26, 27f
estructuras internas 365f
eucariótico estructura 201f
eucariótico y DNA 200, 201
génesis mitocondrial 866, 867
hermafrodita 476f
hijos, formación 1090
matriz 242
nucleosómica 212f y sisgs.
nucleosómico, cambio 216f
Orión evolutivo 700f
señal de exportación 702t
territorios de los cromosomas 239f
transporte molecular 704-713
volumen relativo 697t
Nucleocápside **1497**f
Nucleoide del cloroplasto 858
mitocondrial 858
Nucleolo(s) 27f
ciclo celular 363f

disociación 363f
estructura 362f
estructuras subnucleares 363-366
función **361** y sigs.
fusión 363f
Nucleoporinas 705, 706f
Nucleósidos, nomenclatura 117f
trifosfato, hidrólisis y citoesqueleto 980
Nucleosoma(s) 211
acetilación y regulación génica 443
curvatura del DNA 214f
definición 211, 212
dinamismo 215f, 216
empaquetamiento 216-218
estructura 211f, 212f
horquilla de replicación 289, 290
paternos y aparato de replicación 290
remodelación 442, 443f
unión a histona H1 218f
Nucleótido(s) **3**f, 55, 56f, **61**, 116f, 198f
C desaminados 300, 301f
C metilados 300, 301f
canal regulado por 669
complementarios 3f
definición 61, 62
frecuencia de cambios 264
funciones 117f
hidrólisis en filamentos 976
hidrólisis y crecimiento de actina 979f, 980
inusual, reconocimiento 300f
nomenclatura 117f
reparación por eliminación **298**, 299f
secuencia y secuencia de aminoácidos 549, 551f
secuenciación 532
traducción a aminoácidos 368f
trifosfato y creación de ribozima in vitro 406f
triplete de *véase* Codón
unión 197
Numb, proteína e inhibición lateral 1358f
Número atómico 46f, 49f
atómico y microscopio electrónico 606
de Avogadro 46
de recambio 159

O

Obesidad 1475
y leptinas 1476
Océanos, afloramientos hidrotermales 12, 13f
Ocludina y cordones selladores 1152, 1153f
Oct1 Pou, dominio, secuencia reconocida 418t
Octámeros de histonas 211, 212f, 213, 214f
Octoglucósidos 636, 638f
β-Octoglucósidos, estructura 638f
Oído, célula ciliadas 1430f
interno, cadherinas del 1138t
Ojo de *Drosophila* 465, 466f, 927f
Okazaki, fragmentos de 267 y sigs.
Olfato y expresión génica 452
y GPCR 917
Oligoclonal, respuesta 1545
Oligodendrocitos 680
y células ES 1481f
Oligosacáridos 56
complejos 113f, **774**f
estructura 113f
y plegamiento de proteínas 738, 739f
ricos en manosa **774**f
unido a asparagina 737f
N-Oligosacáridos 737f , 738
aparato de Golgi **772**, 773f, 744, 775f
estructura 777f
procesamiento 773f, 774, 775f
O-Oligosacáridos 738, 775
Omatidios 927f
Omi y apoptosis 1125
OMP descarboxilasa y velocidad de reacción 161f
OmpA, proteína 635f
OMPLA, proteína 635f
Onchocerca y diseminación del huésped 1519
Oncogén(es) **1231** y sigs.
cultivos celulares 505
colaboración entre 1242f
Ras 1233, 1234
retrovirus 1232
Oncogénica, adicción 1260
Ondas desfasadas 581, 582f
en fase 581, 582f
Oocito(s) 1269, 1287-1292
activación 963f
calcio citosólico 1299, 1300
cantidad de mRNA 493
citoplasma 1287, 1288
cubierta 1288
de *Drosophila*, estructura 1333f
de *Drosophila* y genes de polaridad del huevo 1333, 1334
de *Xenopus laevis* 512
desarrollo independiente 1287, 1288
etapas de desarrollo 1288-1290
fecundación y concentración de calcio 912f
formación 1281
humanos, fases de desarrollo 1291, 1292f
maduro *véase* Óvulo
primarios 1288, 1289f
primarios, estructura 1291f
tamaño en especies distintas 1287f
y SNARE 764
zona pelúcida 1297
Oocito-espermatozoide, mecanismo de fusión 1298, 1299
Oogénesis 1288, 1289f, 1290
Oogonia 1288, 1289f
Operón(es) **433** y sigs.
bajo un solo promotor 462
Lac, control dual 437f
Lac, transcripción 435, 436
Trp 435
Opio y vacuolas vegetales 782
Ópticos, métodos e interacciones proteicas 524-526
Orbitales electrónicos 46, 47
ORC 287, 289f, **1068**, 1069f
sitio de unión 288f
Orden y calor 68
Organismo(s), crecimiento de 1108
fotosintéticos 840 y sigs.
modelo 25
pluricelulares, colaboración celular 1205
transgénicos **566** y sigs.
Organizador de Spemann 1368
Órgano(s) de Corti 1430f, 1431f
definición del tamaño 1424f
desarrollo y proteína reguladora 465, 466f
linfoides centrales 1543
linfoides humanos 1540, 1541f
linfoides periféricos 1543
linfoides primarios 1543
linfoides secundarios 1543
vegetales, estructura determinada 1398
Organogénesis y ES 507
y genes reguladores 1362
Organotrofos, organismos 12
Orgánulo(s) **695** y sigs.
cantidad relativa de membrana 696, 697t
células hijas 1098
DNA 856f
eucariotas, evolución 814, 815
evolución 697-699
fabricación de novo 702
función 695
herencia materna 865, 866
información para la formación 702, 704
posición dentro de la célula 697
proteínas transportadoras 695
rodeados de membrana, transporte intracelular 1021, 1022
subnucleares y macromoléculas 242f
transformadores de energía 813
Origen de replicación 209, 210f, **281** y sigs., 1067
hemimetilado 284f
metilado 284f
Oro coloidal 598f
coloidal e inmunodetección 606, 607f
Ortólogos, genes 20f
Oscilaciones de calcio 912, 913f, 914
Oscilador de expresión génica 1371 y sigs.
Oscilatoria, expresión génica 1373f
Oskar, proteína 1023
Osmio, tetróxido de 605f
Osmolaridad 663, 664f
bomba de Na^+/K^+ 663
eritrocitos humanos 663f
Ósmosis 663, 664f
Osteoblastos 1179, **1470**, 1471f, 1473, 1474
función 1470
Osteocitos 1468, 1470
Osteoclastos 1472 y sigs.
estructura 1473f
Osteogénesis imperfecta 1187
Osteoide 1470
Osteomucoide 1471f
Osteopetrosis 1474
Osteoporosis 1474
Osteoprotegerina 1474
Osteosarcoma 1226f
Ouabaína 663
Ovario, cáncer 295t, 414f
células germinales 1282
floral 1401f
respuesta celular inducida 907t
Oveja Dolly 1287
Oviductos y capacitación 1297
Ovulación 1278, 1281, 1290, 1291
Óvulo(s) 1269, **1290**
fecundado, información hereditaria 2f
floral 1401f
maduro 1057f
tamaño en especies distintas 1287
OXA, complejo 714f, **715**, 718f
Oxalacetato 99
Oxidación 71f, 72
β en peroxisomas 721
bacteriana de ácido fórmico 871f
biológica y combustión 820f
energía de y ATP 817, 819
por etapas 88f
reacciones y ribozimas 405t
Oxidasa del citocromo P-450 1225, 1226f
Óxido nítrico *véase* NO
Oxidorreductasas, función 159t
Oxígeno, abundancia 47f
bicapas 652
enlace 50f, 51f
niveles atmosféricos y evolución 874f
peroxisomas 721, 722
reducción en citocromo oxidasa 833f
toxicidad 874

P

P_2, células 1324f, 1325
p16, gen 1243
proteína, función 1066t
p21, proteína 1105, 1106f
función 1066t
p27, proteína 1064f, 1066t
función 1066t
p53, gen 1105, 1106f, 1246, 1247, 1252t
gen, acción normal 1246f
gen y cáncer 1246, 1247, 1252t
proteína supresora de tumores 1123
proteína, unión al DNA 423, 424f
secuencia reconocida 418t
p120-catenina 1156f
Palmitilo, anclaje 631f
regulación de proteínas 186t
PAMP 1528
Páncreas 1444f
cáncer, incidencia 1224f
Paneth, células de 1436f, 1437f, 1441f
Pantalla del microscopio electrónico 605
Papaína 1012
Paperas, virus, forma del 1496f
Papilas dérmicas 1418f
Papilomavirus 1248
cáncer cervical 1248f
forma 1496f
genes 1248, 1249f
humano 1499
Papovirus 1228t
PAPS 776f
Paquiteno 1275, 1276f
Par, genes 1156
redox 828, 829
Par/Par6/aPKC, complejo 1156, 1157f, 1361
Par2, proteína 1361
Par3, proteína 1156, 1361
Par4, gen 1156
Par6, proteína 1156
Paracelular, transporte 1152
Paracrina, señalización 882f, 883f
Parálogos, genes 20f
Parasegmentos de *Drosophila* 1329
Parasitismo, niveles 1486f
Parásitos intracelulares, invasión del huésped 1509-1511
y cáncer humano 1227, 1228

Parathormona, respuesta celular inducida 907t
Parches hidrofóbicos del DNA 417f
Pared celular 14
primaria **1197-1198**
secundaria 1195, 1196f
vegetal 1195-1202
vegetal externa 1197f
Pareja de dominios de proteínas 141, 142
Parentesco y secuenciación 139, 140
Pares de bases 197
Parkinson y ES 506
ParM, proteína 990f
PARP, enzima y cáncer 1258
ParR, proteína 990f
Partenogénesis 1287
huso mitótico 1081
Parvovirus canino y proteínas motoras 1516
forma 1496f
tamaño 1497
Pata, desarrollo y *Distal-less* 1351f
Patch-clamping *véase* Registro de zona
Patched, genes humanos 951
proteína transmembrana 950
y desarrollo animal 1316t
Patogenicidad, islotes de 1491
Patógeno(s) **1485-1539**
barreras protectoras, 1501, 102
células fagocitarias 1531-1533
conducta del huésped 1518, 1519
evolución 1519
facultativos 1490
fagocitosis 1528 y sigs.
filogenia 1488, 1489
genoma 551
humanos, genoma 551
interacción con el huésped 1486, 1487
intracelulares 1505
obligados 1490
oportunistas 1490, 1491
patrones moleculares asociados a *véase* PAMP
primario 1486
requisitos de supervivencia 1487
resistente a fármacos 1522-1524
Patrón de DNA 200, 201f, 266
de *Drosophila*, formación **1328-1341**
del desarrollo y vías de señalización 1316, 1317
generación y retroalimentación positiva 1315
moleculares asociados a patógeno *véase* PAMP
Pauta de lectura 367, 368f y sigs.
abierta YDR196C 189
cambio 383, 384f
Pax, proteínas reguladoras génicas 1372f
Pax3, proteína 1465
Pax6 y desarrollo en especies distintas 1306f
Pax7, proteína 1465
Paxilina 1135t, 1176
PC12, línea celular 506t
Pcdh γ cadherina 1137f
PCR **544**
en medicina forense 546, 547f
obtención de clones genómicos 546f
PDGF 922, 923f, 926f, 1102, 1448, 1450
señalización 1441, 1442
y RTK 923t
PDI 736
PDK1 934
PDZ discs-lost, proteína 1156
dominios 1148f
Pectina 1198f
composición y funciones 1199t
Pedestal 1504
Pelos radiculares 1407f
secretores, estructura 1405f
vegetales *véase* Tricomas
Pelúcida, zona 1288f
Pene, nervios autónomos y NO 888
Pénfigo y desmosomas 1144
Penicilina 1524
resistencia a 21
Penicillium y producción de antibióticos 1524
Pentosas 112f, 116f
Peptidasa, señal **701**, 702, 727f
Peptidil transferasa 376f
inicial 407
Peptidil-tRNA 373f
final de síntesis proteica 381f
Péptido(s) de fusión 765
factores de elongación 377, 378
sintasa 407
transporte 1583f
unido a proteína MHC de clase I 1579f
unido a proteína MHC de clase II 1580f
Per, gen 462f
Pérdida de heterocigosidad *véase* LOH
Perdigonada, método de secuenciación 552
Perforina 1573
Periciclo 1404f
Pericitos 1445, 1446f
incorporación 1450
Periferina 985t
Periodo crítico de mantenimiento de sinapsis 1395
Periplasma y transporte 665f
Perlecano 1165, 1166f
cadenas GAG 1184t
Permeabilidad, coeficiente en bicapa sintética 653f
de bicapas lipídicas 652f
Permeasa(s) *véase también* Transportador de membrana
de lactosa **657**, 658f
Permisivas, condiciones 555f
Peróxido de hidrógeno 721, 722
Peroxinas **722**, 723
Peroxisoma(s) 27f, 696f, **720f**, 721, 723
de la hoja 722f
formación 723f
función 721, 722
receptor activado de proliferación *véase* PPAR
secuencias señal *véase* Peroxinas
señal de importación 702t
vegetales 722f
volumen relativo 697t
Perro, genoma 551
Pertussis, toxina 907
Peso atómico 45
molecular 45
molecular de proteínas y SDS-PAGE 517, 518
PET, imagen 1206f
Pétalos 1401f, 1401f, 1412f
Peutz-Jeghers, síndrome 1156
Peyer, placas 1541f
Pez cebra, duplicación génica 255
mutantes y genes del desarrollo 1311
procesamiento visual 556
Pez globo 251f
genoma 31f
Pez, mapa neuronal 1391f
PGC 1282-1286
estimulación y células de Sertoli 1285
migración en mamíferos 1283f
migración y ácido retinoico 1285
señales de células vecinas 1282, 1283
pH 109f, 899, 934
citosólico y transportadores 657, 658
escala 52
estomacal 1436
isoeléctrico y separación de proteínas 521f
lisosomas 782
potencial redox 830f
vacuolas vegetales 781, 782
PI 627, 755-757f, 910f, **933**
PI 3-quinasa 627f, 762f, 788f, 925, 926f, 933f, 934, 1108, 1109f
de clase Ia 933
de clase Ib 933, 934
PI 3-quinasa-Akt, vía de señalización 934, **935f**
PI 4-fosfato 910f
PI quinasas 757
dinamina 757, 758f
retrómeros 755
PI(4,4)P_2 *véase* PIP_2
Piel, cadherinas 1138t
cáncer 295t
de mamífero, estructura 1418f
y agentes patógenos 1502
Pigmentación defectuosa y mutación de la miosina V 1022
Pigmentos, movimiento de gránulos 1024f
visuales 1432f
Pilina 1520
Pin, proteínas vegetales 959
Pin1 y patrón de meristemos 1409f
Pinocitosis 787, **789** y sigs.
clatrina 789, 790
Pinzas magnéticas 527
ópticas 527, **598**, 599f
PIP 756, 757f, 933
complejos de señalización 897, 898f, 899f
fosfatasas 757
quinasas 757
retrómeros 755
PIP_2 909-911f
Piridoxina y coenzima 167t
Pirimidinas 61, 197
estructura 116f
Piruvato, carboxilasa, acción 84f
ciclo 819f
descarboxilasa 96f
deshidrogenasa, estructura 169f
hidrólisis anaeróbica 90f
oxidación 96f
Pitx1, gen y regulación embrionaria 1313f
Pitx2, gen 1376f, 1377
PKA 900, **907-909**, 936f, 951
activación 908f, 909f
PKC 185, 626, **911**, 936f
activación 911f
atípicas 911
cáncer 1226
convencionales 911
Placa(s) ateroscleróticas 791, 1500f
celular **1097f**, 1098f
celular precoz 1098f
de cultivo 502, 504f y sigs.
fibrosa 1405f
metafásica 1084
neural 1370, 1371
Placenta, cadherinas de la 1138t
Placofilina 1135
estructura 1144f
Placoglobina *véase* γ-Catenina
Planta(s) acción del NO 888
C_3 846
C_4 846, 847f
citocinesis 1097f, 1098
complejo ARP 998f
construcción modular 1398f
control del tamaño celular 782, 783f
desarrollo **1397-1415**
diferenciación celular 411, 413f
eje raíz-tallo 1400-1402
estructura 1404f
estructura del embrión 1401f
fijación de carbono 841 y sigs.
fijación de nitrógeno 13
genes mitocondriales 863
organización pluricelular 1306
paredes vegetales 1195, 1196f y sigs.
patrón repetitivo 1408f
peroxisomas 722f
reguladores del crecimiento 1403, 1406f
señalización en 955-961
sistemas histológicos 1404f, 1405f
transgénicas 568, 569f
transgénicas, obtención 569f
vacuolas 781f, 782f
Plaqueta(s) **1451** y sigs., 1452f
estructura 1102f
factores de crecimiento derivados 923t, 1102
funciones 1453t
no agregación 1173t
vitelinas 1287
Plasma 1102
Plasmalógenos, estructura 722f
síntesis 721, 722
Plásmidos 21, 540, 541f
con resistencia a antibióticos 541
de virulencia 1491
replicación 541f
segregación y proteínas homólogas de actina 990f
Plasminógeno, activador del 1194
Plasmita 1194
Plasmodesmos **1162-1163**
Plasmodium falciparum 1494, 1495f, 1496, 1502
genoma mitocondrial 858, 859f
respuesta inmunitaria 1520
transportador ABC 666
Plastidio(s) **841f**, 842
desarrollo 698, 699f
evolución 855, 859, 860
formas 841f
genética 855-876
origen evolutivo 700f
señal de importación 702t
Plastos 813
proteínas específicas 867
PLCβ, activación por GPCR 910t
Plectina 995, 1005, 1006f, 1135t
Plegamiento del tRNA 368f
HDV del RNA 406

ligasa del RNA 406
y conformación estable 64f
Pliegue de la histona 212
Ploidía y tamaño del animal 1111, 1112
Plomo y microscopio electrónico 606
Pluricelulares, organismos 1
desarrollo **1305-1450**
especialización 453 y sigs.
expresión génica 411 y sigs.
Pluriestratificada, epidermis 1419
Pluripotente, célula 568
PMS2 295t
PNA y almacenamiento de información 402f
Pneumocystis carianii y respuesta inmunitaria 1520
Población de células hijas 1421
localizada lateralmente 1218
tamaño y diseminación de mutaciones 257, 258
Poder de resolución 581f
Pol, gen 383
gen del HIV 485f
Polar, estructura 50
Polaridad, celular planar **1157**f, 1158
del huevo, genes de *Drosophila* 1332, 1334f
epitelial 1150, **1155** y sigs.
planar 1358, 1359f
planar, control 1359f
Polaroplasto 1511f
Polen, cloroplastos y variegación 866
grano de 1401f
Poli-A, adición 481, 482, 483f
adición citoplasmática 492
Poliacrilamida, gel 517
Poliadenilación del extremo 3' 345, 346
Policistrónico, mRNA 380, 381f
Policlonal, respuesta 1545
Poligénicos, caracteres 563
Poliisoprenoides 115f
Polimerasas, función 159t
Polimerización 5' a 3' 271ft
del DNA 3
por la cabeza 86
por la cola 86
sobre patrón 4
Polímeros, formación 63
Polimorfismos de un solo nucleótido *véase* SNP
en genética humana 560 y sigs.
Polinucleótido(s) como catalizadores 401, 402
quinasa 536f
síntesis 87f
y almacenamiento de información 401, 402
Polio y vacunación 1499f
Poliovirus, cápside 1489f
entrada en la célula 1507f
membranas del huésped 1515f
Polipéptido(s) **5**, 59, **125** y sigs.
ángulos de enlace 127f
aparato de traslocación 730 y sigs.
crecimiento 8f
crecimiento y ER 730 y sigs.
extremo *C*-terminal 60, 131, 373f
extremo *N*-terminal 59, 131
flexible y dominios de unión al DNA 425f
incorporación de selenocisteína 383f
parcialmente desestructurados 147
plegamiento en el lumen 736
Poliploide, organismo 236
Pólipos colono-rectales 1251, 1252f
Poliposis coli adenomatosa familiar *véase* FAP
Polirribosomas 382f, 696f
ER 728, 729f
fabricación de proteínas 381, 382
Polisacáridos 56, 63f
estructura 113f
rotura y lisozima 164f
síntesis 85f
Polisomas *véase* Polirribosomas
Polispermia, bloqueo 1300f, 1301
Politenia 236
Poliubiquitina y proteína diana 184
Poliubiquitinación 395f, 795, 925
Pollo y embriología experimental 1310f
Polo, fase de alejamiento 1085, 1086f
fase de aproximación 1085, 1086f
Polycomb, genes del grupo 1344f, 1412
Pop, gen 1325
Pop1, proteína reguladora génica 1325
Porfirina, anillo de, estructura 831f
Porina 635f, 667
forma 144f
inserción en bacterias 717
mitocondrias 717f, 816
selectividad 635
Poro acuoso, filtro de selectividad 668f
criboso 1405f
en membrana celular 667
Poros nucleares 27f
complejo *véase* NPC
tamaño 705
y SEM 609f
Porphyromonas gingivalis 1500, 1501
Posición de variegación, efecto 221f
Posicional, valor 1312f, 1313
Posterior, genes de polaridad 1332f, 1334f
Postraducción controlada por hierro 493f
Postraduccional, mecanismo y mitocondria 714
translocación 724f, **725**
Postranscripción, controles 477 y sigs.
Postsináptica, membrana 1149f
Potasio, abundancia 47f
canales de 632, **688f-690**
canales de fuga **669**, 671
extracelular 652t
intracelular 652t
orbitales electrónicos 48f
Potenciación a largo plazo *véase* LTP
Potenciador 441
de genes 452f
proteínas de regulación génica 447f
Potencial de acción **676f**, 678
de acción, propagación 677f
de equilibrio 670f
de membrana 654, **669**, 670f, 671f
de reposo de membrana **671**
de reposo y bomba de Na^+/K^+ 671, 672
postsináptico *véase* PSP
redox 828, **829**, 830f
redox, medición 830f
redox y cadena de transporte de electrones 835f
Pou, dominio 425f
Poxvirus, forma 1496f
tamaño 1497
PPAR 890, 1475
PPARγ 1475
Precursor proteico de cloroplastos 720f
Preiniciación, complejo de 1067
Pre-mRNA, eliminación de intrones 347, 348
eucariótico, modificación 346
maduración 365f, 366
Prenilo, grupos 630f, 631f
Prepéptidos y ER 803
Pre-proteína y vesículas secretoras 803f
Pre-RC 288, 289f, **1067**, 1068f
Pre-RNA, hipótesis 403
Presenilina 947
Presentación cruzada 1585
Presináptica, membrana 1149f
Presión de turgencia *véase* Turgencia
Primates, edición de A a I 484, 481
Primeros mensajeros 893
Prión(es) **1498-1499**
enfermedadas causadas por **397**f y sigs.
formación de cadenas in vitro 398f
funciones positivas 399
Proapoptópicas, proteínas 1122, 1123f
Procadenas β 1186
Procariota(s) 14
diversidad bioquímica 14, 15
estructura del mRNA 346f
gen a proteína 345f
inhibidores de la síntesis proteica 383, 384
intercambio genético 22
nichos ecológicos 15
transportador ABC 665f
Procaspasas **1118**, 1120f
activación 1119f
ejecutoras **1118**, 1119t
iniciadoras **1118**, 1119t
Procesamiento de imágenes microscópicas 583, 584f
Procolágena 1186
organización en fibrillas 1187f, 1188f
Profago, estado de λ 457
Profase 1054, **1071** y sigs.
I 1091f
I, estructura bivalente 1274
I temprana 1274, 1275
meiótica 1091f
reordenación de telómeros 1274f
sinapsis cromosómica 1276f
Profilina 994, 999, 1000f
monómeros de actina 999f
Profundidad de campo del microscopio electrónico 606, 607
Progesterona, receptor 891f
Progresión tumoral 1210
Prohormonas, procesamiento 803f
Proinsulina, formación 152f
Prolactina 939t
Proliferación celular 1102, 1305, 1306f
Prolina 127f, 129f
Prometafase 1071, 1072f y sigs.
Promotor(es) **337**, 440, 441f
ensamblaje a factores de transcripción 442
inducible 564
proteínas reguladoras integradas 450f
secuencia consenso **338**f, 339
tumorales 1226, 1227f
tumorales, mecanismo 1227f
tumorales, umbral de exposición 1227f
único 433
Pronucleares, genes 1356
Pronúcleos, unión 1301f, 1302f
Pro-opiomelanocortina, procesamiento 803f
Propano, enlace 50f
Propéptido 1186
Proplastidio 698, 699f, 841f
Prosecuencia N-terminal 803
Prostaglandinas 910
Próstata, cáncer de 295t, 414f
incidencia 1224f
Protaminas 1293
Proteasas, función 159t
receptores de superficie celular 1194f
Proteicas, interacciones y métodos ópticos 524-526
mapa de interacciones 188, 189, 524
Proteicos, complejos de gran tamaño 184
complejos, medidas hidrodinámicas 522
Proteína(s) 63f, **124-193**, 1108, 1109f
AAA 393f
Abf1 288f
accesorias 965
acción catalítica 6f
agregados de gran tamaño 151
almacenamiento en endosomas 798f
amiloide, precursor de la *véase* APP
análisis 517-532
ATM 304
ATM afectada 295t
azul fluorescente 526f
B_7 1591
bacteriana FtsZ 989f
Bcr-Abl 1261f, 1262f
Bicoid 448f
Brca1 310
Brca2 310
BtuCD 183f
cadenas laterales 126f
caja-F 184, 189f
cargadora de helicasa 283f
casquete 994
casquete y filamentos 1003f
catálisis 5, 6
cebo 525f
central de proteoglucanos 1181f
chaperonas moleculares 388 y sigs.
citosólica activadora de GTPasas *véase* GAP
coestimuladoras 1572f
confinamiento en membrana 645, 646f
conformaciones 126
constante de equilibrio de la unión 157, 158
Cro 420f, 421f, **457**, 458f
cromosómicas no-histonas 211
cuerpos multivesiculares 795f
de activación génica 443f
de agregación *véase* Proteínas de armazón
de entrecruzamiento de actina 1006 y sigs.
de filamentos intermedios 985t
de función desconocida 155
de homeodominios 420, 421
de interacción celular en animales pluricelulares 1308, 1309
de intercambio de fosfolípidos 745
de la heterocromatina 1 *véase* Proteína HP1
de la lactosa, represor de 416
de neurofilamentos 985f
de reparación 310
de resistencia a muchos fármacos *véase* MDR
de secreción 800, 801
de señalización **880** y sigs.

de señalización extracelulares y densidad celular 1110, 1111
de shock térmico 388 y sigs.
de transporte de membrana 9, 10f, **652**, 653
de uniones estrechas 1153f
del desarrollo en especies distintas 1306f
del poro nuclear *véase* Nucleoporinas
del retinoblastoma *véase* Rb
desconocidas y espectrometría de masas 518, 519
desestabilizadoras de la hélice *véase* Proteínas SSB
desnaturalización 130
desplegada hexamérica 393f
desplegadas, respuesta a 740, 741f
destino celular y señal N-terminal 380
determinación de la función 530, 531
dimérica, simétrica 142f
disulfuro isomerasa *véase* PDI
dorsal, transporte nuclear 710f
E1 393 y sigs.
E2 393 y sigs.
E6 y papilomavirus 1248, 1249
E7 y papilomavirus 1248, 1249
efecto dominante negativo 564f
efectoras 879, 880f
EF-Tu 179, 180
eliminación selectiva de función 527
empaquetado hexagonal 148f
ensamblajes 145f
epiteliales, distribución 645
especificidad 153f
estructura 124 y sigs.
Eve 448f
evolución de la síntesis 406, 407
expresión ectópica incorrecta 564f
expresión y tipos celulares 414f
extracelular, unión con integrina 1170f
extracelulares 148
fabricación específica 546, 548f
familias 137-139
ferrosulfuradas 831
fibrosas 145, 146
fibrosas y tejido conjuntivo 1179
fluorescente verde *véase* GFP
fluorescentes y células vivas 592, 593
forma **124** y sigs.
fosforilación 174, 175, 176f
fragmentadoras 1000
función 152 y sigs.
funcional, formación 388f
G_{12} 916
Gag y cambio de pauta de lectura 383
Gal4 442f
genes 195
Giant 448f
glial acídica fibrilar 985t
globulares 145
glucosilación 737f
G_q 909 y sigs.
Grb2 929
guía 932
helicoidales 143, 145
hibridación con anticuerpos 517, 518
hidrosolubles y ER 727
HP1 231, 238f
Hsp70 del retículo endoplasmático *véase* BIP
humanas de función desconocida 142
Hunchback 448f
incompletas, destrucción 394
inhibidoras de Cdk *véase* CKI
inhibidoras y regulación 903f
inhibidores de la síntesis 383, 384
iniciadoras 1067
inicio de síntesis y mRNA 379 y sigs.
integrales de membrana 630
interfases de unión 156
intracelulares de anclaje 1134f
isómeros ópticos 128f
"kringle", módulo 140f
Krüppel 448f
Ku 303f
latentes reguladoras de genes 946 y sigs.
lectura del DNA 416, 417
lisosómicas, reconocimiento 783, 784
localización con microscopio electrónico 607f
localización de secuencias en DNA 551f
lugares de unión 145f
mal ensambladas y ER 768
mal plegadas y ER 739f, 740f
manipulación 501, **510** y sigs.
marcadora y expresión génica 572f
mediadoras de RNA polimerasa II 342, 343f
membrana lipídica, asociación 630f
metionina y extremo N-terminal 380
mitocondriales, precursores de 715f, 716
modificaciones covalentes 187f, 412
modificadoras de cromatina de la RNA polimerasa II 342, 343f
moléculas con uniones covalentes 186t
morfogénica ósea 4 *véase* BMP4
morfogénicas óseas *véase* BMP
motivo hélice-giro-hélice 419
multipaso 632
MutL 277f
MutS 277f
NF-H, sobreexpresión 987
NF-L sobreexpresión 987
NFκB 951-954
núcleo de proteoglucanos 776
nuevo plegamiento 131f
Numb 1358f
ortólogas 139
p16 1243
p27 1064f, 1066t
p53, modificaciones covalentes 187f
p53 y cáncer 1247
parálogas 139
PcG 238f
periféricas de membrana 630
periplasmática de unión a sustratos 666f
peso molecular y SDS-PAGE 517, 518
plegadas anormalmente 396 y sigs.
plegamiento 130f y sigs., **736** y sigs.
plegamiento durante la síntesis 387, 388, 389f
Pol y cambio de pauta de lectura 383
Policomb 446f
precursoras mitocondriales 714
priones 1498, 1499
programa de alineamiento de secuencias 531
propiedades químicas 154
PrP 397f, 398
purificación **510** y sigs.
purificación por tag-tagging 515
que forman ejes 1006
que forman haces 1006
que interaccionan, identificación 523
que unen GTP *véase* GTPasas
quimérica LexA-Gal4 442f
Rad51 307f
Rad52, estructura 308f
Rb 1235
RecA **307**f, 313f
RecA, función 306, 307f
receptores de clasificación 701
recubridoras de filamentos 1003
recuperación desde endosomas 793-795
región del genoma codificadora 540
regiones desestructuradas 147
regiones hidrofóbicas y control de calidad 391
relacionadas con la actina *véase* ARP
remodeladora de cromatina 228f
reprimidas mutuamente 456-458f
residentes del ER **736**, 767
Rev 485, 486f
Rho y citoesqueleto 1041 y sigs.
RuvA 311f, 312f
RuvB 311f, 312f
secreción desde TGN 800, 801f
seguimiento en células vivas 593-595
señal y desarrollo animal 1316t
señales de clasificación **699** y sigs.
serina/treonina quinasa, estructura 941, 942f
SMC 243, 244f
SMN 364, 365
SNARE 761f, 762f y sigs.
Spo11 312, 313
Src 1232
SSB 273, 274f, **306**
SSB, función 274f
SSB humana, estructura 275f
tamaño y NPC 705, 706f
tau 1001f, 1001f
tetramérica 143f
tiempo de síntesis 388
tirosina fosfatasa **938**, 939
tráfico celular 701f
translocación en mitocondrias 713 y sigs.
translocación y ER 724f
translocadores de 714f, 715
transporte entre compartimientos 695, **699** y sigs.
triméricas de unión a GTP *véase* Proteínas G
Upf 386f
vírica, presentación 1583f
WASp 1042
XMAP 1004, 1005
Proteína fosfatasa **176f**, 894, 896f
de especificidad dual 930
específica de tirosinas 929
Proteína G 896
canales iónicos 916, 917
específica del olfato 917
estimuladora 907
GPCR 905, 906f
inactiva, estructura 905f
inhibidora 907
producción de AMP cíclico 906, 906
receptores acoplados a 684, **882**, 893f, 1283
regulador de señalización *véase* RGS
subunidades 905
transducida *véase* G_t
triméricas, familias 919f
Proteína MHC **1570** y sigs., 1588, 1589
de clase I 1577f, 1578, 1579f, 1581t
de clase II 1577f, 1578, 1580f, 1581t
linfocitos T 1575, 1576f
Proteína quinasa **176f** y sigs., 880, 894, 896f
árbol evolutivo 177f
C *véase* PKC
C atípica *véase* aPKC
como microchips 177, 178
estructura 176f
eucariotas, frecuencia 141f
regulación 177, 178
y MAP 1001
Proteína quinasa dependiente
de AMP cíclico *véase* PKA
de Ca^{2+}/calmodulina *véase* CaM-quinasas
de cAMP *véase* PKA
de ciclina *véase* Cdk
Proteína Ras 926 y sigs.
función 179
hiperactiva y cáncer 1233, 1234
normal 1233
unida a GTP 180f
Proteína receptora 879
de M6P 784
intracelular 422, 423f
relacionada con receptor LDL *véase* LRP
Proteína represora
Cro 143
de lambda 420f, **457**, 458f
de genes 434, **445**, 446f, 447f
Proteína-DNA, interacciones 417 y sigs
Proteína-gen, relación 199f
Proteína-proteína, interacciones 188, 189f
Proteínas activadoras
de genes 435
de genes eucariotas 441 y sigs.
de genes y estructura cromatínica 442-444
de GTPasas de Ras *véase* Ras-GAP
de GTPasas *véase* GAP
de RNA polimerasa II 342, 343f
NtrC 438f
por catabolito *véase* CAP
Proteínas adaptadoras **754-756f**
de importación nuclear 708f
fosfoinositoles 756
Proteínas alostéricas
cinética de activación 900f
motor 182f
y enzimas alostéricas 172
Proteínas asociadas 965
a membrana, complejos 1157f
a microtúbulos *véase* MAP
Proteínas, control
de calidad 391f, 392
de la actividad 415f
por regulación de destrucción 395, 396
Proteínas de anclaje
de la quinasa-A *véase* AKAP
intracelular 1142f
Proteínas de armazón 147, 184, 185, 897, 898f, 949, **1148**f, 1149
y proliferación celular 1154, 1155
Proteínas de fusión **762** y sigs.
con GFP 593, 753
y GST 514, 516f

Proteínas de membrana 629-650
clasificación 794f, 806, 807f
complejos 642
difusión plana 642, 643f
endosomas 807f
glucosiladas 635, 636
métodos de estudio 703f
purificación **637** y sigs.
solubilización 636 y sigs.
uniones no-covalentes 630
y TGN 807f
Proteínas de regulación génica **416** y sigs.
en animales pluricelulares 1308, 1309
heterodimerización 424f, 425f
motivos estructurales 418 y sigs.
secuencias reconocidas 418t
Proteínas de unión
a ciclinas 515f
a CRE *véase* CREB
a CREB *véase* CBP
a DNA de cadena sencilla *véase* Proteínas SSB
a GTP 896f
a la TATA *véase* TBP
a PIP 757, 758f
de GTP 178, 179
Proteínas motoras 181, 182, **1010** y sigs.
dependientes de microtúbulos 1077, 1077f
huso mitótico 1034, 1035f
longitud del brazo de palanca 1020f
obtención de energía 1016 y sigs.
Proteínas reguladoras
aislantes 452
biogénicas 464f
de genes 222, 447f, 1400t
de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística *véase* CFTR
número de genes regulados 462, 463
organogénesis 465, 466f
Proteínas señalizadoras
inactivación 903f
intracelulares 880f, **894**, 895f
TGF, 939-941
Proteínas, síntesis 4f, 85f, *véase también* Traducción
diferenciación celular 412
directa 548
final de la 381f
Proteínas transmembrana 617, 618f, **629**, 630f
acorralamiento 647, 648f
de adhesión **1134**f
de bastón retiniano 1433f
de paso múltiple **632**, 634f, **734**, 735f, 736
de paso único **632**, 636f, 732, **733**f, 734f
y ER 727
Proteínas transportadoras 135, 854, 855
Proteínas, unión
a anclaje GPI 742f
a otras moléculas **153** y sigs.
de moléculas pequeñas 166, 167
hélice-hélice 156f
selectiva 153f
superficie-cuerda 156f
superficie-superficie 156f
Proteoglucano(s) 636, **776**,1165, 1166f, 1179, 1183f
de superficie como correceptores 1183, 1184
ensamblaje en el Golgi 775, 776
función 1183, 1184t
heparán sulfato 881
transmembrana 1177t
y GAG 1181f
Proteólisis de Notch 948f
regulada por proteínas 946-954
Proteómica 188
Proteosoma 392
cubierta 19S 394
degradación de proteínas 391f y sigs.
estructura 392f
mecanismo 392f, 393
ubiquitinación 395f
Protistas 32, 33
Protocadherinas 1136, 1137f, 1138t
Protofilamento **971**, 972f
Protón(es) 45, **52**
bomba 827-840
bombeo por memebrana 829f
en agua, comportamiento 828f
gradiente electroquímico 813, 814f, 815f, 820, **821**f y sigs.
Protooncogén(es) 1231 y sigs
amplificación génica 1237f
deleción 1237f
mutación puntual 1237f
mutación reguladora 1237f
reordenamiento cromosómico 1237f
transformación en oncogén 1237f
Protozoos 26
parásitos **1494-1496**
Protuberancia(s) celular 1036f y sigs.
celular, formación 1039f
de RNA 403f
hidrofóbicas del DNA 417f
Prox1, proteína reguladora génica 1448
Proximidad inducida 924
Proyecto Genoma Humano 206
Prozac 687
Prueba(s), corrección de 268 y sigs.
de complementación 555f, **558**
error en la biorientación 1083
PSD95 1148f
Pseudogén 255
Pseudomonas aeruginosa 1491
Pseudonudo de RNA 403f
Pseudópodos 788f, **1037**
PSP excitador 688
inhibidor 688
Pstl, endonucleasa 534f
PTB 899
PtK, línea celular 505, 506t
Puff de cromosoma politénico 239f
Pulgas y peste 1502f
Pulmón, alvéolos 1434
cáncer 414f
cáncer de células pequeñas 1256
cáncer de incidencia 1224f
cáncer de y tabaco 1266
y gen *Fgf10* 1381
limpieza 1434-1436
morfogénesis 1382f
origen endodérmico 1434
Pulso y caza 602f
Puma, proteína 1123f, 1124
Punto(s) cuánticos 588f
de control del ciclo celular 1061f
de control del ensamblaje del huso 1088
de control G_2/M 1061f
de restricción 1055
Pupa de *Drosophila* 1329f
Purificación por afinidad en tándem al etiquetado *véase* Tap-tagging
Purinas 61, 116f
Puromicina 384
efectos 385t

Q

Quemaduras y clonación 507
Queratán sulfato 1179
Queratina(s) **985**
ácidas 985f
básicas 985f
filamentos de 1144f
gen mutante 986f
microvilli 1154f
α-Queratina 131
Queratinocitos 1418f, 1419
basales en cultivo 1421
Queta mecanosensorial estructura 1356f
sensorial 1355
Quiasma 1276f
Quimérico, ratón
técnica 1380
y células ES 1381f
Química celular 45 y sigs.
Quimioquina 1183, 1283, 1454, 1534, 1550f
secreción 1596
Quimiorrepulsión en el embrión 1140
Quimiosmótico, acoplamiento **813**, 814f
Quimiotaxis bacteriana 942 y sigs.
en el embrión 1140
receptores 943, 944f, 945f
señales externas 1045, 1046
Quimotripsina 137, 139, 1012
forma 144f
Quinasa(s) activadora de Cdk *véase* CAK
circuito de retroalimentación 902f
de adhesión focal *véase* FAK
dependiente de calcio de la cadena ligera de miosina *véase* MLCK
dependientes de ciclina *véase* Cdk
función 159t
Janus *véase* JAK
receptoras de lectinas vegetales 957
S6 *véase* S6K
semejantes a Polo 1074
Src 1596f
Syk 1596f
Quinesina 125, **1014**
ATP 1016
ciclo mecánico-químico 1016-1018f
estructura 1014f, 1015f
identificación 527f
movimiento por microtúbulos 1051f
mutación 1048
origen evolutivo 1015, 1016
paso adelante 1018f
paso hacia atrás 1018f
patógenos intracelulares 1517
que anda 182
y ER 1021
Quinesina-4,10 1077f, 1082f
Quinesina-5 1077f, 1079, 1082f
Quinesina-13 995
Quinesina-14 1077f, 1082f
Quinona **831**, 832f
intercambiable 851f
Quitina 58, 1180
Quórum, detección 880

R

R1, línea celular 506t
R5P y síntesis de AMP y GMP 192f
Rab, efectores 761f
familia 927
formación del dominio 762
Rab, proteínas 760, 761, 927t
de unión 761
localización 761t
vesículas de transporte **760** y sigs.
Rab-GEF, proteínas 761
Rab-GTP 761f
Rab5-GEF 762f
Rabia, virus
forma 1496f
proteínas motoras 1516
Rabioso, huésped y diseminación de la enfermedad 1518
Rac 927t
GTPasa 931
organización de actina 1042f, 1043f
Rac-GTP 1043
Radiaciones ionizantes y cáncer 1208
Radical superóxido 834
Radio de van der Waals 51, 52f
y cáncer 1226f
Radioisótopos, producción para microscopía 600, 601
seguimiento en el organismo 601, 602
vida media 601t
Raf MAP-quinasa 929
RAG, complejo 1564
secuencias señal de recombinación 1564f
RAG1, proteína linfocitaria 1564
RAG2, proteína linfocitaria 1564
Raíz en crecimiento 1407f
primaria 1401f
primordio 1402f
Ramificación, morfogénesis 1381, 1382
vegetal, modelo indeterminado 1398
Ran 927t
gradiente de formas conformacionales 708, 709f
GTPasa **708**, 709
Rana, diferenciación celular 411, 413f
Ran-GDP 708, 709f, 746f
Ran-GEF y mitosis 711
Ran-GppNp, estructura 746f
Ran-GTP 708, 709f, 710, 711
Ran-GTPasa y mitosis 711
RANKL 1473
Ranvier, nódulos de 680f
Ras, activación transitoria 929f
activación y RTK **927**, 928f y sigs.
gen 928, **1233-1234**, 1241
gen y cáncer 1234, 1235
GTPasa 1103
MAP-quinasa 929, 930
oncogén 1242f
proteína 926 y sigs.
superfamilia 926 y sigs.

Ras-Gap 927
Ras-GEF 927
Ras-MAP-quinasas, señalización 929
Rasgos complejos 563
Rastreo evolutivo 155f
Ratón, biblioteca de mutaciones 569
como modelo de estudio 39, 40
embrión de **1378-1382**
genoma 551
impronta genómica 469f
líneas celulares 505
Mocha 811f
mutagénesis 556
mutantes y genes del desarrollo 1311
nulo *véase* Knockout
quimérico, técnica 1380
quimérico y células ES 1381f
secuencias B1 323f
transgénicos *566* y sigs.
transgénicos y estudio del cáncer 1242f
y hombre, genomas 249f, 250f
y RNAi 571, 572
Rayos X
cáncer 1106
células hematopoyéticas 1456f
Rb **1103**, 1104f
gen 1234, **1235**, 1236f, 1241
gen y terapia contra el cáncer 1258
proteína 1235
Reacción(es) acoplada 76f, 79
acrosómica 1293, 1297, **1298**, 1299f
cortical 1299, 1300f
de trasplante 1576, 1577
en cadena de la polimerasa *véase* PCR
energéticamente favorable 75
espontánea 67
estado de transición y enzimas 160
limitada por difusión 168
punto de equilibrio 78f
redox 828
secuenciales 78f
secuenciales y energía libre 77
sentido 76, 77
variación de energía libre 75
velocidad de **73**f y sigs.
velocidad máxima 160f
Reactivos, concentración 76, 77
Reaper, proteína 1125
Recambio rotatorio **976**, 977f y sigs.
velocidad y señalización 887f
Receptoras, proteínas 879
Receptor(es) activado y complejo de señalización 898f
activadores de la proliferación de peroxisomas *véase* PPAR
AMPA 691
Bri1 956
Clavata1/Clavata2 956, 957f
de acetilcolina **684**, 685f, 696f
de citoquinas 937, 938f
de clasificación 701
de Eph **922**, 923f
de Eph, señalización bidireccional 923
de glucocorticoides 463f
de hidrolasas ácidas 755
de importación nuclear **707**, 708f
de IP_3 910
de LDL 791f
de manosa-6-fosfato 755, 783, 784
de matriz 1169
de migración local 1550
de muerte 1120
de NMDA 691
de quimiotaxis 943, 944f, 945f
de reconocimiento de patrón 1528, 1541
de rianodina 912
de SRP 728
de superficie celular 881 y sigs.
de tirosinas quinasa *véase* RTK
de transferrina 794f
de transporte 754
de transporte nuclear 358
de transporte nuclear, familia génica 708
del factor de necrosis tumoral *véase* TNF
del HIV 1506f
del linfocito B *véase* BCR
disminución 903f
endocitados, destino 793f
estructura 135
Fc 788, **1555**
homólogos a Toll 1528
hormonal nuclear 1400t
inactivación 903f
intracelulares 881
ionotrópicos 892, 893f
KDEL 770f, 771
muscarínicos de acetilcolina 916, 917
nicotínicos de acetilcolina 916, 917
quinasa con secuencias repetidas ricas en leucina *véase* LRR
secuestro de 903f
señuelo 1120
serina/treonina quinasa 939
serina/treonina quinasa vegetales 956, 957
TGFβ 940
transmembrana endocitados 793f
uPA 1194f
víricos 1505, 1506f
Receptores acoplados
a canales iónicos **892**, 893f
a enzimas 684, **882**, 893f, 922 y sigs.
a proteínas G *véase* GPCR
Receptores asociados
a histidina quinasa 942
a tirosinas quinasa 936
Receptores nucleares **889**, 890f, 891f
activos 891f
de hormonas, respuestas 892f
huérfanos 890
inactivos 891f
superfamilia 891f
y secuencias específicas de DNA 890, 891f
Receptores olfativos 917f
potenciadores 452
Rechazo inmunológico y células madre 1482
inmunológico y ES 507
Recodificación traduccional 477f
Recombinación, complejo 1275
conservativa específica de lugar **316** y sigs., 323, 324f
de cambio de clase 1568, 1569f
del DNA 263 y sigs.
general *véase* Recombinación homóloga
genética 554f
meiótica 312 y sigs.
mutación vírica 1521, 1522f
somática, inducción 1348f
transposicional *véase* Transposición
V(D)J 319, **1564** y sigs.
Recombinación homóloga **302**f y sigs., 313f
control celular 310, 311
enfermedades 295t
Recombinasa Cre 326f, 568
FLP 1348
Reconocimiento kin 771
Reconstrucción de una sola partícula **611**f, 612f, 613f
Recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueado *véase* FRAP
transporte de 769, 770f y sigs.
Red de señalización intracelular 901, 902
del *cis* Golgi *véase* CGN
del *trans* Golgi *véase* TGN
Redox, potencial 828, 829f, 830f
potencial y cadena de transporte de electrones 835f
Reducción 71f, 72
reacciones y ribozimas 405t
Redundancia genética 39
Regeneración intercalar 1354f
tras amputación 1480f
Región(es) 3' no traducida *véase* UTR
de control del gen **440**, 441
de sostén de anticuerpos 1559
hipervariables de anticuerpos 1559f
humanas acelerantes *véase* HAR
señal de proteínas **701**, 702
Registro de zona técnica 681f
de zona y canales de sodio 680, 681f, 682
Regla de Hebbs 1396
del extremo N 395, 396
Regresión de la glándula mamaria 1426-1428
Regulación combinatoria, código 187
de la destrucción proteínica 395, 396
e hidrólisis de GTP 178, 179
negativa 170
por disminución 794
por disminución del receptor 903f
positiva 170
postranscripcional 477 y sigs.
transcripcional y control del ciclo celular 1065
Regulación génica 7, 9f
bucles de DNA 436-438
circuitos 458
motivos del DNA 416 y sigs.
proteínas de 416 y sigs.
relojes circadianos 460 y sigs.
Regulador(es) autoinmune 1588
de señalización de proteínas G *véase* RGS
del crecimiento vegetal 1403, 1406f
Rejilla para TEM 605f
Relajación astral, modelo de 1096f
Reloj(es) circadianos y retroalimentación génica 460 y sigs.
de segmentación 1319
genético 461f
moleculares 248, 249
Renacuajo y apoptosis 1117f
Renal, cáncer 414f
Renaturalización 306, 536
Rep1 927t
Reparación del DNA 263, **295** y sigs.
del DNA y enfermedades humanas 296
del DNA y transcripción 299, 300
enfermedades hereditarias 295t
por eliminación de bases **297**, 298, 299f
tras separación de un transposón 319
Repetición FG 707
modular 1341
Replicación celular, senescencia 1217
centriolar 1078f
del DNA **4**f, 196, 263 y sigs.
del DNA, problema de enrollamiento 278f
errores y enfermedades 295t
fase S 285f
fidelidad 268 y sigs.
horquilla en movimiento 276f
iniciación **281** y sigs., 1076
maquinaria de 276f
orígenes 281 y sigs.
semiconservativa 268f
terminación 281 y sigs.
unidades de 284
Represión génica, herencia del patrón 467, 468f
Represor(es) del triptófano 420f, **433**, **434**, 454
transcripcionales 434
Represor *Lac* 416
secuencia reconocida 418t
unión a dos operadores 437f
Represor lambda 416
secuencia reconocida 418t
Reproducción asexual 1269
por clonación 1287
sexual 554f, **1269-1304**
sexual y meiosis 1090-1092
tasa 1213
Rescate **977**, 1080, 1081f
Residuos desestabilizantes de proteínas 395
Resinas cromatográficas 513
Resistencia a antibióticos 1523f
Resolución 582f
de cromátidas hermanas 1075
del microscopio óptico 580, 581f, 582f y sigs.
límite de 604f
Resonancia de espín electrónico *véase* ESR
de plasmón de superficie *véase* SPR
electrónica paramagnética *véase* EPR
magnética nuclear *véase* NMR
Respiración celular **70**
complejos enzimáticos 819 y sigs.
fotosíntesis 70f
Respiratoria(s), cadena 817 y sigs.
vías 1434-1436
Respiratorio, control **837**, 838
epitelio 1435f
Respuesta celular 1540
celular inducida de hormonas 907t
del todo o nada 900f
del todo o nada y retroalimentación positiva 1315, 1316
gradual de señalización 899f
humoral 1540
inflamatoria 1454f, 1534f
inmunitaria *véase* Inmunidad
semejante a interruptor 899f
transcripcional a señal 890
Restricción, mapa de 540
MHC 1582f
Ret, cadherina 1137f

Retículo endoplasmático *véase* ER
 mitocondrial 858f
 sarcoplasmático *véase* SR
Reticulocitos 1459f
Retina, células fotorreceptoras 1432f, 1433f
 células ganglionares 1391
 estructura 1432f
Retinal 640
 estructura 166f
 y bacteriorrodopsina 640, 641f
 y rodopsina 166
Retinianos, axones y tectum 1392, 1393f
Retinoblastoma 1234
 hereditario 1235f
 humano 1104
 proteína del *véase* Rb
Retinoides 881, 889f
 acción 890
Retroalimentación negativa **170**, 901f, 902f
 en señalización NFκB 954
 expresión génica 1373f
 múltiple 170f
Retroalimentación positiva **901**f, 902f
 consecuencias 1315, 1316
 desarrollo 1314, 1315f
 herencia 472f
Retrógrado, transporte 769, 770f y sigs.
Retrómero **755**, 756f
Retrotranslocación de proteínas 392
Retrotransposones no retrovirales humanos 321, 322
 no retrovirales, mecanismo 322f
 retrovirales 317, 318t, **320**
 retrovirales, semejanza con los virus 320
Retrovirus **329**, 1228t, 1232
 cambio de pauta de lectura 383
 ciclo vital 321f
 edición tras la infección 484
 oncogenes 1232
Rev, gen del HIV 485f
Reversible acoplado, mecanismo 826
RFP, colorante 587f
RGD, secuencia 1193
RGS 896
Rheb 927t
Rho, familia 916, 927t, **1042**, 1359f
 GTPasa 931
 organización de actina 1042f, 1043f
Rho-GEF activadores 788
 proteína 1095f
Rho-GTP 1043
RhoA y anillo contráctil 1094, 1095f
RhoC 1249
Rianodina, receptores de 912
Riboflavina y coenzimas 167t
Ribointerruptor 404
Ribonucleoproteínas, síntesis 364f
Ribonucleótidos 332
Ribosa 4, 332f
 estructura 116f
Ribosoma(s) 64f
 bacterianos, lugar de unión de antibióticos 384f
 bacterianos, subunidad mayor 378f, 379f
 como agregado macromolecular 151
 como ribozima 378, 379
 con mRNA incompleto, rescate 387f
 estructura y cristalografía de rayos X 529
 eucariota 374f
 función 8f
 libres 27f
 libres y ER **728**, 729f
 procariota 374f
 producción 361 y sigs.
 proteína translocadora 731f
 síntesis en ausencia de 407
 síntesis nucleolar 364f
 sitios de entrada internos *véase* IRES
 sitios de unión al RNA 375f
 situación en la célula 374f
 subunidades 374f, 375f
 túnel hidrófilo 381
 unidos a membrana **728**, 729f
 y NPC 705
Ribosoma-SRP, complejo 728, 729f
Ribosómicos, interruptores 478f, 479
Ribozima(s) 378, **379**
 aminoacilación 407
 autorreplicantes 407f
 corte de RNA 404f
 formación 406f
 reacciones catalizadas 405t
 selección in vitro 405f
 sintética 405f, 406f
Ribulosa 1,5-bisfosfato 844f, 845f
Ribulosa bisfosfato carboxilasa 844 y sigs.
Rickettsia prowazekii, genoma secuenciado 18t
 richettsii y citoesqueleto del huésped 1514-1516
Rifamicina, efectos 385t
Rig1, receptor 1389
Riñón, cáncer de, incidencia 1224f
 respuesta celular inducida 907t
 simportadores 657
RISC 493, 494f, 495
RITS, complejo 496
RK 919
RNA 4, **62**, 332
 almacenamiento de información 402f
 aminoacilación y ribozimas 405t
 antisentido 489f
 autocatalítico 355, 405t
 autorreplicantes 404 y sigs.
 cadenas cebadoras 272
 Cajal pequeños 364
 catálisis de la propia síntesis 402f
 cebador de **272**, 283f
 como producto final en levaduras 335, 336
 complejo silenciador mediado por *véase* RISC
 complementariedad 5
 conformación 5f
 control de la localización 415f
 control del procesamiento 415f
 control del transporte 415f
 corte con ribozimas 404f, 405t
 de cadena sencilla 334f
 de doble cadena *véase* dsRNA
 de HAR1F 253, 254f
 de interferencia *véase* iRNA
 de transferencia *véase* tRNA
 del espliceosoma 405t
 edición **482**, 483, 484f
 encapsulación 408f
 estabilización 477f
 estructura 332f
 estructura secundaria, elementos 403f
 exportación nuclear 710
 formas de plegamiento 333f
 guía 362f, 483
 hibridación con DNA mediante sondas 537
 hibridación in situ 586f
 interacciones terciarias 403f
 lectura 6
 localización por hibridación in situ 572f
 longitud 333
 lugar de transcripción 365
 maduración 345
 maduración alternativa por corte y empalme **479**f, 480f
 maduración y ribozimas 405t
 manipulación 501 y sigs.
 mensajero *véase* mRNA
 mitocondrial, origen 869f
 montmorillonita 408f
 mundo 400 y sigs.
 mutuamente beneficiosos y mundo RNA 407f
 no codificantes 336t-361
 no codificantes y regulación de genes 493, 494
 nucleares pequeños *véase* snRNA
 nucleolares pequeños *véase* snoRNA
 pequeño de interferencia *véase* siRNA
 plegamiento 5f
 plegamiento y ribozimas 406f
 polimerización y ribozimas 405f
 procesamiento 345 y sigs.
 regulación del transporte 477f, 485, 486f
 ribosómico *véase* rRNA
 seleccionados in vitro 405t
 síntesis y ATP 87f
 sitios de unión en el ribosoma 375f
 splicing *véase* Maduración del RNA
 termosensor 489f
 tipos celulares 335, 336
 tipos de plegamientos 403f, 404
RNA polimerasa **334**, 346
 bacteriana, ciclo 337f
 control génico 438, 439
 estructura 334f, 340f
 evolución 335f
 holoenzima 337
 orientación 339f
 poli ensamblaje con el promotor 442
 señales de principio y fin 336 y sigs.
 subunidad sigma 439
 subunidades intercambiables 439f
 superenrollamiento 409f
RNA polimerasa I 339, 340t
RNA polimerasa II 339, 340t, 440, 441f
 factores de transcripción 439 y sigs.
 función 347f
 mecanismo 341f
RNA polimerasa III 339, 340t
RNAi e investigación del cáncer 1240
RNAsa H 272, 321f, 543f
Rodamina 586, 587f
 B 587f
Rodopsina 904, 905, **918**f
 bacteriana 660
 de fotorreceptores 640
 inserción en el ER 735f
 quinasa *véase* RK
 retinal 166
Rombómeros 1346
Rotavirus, forma 1496f
Rotura en doble cadena, reparación 302f, 303
 proteolítica 152f
Roundabout, receptor 1389f
RRE 485, 486f
rRNA 6, 336t, **360**
 23S, bolsillo 379, 405t
 empaquetamiento 378
 estructura 378f
 gen del 861f
 pareja codón-anticodón 377f, 378f
 precursores, procesamiento 361f, 362f
RTK **922** y sigs., 936f
 activación 924f
 activación de Ras 927 y sigs.
 autofosforilación 922-924
 desarrollo animal 1316t
 mutado, inhibición dominante 924f
 subfamilias 923f
RT-PCR cuantitativa **573**
 cuantitativa y RNA 573f
Ruido biológico 575, 576
 de fondo 611
Runx2, gen 1471
Ruta(s) de secreción biosintética-secretora 749
 endocítica 749
 endocítica, clasificación de proteínas 794f
 metabólica, mutaciones 557
 Sec 720f
 secretora constitutiva 800f y sigs.
 secretora regulada 800f y sigs.

S

S, fase 1054, 1055f, **1067-1071**, 1090
 duración 1059
S2, línea celular 506t
S6k 1108, 1109f
Sacarosa 846
Saccharomyces cerevisiae 1494, *véase también* Levaduras
 biblioteca de mutaciones 569
 estructura 33, 34f
 genoma secuenciado 18t
 interacciones proteína-proteína 189f, 190f
 organización de genes 204f
 reguladores génicos 455, 456f
Safranina, tinción 585f
Sal y cáncer 1224f
Salivales, glándulas y acetilcolina 886f
Salmonella, cambio de fase 454, 455f
Salmonella enterica 1491
 diseminación 1518, 1534
 membranas del huésped 1513f
SAM, complejo 714f, **715**, 718f
Sanguíneas, células 1451f
 células, formación **1451-1463**
Sanguíneos, vasos 1445-1450
Sar1, proteínas 759
SARA, proteínas de anclaje 940
Sarcoma de Kaposi 1228t
 de Rous, virus del 1232, 1233f, 1499
 definición 1206
Sarcómero(s) 1026, 1027f y sigs.
 longitud y tensión 1051f
 proteínas accesorias 1028f

Satélite α de DNA 230
scaRNA 336t
SCF, función 1066t
proteolisis 1065f
Schistosoma haematobium y cáncer 1228
Schizosaccharomyces pombe véase Levadura de fisión
Schwann, células 680
SCID 1564
Scr, gen 1343f
Scrapie de las ovejas 398, 1498
Scribbler, complejo 1156, 1157f
Scute, gen 1356, 1359
Sdc2, proteína 477f
SDS 636 y sigs.
estructura 517f, 638f
SDS-PAGE **517**, 518f, 637
Sebácea, glándula 1418f
Sec, complejo 730f, 731, 732f
ruta 720f
Sec61, estructura 730f
Secciones de tejidos 584, 585
seriadas y microscopio electrónico 606 607f
ultrafinas 605, 606f
Secreción biosintética-secretora, ruta 749
constitutiva, ruta 800f y sigs.
de tipo III, sistema 1493, 1494f
lisosomal 786
regulada, ruta 800f y sigs.
regulada y membrana plasmática 805, 806f
vía por defecto 801
γ-Secretasa 947
Secuencia(s) Alu 322, 323f
ancestral, deducción 248f
B1 323f
BRE 342f
de identidad 139f
de replicación autónoma *véase* ARS
del DNA 2
del genoma humano 205f
diana de la recombinasa FLP 1348
DPE 342f
expresadas *véase* Exones
FG 707
GATC 284f
GGGTTA 292
INR 342f
intercaladas *véase* Intrones
intrónicas, eliminación en el RNA 345
KKXX 770
microsatélite hipervariable 547f
muy conservadas 248
reguladoras **440**, 441
RGD 1193
Shine-Dalgarno 380, 381f
TATA *véase* Caja TATA
y parentesco 139, 140
y subunidades de polímeros 63
Secuencia barrera 451
acción 452f
distribución 453f
Secuencia consenso
de eucariotas 342f
de reconocimiento 380
del promotor **338**f, 339
Secuencias conservadas
cambios acelerados 253
determinación 252f, 253
Secuencias señal
de cloroplastos 719, 720f
de peroxisomas *véase* Peroxinas
de proteínas **701**, 702t
del ER 727
funciones 702t
método de definición 703f
mitocondrias 714f
Secuenciación de genomas completos 551, 552
estudio del desarrollo 1325
familias proteicas 139
Secuencial, inducción 1320f
Secuestro de receptor 903f
Sedimentación de equilibrio 511, 512f
por velocidad 511, 512f
Segmentación de animales 1307
de *Drosophila* 1329, 1330f
de *Xenopus* 1365f
divisiones 1058f
genes 1336
reloj 1319
Segmento(s) de *Drosophila*, origen 1330f
genes de polaridad de 1333
inicial 688f, **689**
Segregación celular dependiente de cadherinas 1140, 1141f
mitótica 865
Segundos mensajeros **893**, 894
Segurina **1087**, 1088f
Selección clonal, teoría 1544, 1545f
natural y alelo ventajoso 562
natural y mutación 16
negativa en el timo 1587, 1588f
positiva en el timo 1588f
purificadora 247
reproducción sexual 1271
Selectina(s) **1145-1146**, 1177t, 1550f
adhesión dependiente de 1550f
estructura 1146f
función 1145, 1146f
L-Selectina 1145
P-Selectina 1145, 1146f
Selectividad, filtro **672**, 673f, 674f
iónica de canales 668, 669
Selenocisteína, incorporación a polipéptido 383f
Selladores, cordones 1152, 1153f
SEM **607**, 608f, 609f
Semaforina, proteína repelente 1389f
Semilla(s) **1402**
almacenamiento de proteínas 782
con reservas energéticas 95f
cubierta 1401f
estructura 1401f
hojas de 1401f
Senescencia celular replicativa 293, 505, 1059, **1107**, 1217
Sensibilidad celular a los UV 295t
Sensoriales, epitelios **1429-1434**
Señal(es) celular y meristemo 1409, 1410
de clasificación de proteínas 699
de degradación, activación 396f
de desarrollo, difusión 1318, 1319f
de exportación nuclear 708
de localización nuclear **705**, 706, 707f
de localización nuclear y mitosis 712
de recuperación del ER 770
de retención en el ER 736
de salida del ER 767
de salida del Golgi 767
específicas de degradación *véase* Degrons
externas y expresión génica 413, 415
extracelulares, moléculas 879, 880f, **881**
extracelulares y activación de proteínas Rho 1044, 1045f
hipótesis 727f
integración 897f
intracelulares, proteínas 880f
M6P 785f, 786f
Señalización autocrina 881
cascada de **894**
corriente abajo 897f, 898f
de las Ras-MAP-quinasas, vía 929
dependiente de contacto **881**, 882f
evolución 955
GTP 896f
Hedgehog 952f
inductiva 1313f
intracelular, moléculas 893 y sigs.
intracelular, red 901, 902
intracelular, tipos de complejos 898f
intracelular, vía 895f
mediante GPCR 904 y sigs.
Notch 1361, 1362
Notch, bloqueo 1360f
paracrina **881**, 882f, 883f
por fosfolípidos de inositol 627f, **909** y sigs.
por fosforilación 180f, 896f
por múltiples señales 884, 885f
por proteína que une GTP 180f
proteínas de 880 y sigs.
respuesta celular súbita 899f-901
respuesta del todo o nada 900f
sináptica 882f, 883f
solapamiento de vías 935, 936f
vegetal 955-961
vía Delta 947
vía Notch 947
vida media de la señal 886, 887f
Sepallata, mutante 1414
Sépalos 1401f
Separasa **1087**, 1088f
Septada, unión 1154f
Septinas, anillo de 1097
Seril-tRNA sintetasa 383f
Serina 127f, 129f
de *Candida albicans* 383
fosforilación 222f
proteasa asociada a MBL *véase* MASP
proteasas 137, 138, 1194
Serina/treonina, fosforilación 930f
quinasa 896
Serotonina 684, 686
basófilos 1452
inhibidores de la recaptación 687
pulmón 1435
Sertoli, células de **1285**, 1294f
Sev-RTK y activación de Ras 928f
Sex-lethal véase *Sxl*
Sexo, determinación en mamíferos 1284
determinación y maduración alternativa 481f
transferencia horizontal de genes 22
y cáncer 1229f
Sexual, determinación en invertebrados 1285
SH2 899
SH3 899
She, proteínas 1023f
Shigella flexneri 1491
citoesqueleto del huésped 1514
nucleación de actina 1517f
resistencia a antibióticos 1524
Shine-Dalgarno, secuencia 487, 488f
Shugoshinas 1277
Sic1, proteína inhibidora, función 1066t
y Cdk-M 1101
Sida, virus *véase* HIV
Sidecano-1, cadenas GAG 1184t
Sidekicks, proteínas 1147
Sífilis, genoma de la bacteria 551
Signos de infección 1487, 1488
Silenciado de genes 241f
Silicio, abundancia 47f
Simbiosis y evolución eucariótica 27 y sigs.
Simetría lateral de vertebrados 1376, 1377
Simportador 656f
SINA, familia 322
Sinapsis 688f
aprendizaje 690
cromosómica 1276f
depresiones a largo plazo *véase* LTD
eléctrica y química 683
estructura 1149f
inmunológica **1132**, 1133t, 1573, 1591
lámina basal 1168f
LTP 690-692
memoria 690
moléculas de adhesión en paralelo 1147
neuromuscular 684f
química **682**, 683f y sigs., 882f, 1132, 1133t
química excitadora 684
química inhibidora 684
señalización 882f
velocidad 882, 883
vesículas **808**f, 809f
Sináptica, remodelación y memoria del adulto 1396
Sinaptobrevina 763f
Sinaptonémico, complejo 1275f, 1276
Sincitio **1099**, 1100f
de espermatozoides 1296f
desarrollo de *Drosophila* 1330, 1331
Sindecanos 1177t, 1184
Síndrome(s) de Alport 1167
de Bloom 295t
de Down 1279
de Peutz-Jeghers 1156
de Werner 295t
de Zellweger 723
hereditarios 295t
SINE del genoma humano 207f
Sinergia transcripcional 444f
Sintasa, función 159t
Sintaxina 763f
Sintenia, bloques de 250
conservada 208
Síntesis en sentido 5' a 3' 267f
proteica, evolución 406, 407
Síntomas de infección 1487, 1488
Sinusoides sanguíneos 1455f
siRNA 336t, **495** y sigs.
síntesis de heterocromatina 494, 495f
Sistema(s) conductor de Wolffian 1285
de control del ciclo celular 1060, 1061f y sigs.

de secreción de tipo III 1493, 1494f
del complemento 1528, 1542
del híbrido doble 523, 524f
digestivo 1436 y sigs.
libres de células **516**, 1058f
Sistema nervioso
central *véase* SNC
central, cadherinas del 1136f, 1138t
central y división asimétrica 1359, 1360f, 1361
construcción y expresión de cadherinas 1141f
desarrollo **1383-1397**
origen en el embrión de pollo 1384f
periférico 1384
Sitio A de unión al tRNA 378, 381f
E de unión al tRNA 378
lox 568
P de unión al tRNA 378, 379
SIV, diversificación 1521f
Skp,1 funciones 189
Slit, proteína 1389
proteína repelente 1389f
Slug, gen regulador de cadherinas 1141
Smac y apoptosis 1125
Smad, familia 940
inhibidoras 941
y cáncer 1252t
SMC proteínas 1070f
subunidades 1075f
Smc2, subunidad 1075f
Smc4, subunidad 1075f
SMN, proteína 364, 365
Smoothened, proteína transmembrana 950, 951
y desarrollo animal 1316t
Smurf 941
Snap25 763f
SNARE, fusión de membrana 763f
fusión homotípica 769
proteínas 761f, 762f y sigs.
separación 764f
vesículas sinápticas 810f
trans-SNARE, complejo 763f
SNC 1384
producción de neuronas 1478
snoRNA 336t, **361**, 362f
SNP **259**, 560
del hombre 561
genética humana 560
seguimiento de la herencia 562f
técnicas de hibridación 560
snRNA 336t, **349**
exportación nuclear 710
snRNP, maduración del RNA 350f, 351
reciclaje 365f
U12 353, 354f
Sobreenrollamiento de filamentos intermedios 983, 984f, 985
SOD 868
mitocondrial 868
Sodio, abundancia 47f
bomba de *véase* Bomba de Na^+/K^+
canales 676 y sigs.
canales, ley del todo o nada 680, 681f, 682
canales y unión neuromuscular 697f
extracelular 652t
gradiente y transporte activo 657
intracelular 652t
orbitales electrónicos 48f
Sog, gradiente morfogénico secundario 1336
proteína 1335f
transcrito 1335f
y desarrollo animal 1316t
Sólo BH3, proteínas 1122, **1123**, 1124f
BH3 y bloqueo de la apoptosis 1127f
Solución molar 47f
Soluto, variación de energía libre 670f
y uniones estrechas 1152f
Somatostatina 908
Sombreado metálico 608-610f
Somitas, aparición 1319
formación 1371, 1372f
Sonda(s) 536 y sigs.
de DNA 535
fluorescentes, longitudes de onda 587f
Sonic hedgehog como morfógeno 1317f
hedgehog, gen 950
Son-of-evenless, gen 928
Southern, transferencia 538, **539** y sigs.
Sox9, gen 1285, 1471
Sp1, secuencia reconocida 418t
SP2, línea celular 506t
Spc29p, localización 607f
Spc72p, localización 607f
Spc110p, localización 607f
Spermann, organizador de 1368
Splicing *véase* Corte y empalme
Spo11, proteína 1280
SPR, método 524, 525f
SR 726, 1028, 1029f
y calcio 660
Src, activación 178f
familia 936
familia, estructura de dominios 178f
mecanismo 179f
regulación 177, 178
Src2, dominios de unión *véase* SH3
Src3, dominio de homología *véase* SH2
SRP del ER **727**, 728f, 729f, 730
del ER, estructura 728
Sry, gen 1284-1286f
SSB, proteína 273 y sigs, **306**
Staphylococcus, 1490f, 1502
epidermidis, respuesta inmunitaria 1488f
Stardust, proteína 1156
STAT, proteínas reguladoras de la expresión 937
Steel, factor 1375
Streptococcus 1490f, 1502
Streptomyces coelicolor, genoma secuenciado 18t
producción de antibióticos 1524
Subnucleares, estruturas 362f
Suero 1102
Suinholida 988t
Sulfato 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato *véase* PAPS
Sulfato, reducción 101
Sulfhidrilo, grupo 55, 107f
SUMO, modificaciones covalentes 187f
Superenrollamiento del DNA **344**
del DNA y transcripción 343, 344f, 345
Superfamilia de receptores nucleares **890**, 891f
Ras 926 y sigs.
Superhélice(s) 135
negativas 344f, 345
positivas 344f, 345
Superóxido dismutasa *véase* SOD
Supervivencia celular, regulación 1462, 1463
factor 1102, **1126**, 1127f
factores extracelulares 1126, 1127f
Supresión clonal 1548
multicopia 752f
Surco de segmentación 1093
mayor, código de reconocimiento 417f
menor, código de reconocimiento 417f
Surfactante 1434, 1435f
Suspensor *véase* Haustorio
Sustitución génica 566f, 567f
Sustrato(s) 66, 72, 1**59**
alineamiento por enzimas 166f
concentración baja 160
unión 159, 160
velocidad de desplazamiento 74
Sustrato-1 del receptor de insulina *véase* IRS1
Suv39, histona 446f
SV40 149f
Swallow, proteína 1023
SWI/NF, cromatina 444f
Sxl, gen 481f, 482f
Synechocystis, genoma secuenciado 18t

T

t-SNARE 761f, **763**f, 771
Tabaco, células en cultivo 504f
y cáncer 1224f, 1266
Tabla periódica 49f
TAF, subunidad de TFIID 341t
Talasemia y origen de replicación 290f
β 355f
Talina 1135t, 1170f
Tallo, epidermis 1405f
estructura 1404f
Tam3 de dragón 318t
Tándem de dedos de zinc 421, 423f
Tap-tagging 515, 524
Tar, estructura RNA 478
Tat, gen del HIV 485f
TATA, proteína de unión a la *véase* TBP
Tau 995f, 1001f, 1002f
Taxol 987, 988f
estructura 988f
Tb1, gen 1411f
tBid, proteína truncada 1124, 1573
TBP 340
estructura 342f
Tbx4, gen y regulación embrionaria 1313f
Tbx5, gen y regulación embrionaria 1313f
Tcf4, gen 1439
TCR **1570**-1572f
estructura 1571f
selección en el timo 1586, 1587f
y CD3 1590f, 1591f
Técnica, avances 501 y sigs.
de la PCR 544, 545f
del registro de zona 681f
de transgénicos, hitos 533t
del DNA recombinante 510, **532** y sigs.
Tectum, mapa neuronal 1391f
y axones retinianos 1392, 1393f
Tejido(s) animales, clasificación 1131
de origen endodérmico 1434 y sigs.
epidérmico vegetal 1404f, 1405f
epiteliales **1131**, 1132f
especializados **1417-1482**
fundamental vegetal 1404f
reagrupación celular 1139 y sigs.
renovación **1417-1482**
secciones 584, 585
vascular vegetal 1404f, 1405f
Tejido adiposo
marrón 838
respuesta celular inducida 907t
y hormona del crecimiento 1475
Tejido conjuntivo **1131**, 1132f
adiposo 1418f
células 1468
denso 1418f
Telofase 1055, **1071** y sigs., 1073f
núcleos hijos 1090
Telomerasa 292, 1107, 1217
cultivos celulares 505
envejecimiento 294
estructura 292f
función 292
Telómero(s) 209, **210**f, 1107, 1274
definición 292
regulación de la longitud 293, 294f
reordenación 1274f
replicación 293f
y cultivo celular 505
TEM 604f y sigs.
Temperatura, sensibilidad de mutaciones 557f
y reacciones químicas 66
Temporización del desarrollo 1326, 1327
Tendones 1131
Teoría celular 579
neuronal 504
Teosinte-branched-1 *véase Tb1*
Terminación 281 y sigs.
Terminador 337
Terminales, genes de polaridad de *Drosophila* 1332f, 1334f
Termodinámica, primera ley 68
segunda ley 66, 67, 118f
Testículo(s), formación y gen *Sry* 1284
humano, entrecruzamiento de homólogos 1280f
y células germinales 1282
Testosterona 115f
acción 1285
estructura 889f
TetR, gen 318f
Tetraciclina, efectos 385t
gen de inactivación 318f
lugar de unión 384f
Tetrámero(s) de filamentos intermedios 984f
de histonas 212, 213, 214f
H3-H4 290, 291f
Tetrasácarido de unión 1181f
Tetraspaninas 1298, 1299
Tetróxido de osmio 605f
TFII 340, 341t
TFIIB 341tf
TFIID 340, 341tf, 444f, 446f
TFIIF 341t
TFIIH 341t, 346
TGFβ 1183, 1469, 1575
betaglucano 1184
cáncer 1241, 1243
desarrollo animal 1316t
función 1103
propiedades 1599t
proteínas señalizadoras 939-941

TGFβ², receptor II y cáncer 1252t
TGN 771f, **772** y sigs., 783-785f, 800-809
células polarizadas 806
clasificación de proteínas 801f
exocitosis 800-809
proteínas de membrana 807f
transporte a lisosomas 779 y sigs.
THE1 humano 318t
Thermotoba maritima, genoma secuenciado 18t
Tiamina y coenzima 167t
Tierra, abundancia de elementos químicos 47f
Tilacoidal(es), espacio 713f
membrana 713f
vesículas, evolución 698, 699f
Tilacoides 698, **719**, 720f, 843f
TIM, complejo 714f, **715**, 718, 719, 816
Tim, gen 462f
Timidina ³H 602, 603f
síntesis de DNA 267
Timina 2 y sigs., 61, 197, 198f
Timo 1541f, 1543f
estructura 1586f
selección de linfocitos 1586, 1587
Timocito 1543f
Timosina 994
TIMP 1194
Tinción de células 585
negativa **610**, 611f
para microscopio electrónico 606
4-Tiouridina 370f
TIP 995
Tipos celulares, origen 453 y sigs.
Tir, receptor proteico 1504
TIRF 599, 600f
Tiroides y respuesta celular inducida 907t
Tirosina(s) 127f, 129f
aminotransferasa 415
fosfatasa **938**, 939
fosforiladas *véase* Fototirosinas
Tirosina quinasa 896f
citoplasmáticas **936**
dominio 923f
estructura 941, 942f
receptores *véase* RTK
vías de señalización y cáncer 1241
Tiroxina, estructura 889f
Titina 601f, 1028f
comportamiento en diente de sierra 191f
Tjp, proteínas 1154
TLR 1530, 1531, 1542
tmRNA 387f
TMV ensamblaje 149
estructura 149f, 150f
Tn10 de *Escherichia* 318tf
Tn3 de *Escherichia* 318t, 318f
TNA y almacenamiento de información 402f
TNF familia 1120
TNFα 953f, 1593, 1599f
TNF11 1474
Todo o nada, respuesta 900f
Tolerancia central 1548f
periférica 1548f
Tolerancia inmunológica **1547-1549**
adquirida 1547f
natural *véase* Autotolerancia
Toll, distribución del receptor 1334f
proteínas homólogas a 1530, 1531
receptores 953
Toll-dependiente, vía 1335
TOM, complejo **714**f, 715-719
mitocondrias 816
Tomate transgénico 568
Tomografía al microscopio electrónico *véase* EM, tomografía
Tomograma 612, 613f
Topoisomerasa **278**f y sigs.
Topoisomerasa I 278
mecanismo 279f
Topoisomerasa II 278, 279
mecanismo 280f
paso a través de la hélice de DNA 281f
TOR quinasa 1108
Torso, receptor 1332f, 1334f
Tos ferina 1504
ferina, toxina 907
y diseminación del huésped 1518
Toxina colérica 907, 1492f
del ántrax 1493f
pertussis 907, 1504
Toxinas bacterianas
glucolípidos 629
membrana celular 667
proteínas G 907
Toxoplasma gondii 1489f
ciclo vital 1510f
membranas del huésped 1513
Toy de *Drosophila*, gen 466f
TPA y cáncer 1226
Trabajo y cáncer 1224f
Tracción celular 1040, 1041
citoesqueleto 1036
Traducción 4f, 85f, 331, **366** y sigs.
ciclo completo 377f
dependiente de IRES 491f
factor general 490
factores de elongación 377, 378
familias genéticas 23
inicio y codón AUG 488, 489
lugar de inicio 379 y sigs.
mecanismo universal 6
mecanismos de control 489f
precisión 377
precisión y energía libre 385
recodificación 383, 477f
Traduccional, control **415**f
Tráfico vesicular 749-812
Tranquilizantes 686
Transcelular, transporte 1152
Transcitosis 793f, **797**f, 798, 1556
Transcripción 4, 5, **332** y sigs., 335f, 361f
acoplada a la reparación 299, 300
atenuación 477f
aumento de la velocidad 435
bucles de retroalimentación 457, 458f
circuitos 459f
control del ciclo celular 1065
elongación 343, **345** y sigs.
estructura de RNA polimerasa 334f
factores de 416 y sigs.
factores y ensamblaje con el promotor 442
génica y cAMP 900f
lectura de histonas 444f
regulación negativa 436f
regulación positiva 436f
sentido 339f
señal de final 338, 339
señal de inicio 338, 339
sinergia 444f
unidad de 336
Transcriptasa inversa 292, 318t, **320**, 384f
estructura 321f
Transcritos 333
cambio del punto de rotura 481, 482f, 483f
Transducción de señal 891
Transducina 919t
Transesterificación 318
Transfectadas, células 541
Transferencia de energía fluorescente por resonancia *véase* FRET
de fosfato 80f, 81f
génica entre organismos 21, 22
génica horizontal 1521
Northern 538 y sigs.
nuclear de célula somática 1482
señal de inicio **733**, 734f y sigs.
Southern 538 y sigs.
Western *véase* Análisis inmunológico
Transferrina 492, 493f
receptor 794f
Transformación celular 1232
celular y cáncer 1233
Transgén 566
técnica 566, 567
Transgénicos, hitos de la tecnología 533t
organismos **566** y sigs.
Transición a media blástula 1365
alostérica cooperativa 172, 173f
epitelio-mesénquima *véase* EMT
estado 160
Translocación 555f
a espacio intermembrana mitocondrial 718f
de proteínas, método de estudio 703f
de proteínas mitocondriales 713 y sigs.
señal de paro **733** y sigs.
y cáncer 1231
Translocador(es) de membrana externa *véase* TOM, complejo
de membrana interna *véase* TIM, complejo
lipídicos 744f
proteicos 714f, 715
proteicos transmembrana 700
Transmaduración 354f
Transmisión neuromuscular 687, 688
Transmisor, canal regulado por 669, 682, 683, 686, 687
Transportador(es) **653**f y sigs., *véase también* Bomba
ABC 183f, 659f, **665**f y sigs.
acoplados 655, 656f y sigs.
activados 78, 79
activados, grupos asociados 84t
cambio conformacional 655f
de auxina 958-960
de electrones 829, 831, 832f
de glucosa 657f
de membrana, proteínas 652, 653
lugar de unión para soluto 655
Transporte axonal retrógrado 1048
de electrones y ATP 100
de recuperación 769, 770f y sigs.
electrónico 815f
familias genéticas 23
nuclear, regulación 709, 710, 711f
paracelular 1152
pasivo **653**, 654f
por el Golgi 777, 778
regulación desde el núcleo **485**, 486f
regulado **700**, 701f
transcelular **659**f, 1151f
transmembrana **651-694**, 700 701f
vesículas de 749 y sigs.
Transporte activo **654**f, 664f
del NPC 706f
primario 657
secundario 656, 657
Transporte celular
equilibrio 749, 751f
estudio con GFP 735
Transporte de membrana
energía usada 182 183
proteínas 9, 10f
Transporte vesicular 701f
mecanismos de membrana 750 y sigs.
modelo **777**, 778f
Transposasa 317, 318t
gen 318f
intermediario 329f
Transposición **316** y sigs.
conocimiento del momento por secuenciación del genoma 323
de cortar y pegar 317-319f
replicativa 317, 319
Transposoma 319f
Transposón(es) 207f, **317** y sigs.
bacterianos 318f
clases 318t
de DNA **317**, 318t y sigs.
mutagénesis 556
no retrovirales 317, 318t, **321**, 322
Traslocación y Sec61 730
Trasplantes de órganos y ES 507
rechazo 1576
Treadmilling 976 y sigs.
Treonina 101f, 127f, 129f
retroalimentación negativa 170f
Triacilglicerol 58, 114f
Tricelulina y uniones estrechas 1152
Tricoma 1197f
estructura 1405f
Tridimensional, estructura y microscopio electrónico 606, 607f
Trimetil lisina 222f
Triosa 112f
Triosafosfato isomerasa y velocidad de reacción 161f
Triplete(s) de nucleótidos *véase* Codón
sin sentido y destrucción de mRNA 386f
Tripsina 137, 502
Triptófano 101f, 127f, 129f
activación de genes 434f
fluorescencia 524
genes de síntesis 433f
represor del 420f
represor en *E. coli* 433, **434**
y proteína represora 434f
Trisquelion de clatrina 754, 755f
Trithorax, genes del grupo 1344f
Tritón X-100 636, 638f
X-100 estructura 638f

TrkA 926, 1390
tRNA **6**, 7f, 336t, **368** y sigs.
 acoplamiento con aminoácidos 370, 371
 como adaptador de traducción 372f
 de la fenilalanina 368f
 endonucleasa de maduración 370f
 estructura 368f
 exportación nuclear 710
 gen 864f
 iniciador 380
 modificación covalente 369
 nucleótidos poco comunes 370f
 plegamiento 368f
 reconocimiento 373f
Trofectodermo 1379
Trombina 159
 respuesta 910t
Tropomiosina 464, 1029
α-Tropomiosina, gen 349f, 409f
Tropomodulina 1003, 1028f
Troponina 464, 1029
 contracción muscular, control 1030f
TRP, familia 1388
TRPC, canales 1388
Trypanosoma
 edición del RNA 484
 variación antigénica 1520f
Trypanosoma brucei 1502
 respuesta inmunitaria 1519, 1520
Trypanosoma cruzi
 entrada en el huésped 1510, 1511f
 membranas del huésped 1512
TSH, respuesta celular inducida 907t
Tuberculosis 1487, 1508
 genoma de la bacteria 551
Tubo(s) epitelial, formación 1143f
 neural 1366f, 1367f, **1371**, 1393f
 neural, formación 1370, 1371f, 1385f
 polínico 1401f
 seminíferos 1293
Tubulina **973** y sigs.
 α 973, 974f
 α/β, dímeros 995f
 β 973, 974f
 β de nematodos 982
 de cerebro de vaca 502
 e hidrólisis de nucleótidos 976
 eucariótica, evolución 982, 983
 fluoresceína enjaulada 595f
 γ, complejo de 1003
 γ y microtúbulos 992
 homólogo bacteriano 989f
 inestabilidad dinámica 977, 978
 subunidades 970, 971
Túbulo(s) seminífero y espermatogénesis 1294f
 T 1028, 1029f
Túbulo-vesiculares, agregados 768, 769f, 770
Tumor(es), angiogénesis 1220, 1221
 benigno 1207f
 benigno y merlina 1009
 benigno, definición 1206
 cambios epigenéticos 1213, 1214f
 de mama, diámetro 1208f
 evolución clonal 1212f
 humano, crecimiento 1208f
 inestabilidad y terapia 1259f
 maligno 1207f
 maligno, definición 1206
 microambiente 1221, 1222
 mutación y selección 1212, 1213
 nutrientes como limitantes 1213
 oxígeno como limitante 1213
 primario 1207, 1208
 terapias simultáneas 1263f
 vascularización 1220, 1221, 1262
Tumoral, progresión 1210
 progresión a nivel celular 1255f
Túnel(es) enzimáticos 167, 168f
 hidrófilo del ribosoma 381
TUNEL, técnica 1117, 1118f
Túnica adventicia 1190f
γ-TuRC **992**f, 995f, 1003
Turgencia, presión 782
 resistencia de paredes vegetales 1197
Twist, gen regulador de cadherinas 1141
 transcrito 1335f
 y origen del mesodermo 1335t
Tx, proteína 1355
Ty1, de levadura 318t

U

Ubiquinona 831, 832f
Ubiquitina, ciclo celular 1065f
 destrucción proteínica 392f, 393, 394f
 E2 184, 189f
 marcaje de proteínas 395f
 modificaciones covalentes 187f
 motivos de interacción *véase* UIM
 regulación de proteínas 186t
Ubiquitina ligasa 393, 394, 394f
 activación 396f
 función 1066t
 SCF **184**, 189f
 SCF, acción 185f
 SCF, estructura 185f
Ubiquitina-proteosoma, sistema 394
Ubiquitinación 795, 796f, 903f
 de histonas 223f
Ubisemiquinona 832f
Ubx, gen 1343f
UDP-GlcNAc 786f
UIM 925
Úlcera gástrica 1485
 gástrica, genoma de la bacteria 551
Ultracentrifugación y fraccionamiento celular 511f
Ultracentrifugadora preparativa 510f
Ultramicrótomo 605
Unc, familia de genes 1388
 mutantes 1388
Unicelulares, organismos 1
Unidad de replicación 284
 de transcripción 336
Unión(es) α113f
 β 113f
 adherentes **1133**t 1135t, 1154f
 célula-célula 1133t, 1135t
 célula-matriz 1133t, 1135t
 celular 1131 y sigs.
 complejo de 1154f
 comunicantes *véase* Uniones de tipo gap
 covalentes entre proteínas 148
 de extremos no homólogos **302**f, 303
 de GTP, proteínas de 178, 179
 desmosómica 1154f
 diversificación de 1564
 formadoras de canales **1132**f, 1133t, 1134f
 oclusivas **1132**f, 1133t, 1134f, 1150
 proteica, lugar 153, 154f y sigs.
 septadas 1133t, **1154**f
 transmisoras de señales **1132**f, 1133t
 V(D)J 303f
 V-J de anticuerpos 1563f
Unión neuromuscular **684**f, 685
 acetilcolina 687f
 canales iónicos 687f, 688
 lámina basal 1168
Uniones de anclaje 1**132**f, 1133t
 clasificación 1135t
 matriz-matriz 1134f
Uniones de Holliday **311**f, 312, 313f y sigs.
 migración de cadenas 312f
Uniones de tipo gap 667, 884f, 1133t, 1134f,, **1158-1162**
 funciones 1161
 regulación 1161, 1162f
Uniones estrechas 645, 806, 1133t, 1154f
 y epitelios **1150-1158**
Uniones intercelulares
 de anclaje 1134f
 rotura 502
 señales al interior de la célula 1145
Uniparental, herencia 866
Uniportador 656f
Universo, evolución temporal 400f
uORF 490
uPA 1194f
Uracilo 4, 61, 301f, 332f
 DNA glucosilasa 299f
Uracilo-adenina, estructura 333f
Uranio y microscopio electrónico 606
Urato oxidasa 721
Urea, ciclo 867
Ureasa 1503
Uridina ^{3}H 602
UTR 3' 487, 488f
UV, cáncer 1208, 1209
 mutación 297f
 sensibilidad celular 295t

V

V, segmento antigénico 1563f
v-SNARE 761f, **763**, 771
 en vesículas sinápticas 809f
v-Src, oncogén 1232
Vaccinia y proteínas motoras 1516, 1517
Vacunación 1499f
Vacuola **781**f, 782
Vaina, células 847f
 de mielina 680f
Valencia 47
Valina 101f, 127f, 129f
Valium 686
Valor posicional 1312f, 1313
van der Waals
 fuerzas 51f, 53t, **54**, 110f, 126
 fuerzas en bicapas lipídicas 624, 625
 radio 51, 52f
Vancomicina 1523
Variabilidad genética 263
Variación antigénica 1519-1521
 de energía libre 77t, 78
 de energía libre estándar y ATP 824, 825f, 826
Variante específica de glucoproteína *véase* VSG
Variegación 866f
Vascular, factor de crecimiento endotelial *véase* VEGF
Vascularización tumoral 1220, 1221
Vasculogénesis 1446
Vaso(s), clases y células endoteliales 1447, 1448
 linfáticos 1445-1450, 1541f, 1549f
 musculatura lisa 1450
 xilemático 1404f
Vasos sanguíneos 1445-1450
 tumorales y terapia 1262
 y óxido nítrico 888
Vasopresina, respuesta 907t, 910t
 y oscilaciones de calcio 913f
VCAM 1146
V(D)J, recombinación 1564 y sigs.
Vector(es) de clonación 540
 de expresión **546**, 548f
 de patógenos 1502
 plasmídicos 540, 541f
Vegetal(es), desarrollo **1397-1415**
 diferenciación celular 411, 413f
 fabricación de ATP 95f
 hormonas 1403, 1406f
 y cáncer 1224f
VEGF 922, 923f ,1145, 1183, 1221, **1448-1450**
 y RTK 923t
VegT, mRNA de 1364f, 1367, 1368f
Vejiga, cáncer de, incidencia 1224f
Vellosidades intestinales 1436f
Velocidad de centrifugación 510, 511f, 512f
 de recambio de filamentos 976, 977f, 978f
 de señalización celular 883f, 897
 de transporte 655f
Venas 1446 y sigs.
Veneno de serpiente 684, 685
Ventaja selectiva 1213
 selectiva y reproducción sexual 1271
Vénulas postcapilares 1549f
Verde brillante, tinción 585f
Vernalización 1412
Verrugas 1228t
Vertebrado(s), cuerpo y desplazamientos celulares 1363 y sigs.
 desarrollo de extremidades 1354, 1355
 diferenciación celular 412
 eje dorsoventral 1336f
 estructura neuronal 1049f
 gen *CRF* 252f
 genes de histonas 289
 genes *Hox* y eje anteroposterior 1344-1346
 momentos de evolución divergente 41f
 proteínas hedgehog 951
 recombinación V(D)J 319
 simetría lateral 1376, 1377
 superfamilia de cadherinas 1136, 1137f
 tamaño del genoma 251 y sigs.
 vista 917 y sigs.
Vértebras del ratón 1347f
Vesícula(s) 27f
 acrosómica 1293
 de núcleo denso 801-803
 del Golgi 771f y sigs.
 endocíticas 787 y sigs.
 pinocíticas 787

pinocíticas, formación 789
proteínas de fusión 762 y sigs.
recubiertas 751
selectividad 749
separación de la membrana 757 758f
tilacoidales, evolución 698, 699f
transporte celular 701f
Vesículas de secreción 800 y sigs.
formación 802f
inmaduras 802f
maduras 802f, 803
plaquetarias 1102
recuperación de membranas 805
señal de vaciado 803804
Vesículas de transporte 699, 700f, **749** y sigs.
anclaje a membranas 761f
del ER 766, 767f y sigs.
forma 760
Vesículas secretoras **801**
salida, 801-803
y procesamiento proteico 803f
Vesículas sinápticas **808**f, 809f, 1149f
componentes 808, 809f
formación 808f
Vesiculación viral y ESCRT 797f
Vesicular, tráfico 749-812
tráfico, mecanismos de membrana 750 y sigs.
VHL 1449
Viagra 889
Vía(s) anabólicas 66, 67f
catabólicas 66, 67f
extrínseca de la apoptosis 1119
Hedgehog 1340
intrínseca de la apoptosis 1119, 1121f, 1122f y sigs.
metabólica, esquema 66f
por defecto de secreción 801
respiratorias 1434-1436
Wnt 1340
Wnt/β-catenina 948, 949f
Vías de señalización
del patrón de desarrollo 1316, 1317
por fosfolípidos de inositol 909 y sigs.
y cánceres humanos 1243f
Vibración ultrasónica 510
Vibrio cholerae 1489f, 1491
estructura 14f
genoma 1492f
islotes de patogenicidad 1492f
serotipos 1492f
Vida, árbol 11 y sigs.
autocatálisis 7f
información almacenada 401
esencia 1
estilo de y cáncer 1224f
origen 400 y sigs.
Videomicroscopía 644
Vif, gen del HIV 485f
Villina 1007
Vimetina 985t
Vinblastina 988t
Vincristina 988t
Vinculina 1135t, 1170f
Vírica(s), proteínas y ER 768
replicación, evitar 1535
Virión 1496, 1497
Viruela 1496
genoma del virus 551
Virulencia, factores 1491
genes 1491
Virus 21
40 del mono *véase* SV40
adquisición de envoltura 1515f
bacterianos *véase* Bacteriófagos
cáncer humano 1227, 1228t
cápsides 149f
cholerae 1504, 1505
ciclo vital 1496f
clonación de DNA 540
con envoltura 1497
de Epstein-Barr *véase* EBV
de la gripe, entrada en la célula 1507f
de la gripe y fusión de membrana 765
de la hepatitis 1500
de la hepatitis B, cubierta 611f
de la inmunodeficiencia de simios *véase* SIV
de la inmunodeficiencia humana *véase* HIV
de la leucemia de las células T *véase* HTLV-I
de la leucemia murina 1233f
de la necrosis del tabaco 149f
de la polio 149f
del mosaico del tabaco *véase* TMV
del sarcoma de Rous 1232, 1233f, 1499
del sida *véase* HIV
del tomate achaparrado 149f, 150
e IRES 491
entrada en las células 764, 765f, 1506
ESCRT 797f
esférico, estructura 150f
evolución 1521, 1522
formas 1496f
metabolismo del huésped 1517, 1519
propagación **1496-1498**
secuencia insertada 21
semejanza con retrotransposones retrovirales 320
sin envoltura 1497
tamaño 1497
tipos de genomas 1497f
transferencia 22f
transposición 319, 320
tumorales 1232
tumorales de DNA 1248
vesiculación 797f
Vista del pez cebra y mutación 556 y sigs.
y GPCR 9167 y sigs.
Visual, dominancia y franjas cerebrales 1395f
Vitamina(s) B_{12}, importación celular 183f
B_{12} y coenzima 167t
D, acción 890
D, receptor 891f
D_3, estructura 889f
y coenzimas 167t
Vitelina, cubierta 1288
Vitelo del oocito 1287
VNTR 547f
Voltaje, canal regulado 668f, 669
del potencial de acción 679f
gradiente 654
von Hippel-Lindau, síndrome *véase* VHL
Vpr, gen del HIV 485f
Vpu, gen del HIV 485f
VSG 1520

W

WASp, proteínas 1042
Watson, James 196
Wee1 1063
función 1066t
Western, análisis *véase* Análisis inmunológico
White, gen 221f
Wingless, gen 948
patrón del disco del ala 1352
y desarrollo animal 1316t
Wnt 1324f, 1325
cáncer 1241
desarrollo animal 1316t
expresón ectópica incorrecta 564f
proteínas 946, 948-950
señalización 1441, 1442f
señalización y células madre intestinales 1438, 1439f, 1440
vía 948, 949f y sigs., 1145, 1340, 1426
Wnt/β-catenina, vía 948, 949f y sigs.
Wnt11, mRNA de 1364f, 1367, 1368f
Wnt3, molécula señal 1393
Wolbachia y diseminación del huésped 1518, 1519
y microtúbulos 1517, 1518f
Wolffian, sistema conductor 1285
WRKY, familia de proteínas reguladoras de genes 1400t
Wuschel, genes 1410f

X

Xantina 301f
Xenopus 39f, *véase también* Anfibios
como modelo de estudio 39
desarrollo del oocito 1058f
gastrulación 1367f
óvulo maduro 1057f
ruwenzoriensis 39
Xenopus laevis, asimetría del huevo 1364f
desarrollo 1363f
embriología experimental 1311f
oocito 512
Xenotrasplante 1576
Xeroderma pigmentosum véase XP
XIC **473**, 474
Xilema 1197f, 1405f
células parenquimáticas 1405f
estructura 1405f
Xilemático, vaso 1404f
XIST RNA 473f, 474
XMAP215 995
microtúbulos 1004f
Xnr, proteína 1368f
XP 295t, 296, 1209

Y

YAC 541
construcción 542f
YDR196C, pauta abierta de lectura 189
Yema(s) 1401f
axilares 1411f
floral 1401f
Yersinia pestis 1502
pestis, aparición 1521
pseudotuberculosis 1508
YFP, colorante 587f

Z

Zeatina, estructura 1406f
Zellweger, síndrome 723
Zigoteno 1275, 1276f
Zigoto 1269, 1301
Zimógenos 793
Zinc dedos **421**, 422f
ZO1, proteína 1155f, 1156f
Zona paracortical 1550
pelúcida 1288f, 1297
Zonula adherens *véase* Cinturón de adhesión
ZP2 1298, 1301
ZP3 y reacción acrosómica 1298

El código genético

1.ª posición (extremo 5′)	2.ª posición: U	C	A	G	3.ª posición (extremo 3′)
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
U	Leu	Ser	**STOP**	**STOP**	A
U	Leu	Ser	**STOP**	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
C	Leu	Pro	His	Arg	C
C	Leu	Pro	Gln	Arg	A
C	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
A	Ile	Thr	Asn	Ser	C
A	Ile	Thr	Lys	Arg	A
A	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
G	Val	Ala	Asp	Gly	C
G	Val	Ala	Glu	Gly	A
G	Val	Ala	Glu	Gly	G

AMINOÁCIDOS Y SUS SÍMBOLOS			CODONES
A	Ala	Alanina	GCA GCC GCG GCU
C	Cys	Cisteína	UGC UGU
D	Asp	Ácido aspártico	GAC GAU
E	Glu	Ácido glutámico	GAA GAG
F	Phe	Fenilalanina	UUC UUU
G	Gly	Glicina	GGA GGC GGG GGU
H	His	Histidina	CAC CAU
I	Ile	Isoleucina	AUA AUC AUU
K	Lys	Lisina	AAA AAG
L	Leu	Leucina	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
M	Met	Metionina	AUG
N	Asn	Asparagina	AAC AAU
P	Pro	Prolina	CCA CCC CCG CCU
Q	Gln	Glutamina	CAA CAG
R	Arg	Arginina	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
S	Ser	Serina	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
T	Thr	Treonina	ACA ACC ACG ACU
V	Val	Valina	GUA GUC GUG GUU
W	Trp	Triptófano	UGG
Y	Tyr	Tirosina	UAC UAU